
Aus dem Institut für molekulare Pathogenese des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena

eingereicht über das

Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Flüchtige organische Substanzen als Biomarker von Infektionen mit *Mycobacterium
avium* subspecies *paratuberculosis***

Die Etablierung einer Methode zur Messung von flüchtigen organischen Substanzen im
Headspace von Bakterienkulturen und im Atemgas von adulten Rindern und die
Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anne Küntzel
Tierärztin aus Gera

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4129

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. habil. Petra Reinhold, PhD
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jochen Schubert
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*,
diagnostic techniques, kinetics, volatile compounds, cattle, breath, biomarkers

Tag der Promotion: 04.07.2019

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Paratuberkulose.....	3
2.1.1	Historischer Überblick.....	3
2.1.2	Erreger.....	3
2.1.3	Epidemiologie.....	4
2.1.4	Bedeutung der Paratuberkulose.....	6
2.1.5	Diagnostik.....	7
2.2	Flüchtige organische Substanzen als potentielle Biomarker.....	10
2.2.1	Historischer Überblick.....	11
2.2.2	VOC-Profile von Bakterienkulturen.....	11
2.2.3	Von tierischen bzw. menschlichen Organismen emittierte VOC.....	12
2.2.4	Analyse von VOC.....	13
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	15
3.1	Fragestellungen.....	15
3.2	Studiendesign.....	15
3.2.1	VOC-Analyse im Headspace von MAP [Studien 1-3].....	15
3.2.2	VOC-Analyse im Atemgas von Rindern [Studie 4].....	17
4	ERGEBNISSE.....	18
4.1	STUDIE 1: Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>.....	19
4.2	STUDIE 2: Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species.....	39
4.3	Studie 3: Core profile of volatile organic compounds related to growth of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> – a comparative extract of three independent <i>in vitro</i> studies.	68

4.4	STUDIE 4: Animal science meets agricultural practice: <i>Preliminary results of an innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions</i>.....	84
5	DISKUSSION	94
5.1	Validität und Relevanz der <i>In-vitro</i>-Studien.....	94
5.1.1	Studienübergreifendes MAP-anzeigendes VOC-Profil.....	94
5.1.2	VOC als diagnostischer Ansatz.....	96
5.1.3	Erklärungsmodelle zur Herkunft flüchtiger organischer Substanzen über Mykobakterien-Kulturen.....	100
5.1.4	Fazit.....	103
5.2	Validität und Relevanz der <i>In-vivo</i>-Studien	104
5.2.1	Übertragbarkeit von bakteriellen VOC-Profilen auf die <i>In-vivo</i> -Situation	104
5.2.2	Beurteilung des experimentellen Aufbaus.....	105
5.2.3	Biologische Einflussfaktoren der VOC-Analytik im Atemgas	106
5.2.4	Fazit.....	107
5.3	Einordnung des Erkenntniszuwachses in das Gesamtprojekt.....	108
5.4	Schlussfolgerungen und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten.....	109
5.4.1	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen	109
5.4.2	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen	110
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	112
7	SUMMARY.....	115
8	LITERATURVERZEICHNIS	117
9	ANHANG: ABSTRACTS WEITERER PROJEKTBEZOGENER PUBLIKATIONEN	142
10	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISSE.....	145
10.1	Abbildungsverzeichnis	145
10.2	Tabellenverzeichnis	147
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	149

11.1	Publikationen mit Peer-Review-Verfahren.....	149
11.2	Publizierte Abstracts	150
12	DANKSAGUNG	154
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	155

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

cfu	engl.: colony forming unit
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren engl.: enzyme linked immunosorbent assay
e-nose	elektronische Nase engl.: electronic nose
et al.	und andere lat.: et alii
Fig.	engl.: figure
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie engl.: gas chromatography-mass spectrometry
i. d. R.	in der Regel
IFN	Interferon
IMS	Ionen Mobilitäts Spektroskopie engl. : ion mobility spectrometry
KbE	Kolonie bildende Einheit
LAM	Lipoarabimannan
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAA	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i>
MAH	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i>
MAI	<i>Mycobacterium-avium-intracellulare</i> -Komplex
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
MB	<i>Mycobacterium bovis</i>
MI	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
MS	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
NTD	engl.: needle trap devices
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien engl.: non-tuberculous mycobacteria
NTME	engl.: needle trap micro extraction
OD	optische Dichte

p	Signifikanzniveau
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes engl.: peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung engl.: phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion engl.: polymerase chain reaction
PPD	purified protein derivate
PTR-MS	Protonen Transfer Reaktions- Massenspektroskopie engl.: proton transfer reaction-mass spectrometry
PTR-ToF-MS	Protonen Transfer Reaktions-Time of Flight- Massenspektroskopie engl.: proton transfer reaction-time of flight-mass spectrometry
Se	Sensitivität
SIFT-MS	engl.: selected ion flow tube-mass spectrometry
ssp.	subspecies
Sp	Spezifität
SPME	engl.: solid phase micro extraction
spp.	species
Tab.	Tabelle engl.: table
VOC	flüchtige organische Substanzen engl.: volatile organic compounds

1 Einleitung

Die Nutzung von Geruch als diagnostische Methode beschrieben bereits griechische Gelehrte der Antike, wie z. B. Hippokrates von Kos (um 460–370 v. Chr.). Durch ein spezifisches Geruchsprofil können speziell darauf trainierte Hunde humane Patienten mit Tumorerkrankungen detektieren (Williams und Pembroke 1989, Church und Williams 2001, Pickel et al. 2004, Willis et al. 2004). Auch Riesenhamsterratten erkennen tuberkulöse Patienten anhand des Geruchs von Sputumproben (Weetjens et al. 2009). Diese Beispiele zeigen exemplarisch das diagnostische Potential auf, welches Gasgemischen innezuwohnen scheint. In den verschiedenen und sehr komplex zusammengesetzten Gasgemischen befindet sich eine Vielzahl an flüchtigen organischen Substanzen (VOC, volatile organic compounds), die mittels unterschiedlicher Analyseverfahren identifiziert und quantifiziert werden können (Miekisch und Schubert 2006).

In der Humanmedizin werden unter anderem Patienten mit Tumorerkrankungen, verschiedenen Organerkrankungen, aber auch Infektionskrankheiten in die Erforschung des diagnostischen Potentials von VOC einbezogen. Hierfür werden Atemgas, der Gasraum (Headspace) über Se- und Exkreten sowie Emissionen von Haut, Fäzes und Bakterien beprobt. Dieser diagnostische Ansatz basiert auf physiologischen Grundlagen, die bislang in der Medizin nur wenig erforscht sind und deshalb kaum genutzt werden. Die Analyse von VOC könnte perspektivisch insbesondere für die Erkennung jener Erkrankungen hilfreich sein, deren Diagnostik noch nicht zufriedenstellend effizient ist. Eventuell kann eine VOC-basierte Diagnostik auch helfen, Prognosen besser als bisher spezifizieren zu können (Miekisch et al. 2004, Schubert et al. 2005).

Mit dem Ziel, VOC als Biomarker zu nutzen, konzentrieren sich die Forschungsarbeiten in der Veterinärmedizin auf Infektionen, die trotz der Verfügbarkeit moderner molekularbiologischer Methoden noch immer schwer zu diagnostizieren sind. Dies ist unter anderem bei Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) der Fall. Aufgrund der wachsenden ökonomischen Bedeutung von MAP-Infektionen, vor allem für Milchviehbetriebe, des zunehmenden internationalen Handels, aber auch der ungeklärten Frage des zoonotischen Potentials von MAP, ist eine schnelle, sensitive, spezifische und möglichst preiswerte Diagnostik notwendig. Die derzeit verfügbaren diagnostischen Methoden für eine Diagnosestellung *intra vitam* sind entweder sehr arbeits- und zeitaufwendig (kulturelle Anzucht), oder unzureichend sensitiv bzw. spezifisch (PCR-Methoden) und zudem oft teuer.

Die im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens durchgeführten Untersuchungen ordnen sich in das noch junge Forschungsfeld zur Nutzung von VOC als potentielle Biomarker ein. Ein diesbezüglich von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördertes Projekt mit dem Geschäftszeichen RE 1098/4-1, SCHU 1960/4-1 (2012-2015, erste Förderphase) und RE 1098/4-2, SCHU 1960/4-2 (2015-2018, zweite Förderphase) hat das Ziel der Identifizierung von VOC als Biomarker für Infektionen mit MAP. Erste entscheidende Erkenntnisse aus der Förderphase I dieses Projektes waren, dass sich die Zusammensetzung und die Konzentrationen der im alveolären Atemgas und auch im Headspace von Kotproben gemessenen VOC zwischen experimentell mit MAP infizierten Ziegen signifikant von denen nicht infizierter Kontrolltiere unterscheiden (Bergmann et al. 2015). Darüber hinaus wurden die Effekte physiologischer Einflussfaktoren (körperliche und metabolische Entwicklung vom Milchlamm zum Wiederkäuer, altersgemäße Anpassung an das Fütterungsregime), auf das VOC-Profil von Ziegen innerhalb des ersten Lebensjahres evaluiert (Fischer et al. 2015b). Die 2. Förderphase des Projektes (RE 1098/4-2, SCHU 1960/4-2) beinhaltet schwerpunktmäßig Untersuchungen zur *In-vitro*-Diagnostik von MAP. Es galt, mögliche Einflussfaktoren auf das VOC-Profil von Bakterienkulturen zu erkennen und die Wirkungen folgender Faktoren zu untersuchen:

Zusammensetzung des Nährmediums, Dauer der Inkubationszeit, Keimzahl des Inokulates und Temperatur während der Inkubation. Auch die Abgrenzung der VOC-Profile verschiedener Mykobakterien-Spezies sollte betrachtet werden. Zur Weiterführung der Untersuchungen *in vivo* sollte der bereits an Ziegen etablierte Versuchsaufbau zur VOC-Analytik im Atemgas auf Rinder übertragen werden, um die in Förderphase 1 experimentell ermittelten Ergebnisse zukünftig an beiden Tierarten und unter Praxisbedingungen zu überprüfen und weiterführende Untersuchungen zu ermöglichen.

Die Untersuchungen dieser Dissertation konzentrierten sich auf das Potential der *In-vitro*-Diagnostik mittels VOC im Headspace von MAP-Kulturen. Um VOC-Analytik als Diagnostikum in eine praktische Anwendung überführen zu können, sind detaillierte Kenntnisse über Einfluss- bzw. Störfaktoren auf das Analyseverfahren und die quantitative und qualitative Zusammensetzung des VOC-Profiles notwendig. Auch die praktische Anwendung *in vivo* erforderte sowohl einen zuverlässigen und unter Feldbedingungen anwendbaren Versuchsaufbau, als auch ausführliche Kenntnisse über Schwankungen von VOC-Messungen.

Die Ziele der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen waren:

- die Definition eines robusten VOC-Profiles im Headspace von MAP-Kulturen
- die Untersuchung von biologischen, methodischen und technischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil im Headspace von MAP-Kulturen
- das Ziehen von Rückschlüssen auf die Herkunft der VOC im Headspace von MAP-Kulturen
- die Entwicklung eines technischen Aufbaus zur Online-VOC-Analyse im Atemgas adulter Rinder unter Feldbedingungen
- die Untersuchung von physiologischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil im Atemgas von Rindern mithilfe von mehreren VOC-Messungen im Tagesverlauf

2 Literaturübersicht

2.1 Paratuberkulose

2.1.1 Historischer Überblick

Im Jahr 1895 wurde die Paratuberkulose erstmals durch den Dresdner Veterinärpathologen Heinrich Albert Johnne wissenschaftlich erwähnt. Auch heute noch ist diese Erkrankung unter Johnne'sche Krankheit oder Johnne's Disease bekannt. Johnne und Langdon Frothingham wiesen säurefeste Mikroorganismen im entzündlichen Gewebe der chronisch granulomatösen Enteritiden nach und beschrieben den Symptomkomplex als eine „besondere Form der Darmtuberculose“ (Johnne und Frothingham 1895). Ein Jahrzehnt später erkannte Bang, dass die pathomorphologisch typischen Läsionen im Darm nicht durch *Mycobacterium (M.) bovis*, den Erreger der Tuberkulose des Rindes, hervorgerufen werden und nannte die Erkrankung ‚pseudotuberkulöse Enteritis‘ (Bang 1906). Twort und Ingram konnten das ursächliche Agens isolieren und bezogen sich auf den Namen ‚*Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis*‘ (Twort und Ingram 1912). Im Jahr 1990 wurde dieses Agens der Unterart *M. avium* zugeordnet und erhielt seinen heute gültigen Namen *M. avium* subspecies (ssp.) *paratuberculosis* (Thorel et al. 1990).

2.1.2 Erreger

MAP gehört zur Ordnung der Actinomycetales, zur Familie *Mycobacteriaceae*, zum Genus *Mycobacterium (M.)* und zur Spezies *M. avium*. Aufgrund der engen Verwandtschaft von *M. avium* und *M. intracellulare* werden diese Spezies und deren Unterarten zum *Mycobacterium-avium-intracellulare*-Komplex (MAI) zusammengefasst. Zum MAI zählen somit *M. avium* ssp. *avium* (MAA), *M. avium* ssp. *hominissuis* (MAH), *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) und *M. intracellulare* (MI). Ein weiterer Komplex der *Mycobacteriaceae* ist der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex, welcher mit *M. tuberculosis* (Trujillo-Rojas 1967, Liu et al. 1980, Aranaz et al. 1996, Michalak et al. 1998, Montali et al. 2001), *M. bovis* (MB) (Moda et al. 1996) und *M. caprae* die zoonotischen Erreger der Tuberkulose umfasst. In der Gruppe der nicht-tuberkulösen-*Mycobacteria* (NTM) werden der MAI und alle anderen Mykobakterien zusammengefasst, die sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin aufgrund steigender Inzidenzen an Bedeutung gewinnen (Runyon 1965, Falkinham 3rd 1996, Weiss und Glassroth 2012, Biet und Boschioli 2014, Brode et al. 2014).

MAP-Isolate können drei Biotypen zugeordnet werden, welche kulturmorphologische (Merkal und Curran 1974, Stevenson et al. 2002, de Juan et al. 2005) und genotypische (Moreira et al. 1999) Unterschiede aufweisen. Der Biotyp I (oviner Typ) wird in der Regel (i. d. R.) aus Probenmaterial von Schafen isoliert und wächst langsam in glänzenden, gelb pigmentierten, flachen und gleichmäßigen Kolonien (Stevenson et al. 2002). Aus Probenmaterial von Rindern wird zumeist Biotyp II (boviner Typ) isoliert. Dieser wächst in Kultur ebenfalls langsam und zeigt nicht-pigmentierte, kleine, glatte und glänzende Kolonien, die verschiedene Formen aufweisen (Merkal und Curran 1974). Aber auch in Proben von Schafen und Wildwiederkäuern wurde dieser Biotyp gefunden (Pavlik et al. 2000). In Proben von Schafen, Ziegen und Rindern

wurde der intermediäre Typ (Biotyp III) nachgewiesen, welcher ebenfalls ein langsames Wachstum aufweist und nicht-pigmentiert ist (de Juan et al. 2005).

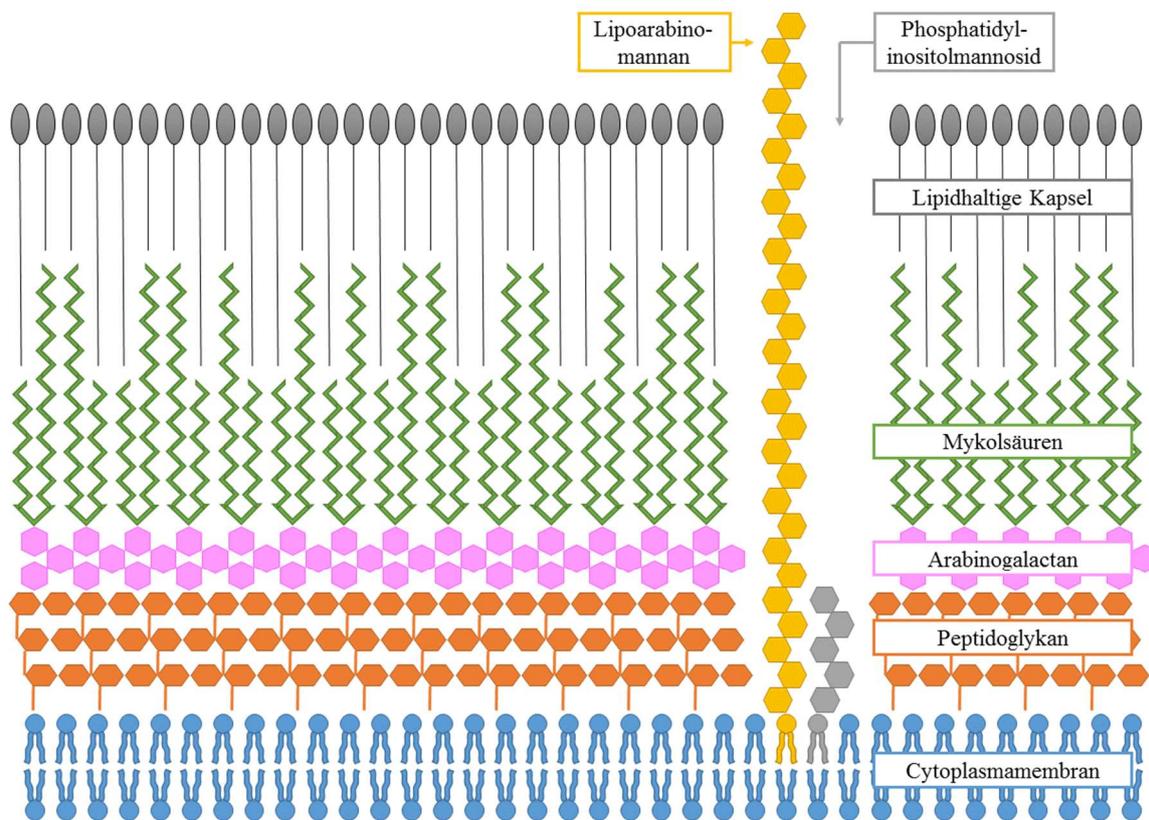


Abb. 1: Aufbau der Zellwand von Mykobakterien. (modifiziert nach McNeil und Brennan 1991 sowie Brennan und Nikaido 1995).

MAP ist ein schwach gram-positives, aerobes, nicht bewegliches, nicht sporenbildendes, säure- und alkoholfestes Stäbchen (Manning und Collins 2001) mit einer durchschnittlichen Breite von 0,5 μm und Länge von 1–1,5 μm . Die komplexe hydrophobe Zellwand (Abb. 1) ist reich an Lipiden (Clarke 1997) und weist eine Peptidoglykanschicht mit angelagerten Arabinogalaktanen auf, an welche Mykolsäuren gebunden sind (McNeil und Brennan 1991, Jarlier und Nikaido 1994, Brennan und Nikaido 1995). Lipoarabinomannan ist ein entscheidender immunmodulatorischer Zellwandbestandteil, der unter anderem die Antikörperproduktion im Wirt anregt (Jolly et al. 2011). Die Zellwand der Mykobakterien weist viele Proteine auf, deren Funktionen noch weitgehend ungeklärt sind (He und De Buck 2010). Interzelluläre Filamente (fibronectin attachment protein) der Bakterienwand führen zu einem typischerweise nestartigen „Zusammensitzen“ von MAP im Probenmaterial (Merkal 1973).

2.1.3 Epidemiologie

2.1.3.1 Tenazität

MAP zeichnet sich durch eine hohe Tenazität aus. Die Zellwandeigenschaften von Mykobakterien im Allgemeinen sorgen für eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber thermischen und chemischen Einflüssen. Die Überlebensfähigkeit von MAP in stehenden Gewässern kann bis zu 38 Wochen betragen (Lovell et al. 1944, Whittington et al. 2004). Rinderkot mit teilweise unbekannter Bakteriendichte wies unter natürlichen Bedingungen

(variable Außentemperatur, Luft- und Sonneneinstrahlung) je nach Studie eine Tenazität von 9 bis 35 Wochen auf (Lovell et al. 1944, Richards und Thoen 1977, Whittington et al. 2004). Die Abtötung der Bakterien wird positiv durch ultraviolette Strahlung, steigende Temperaturen und zunehmenden Ammoniakgehalt beeinflusst. Beispielsweise beträgt die Tenazität von MAP in Urin 7 Tage (Larsen et al. 1956). Unter anaeroben Bedingungen mit niedrigem pH-Wert, wie es in Silage vorkommt, fand man nach max. 14 Tagen überlebensfähige Bakterien (Katayama et al. 2000). Im Gegensatz dazu kann MAP den Prozess des Pasteurisierens von Milch in Teilen überleben (Grant et al. 1998, Ayele et al. 2005). Des Weiteren setzt die Alkohol- und Säurefestigkeit der Zellwand die Wirksamkeit wasserlöslicher Desinfektionsmittel und Antibiotika deutlich herab (Chiodini et al. 1984a, Jarlier und Nikaido 1994).

2.1.3.2 Übertragungswege

MAP siedelt sich in den Peyer'schen Platten des distalen Jejunums und des Ileums an und wird über Kot infizierter Tiere ausgeschieden (Rosenberger 1978, Chiodini et al. 1984a). Im Kot befinden sich die Erreger in abgeschilferten Darmepithelzellen und abgestorbenen Makrophagen. Die MAP-Ausscheidung über Kot infizierter Tiere beginnt individuell zeitlich verschieden (Lepper et al. 1989) und verläuft intermittierend. Aber bereits im Kot exponierter Kälber konnte MAP nachgewiesen werden (Antognoli et al. 2007, Corbett et al. 2017). Des Weiteren wird MAP von infizierten Tieren auch über die Milch ausgeschieden (Taylor et al. 1981, Sweeney et al. 1992a, Lambeth et al. 2004). Zusätzlich wurde bei Rindern, Wildwiederkäuern und Schafen von einer intrauterinen Erregerübertragung berichtet (Sweeney et al. 1992b, Lambeth et al. 2004, Thompson et al. 2007). Die Anzucht von MAP gelang des Weiteren aus Geschlechtsorganen und Sperma infizierter Bullen (Larsen et al. 1981, Ayele et al. 2004, Münster et al. 2013), eine Übertragung über natürliche oder künstliche Besamung ist allerdings bisher nicht dokumentiert. Vornehmlich Jungtiere nehmen die Erreger oral aus der Umgebung (Rankin 1961, Sweeney 1996, Pithua et al. 2013) oder durch Saugen am kontaminierten Euter des Muttertieres auf (Sweeney 1996). Bei langer Inkubationszeit von 5-7 Jahren treten erste unspezifische Symptome lange nach Beginn der Erreger-Ausscheidung auf. Eine orale Infektion von adulten Tieren mit entsprechend hohen Erregerdosen sollte nicht ausgeschlossen werden (Sweeney 1996, Wells et al. 2012).

2.1.3.3 Wirtsspektrum

Alle Haus- und Wildwiederkäuer gelten als empfänglich für Paratuberkulose (Clarke 1997), wobei Jungtiere am empfänglichsten sind (Sweeney 1996). Es gilt, je älter die Tiere, desto höhere Infektionsdosen sind notwendig, um eine Infektion zu induzieren (Chiodini et al. 1984a, Sweeney 1996). Des Weiteren wird eine altersabhängige Resistenz diskutiert (Clarke 1997). In der Gatterwildhaltung wird eine stetig steigende Inzidenz von Paratuberkulose verzeichnet (Mackintosh et al. 2004). Aber auch monogastrische Wildsäuger und Vögel, mit symptomatischen, aber auch asymptomatischen Infektionen, gelten als Wirte und Überträger (Beard et al. 2001, Corn et al. 2005). Vor allem Wildhasen und Kaninchen fungieren als natürliches Reservoir (Raizman et al. 2005). Des Weiteren gibt es Einzelfallberichte über Paratuberkulose-Infektionen bei Hunden (Vogel 1977), Eseln (Stief et al. 2012) und Schweinen (Larsen et al. 1971). Katzen gelten als symptomlose Überträger der Paratuberkulose (Palmer et al. 2005).

2.1.4 Bedeutung der Paratuberkulose

2.1.4.1 Geografische Verbreitung,

Berichte über positive MAP-Befunde in diversen Proben gibt es auf allen Kontinenten (Abb. 2), also aus Nord- und Südamerika (Chiodini et al. 1984a, Espeschit et al. 2017), Afrika (Benazzi et al. 1995, Michel und Bastianello 2000), Asien (Talatchian 1965, Goto et al. 1972, Park et al. 2016), Australien und Neuseeland (Davidson 1970, Skilbeck 1982, Seaman und Thompson 1984) und Europa (Bratanovic et al. 1965, Jorgensen 1972, Crowther et al. 1976, Gunnarsson 1979, Holmstrom et al. 2003, Sternberg und Viske 2003). Auch wenn vereinzelte Länder Paratuberkulose nie meldeten, oder zeitweise als frei gelten oder galten, kommt die Erkrankung weltweit vor und kann aufgrund der mangelnden Sensitivität und Spezifität der derzeit verfügbaren diagnostischen Testsysteme, vor allem im subklinischen Stadium, jederzeit verschleppt werden. In der Literatur berichtete Einzeltierprävalenzen von MAP in Europa schwanken um 0,0-19,8 % bei Rindern, 0,3-0,6 % bei Schafen sowie 0,0-1,7 % bei Ziegen (Nielsen und Toft 2008). In den Jahren 1997 bis 2007 waren bis zu 68 % der Rinderherden, 52 % der Ziegenbestände und 24 % der Schafherden in Europa von Paratuberkulose betroffen (Nielsen und Toft 2008).

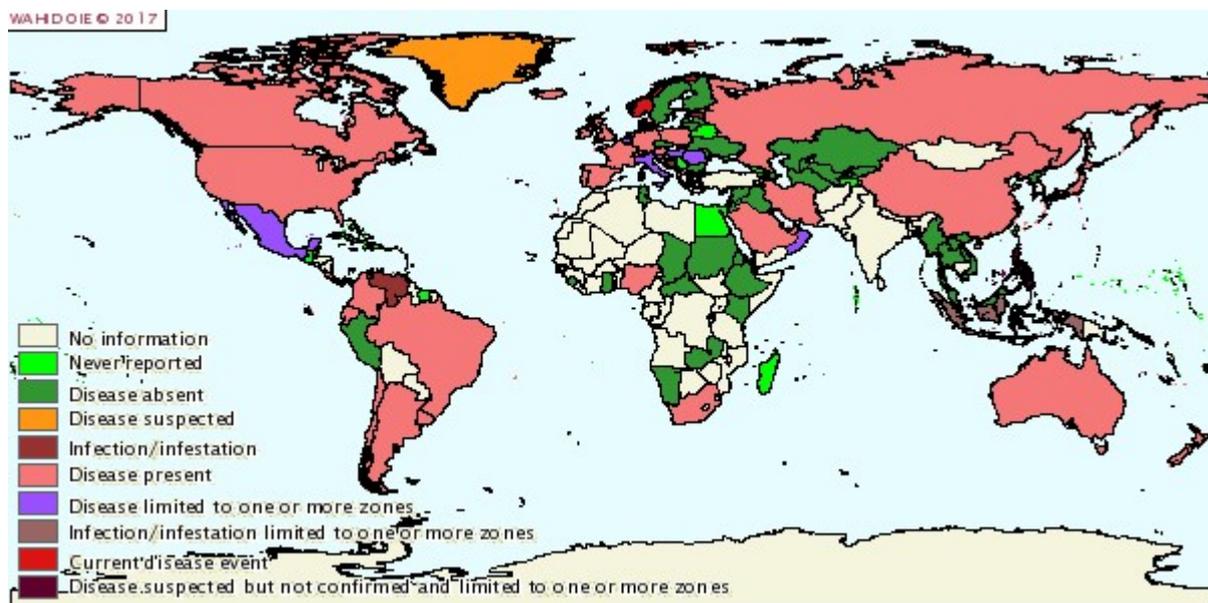


Abb. 2: Weltweites Vorkommen von Paratuberkulose in Nutztier- und Wildtierpopulation im Jahr 2016 (OIE 2017).

2.1.4.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Zu den wirtschaftlich bedeutenden Symptomen einer MAP-Infektion zählen das reduzierte Schlachtgewicht (Raizman et al. 2007), die erhöhte Anfälligkeit für andere Erkrankungen (Raizman et al. 2007), die herabgesetzte Fertilität der Tiere (Smith et al. 2010) und der Milchverlust (Benedictus et al. 1987, Beaudeau et al. 2007, Raizman et al. 2009, Donat et al. 2014). Wirtschaftliche Verluste durch Paratuberkulose begründen sich vor allem durch den letalen Ausgang der Erkrankung, aber auch die aufgeführten unspezifischen Symptome, die i. d. R erst Jahre später der Diagnose Paratuberkulose zugeordnet werden. Eine 1989 in den USA durchgeführte Studie berichtete über Verluste durch Paratuberkulose von ein bis fünf Milliarden US-Dollar pro Jahr (Clarke 1997) und eine französische Studie gibt jährliche Mehrkosten von 1940 € pro klinisch erkranktes Milchrind an (Dufour et al. 2004).

2.1.4.3 Zoonotische Bedeutung

Aufgrund der hohen Tenazität von MAP in der Umwelt (Whittington et al. 2004), der Inzidenz des Erregers in Rohmilch (Sweeney et al. 1992a, Streeter et al. 1995) und Nachweisen von genetischem Material von MAP in humanen Proben wird das zoonotische Potential von MAP bis heute stetig diskutiert (Chiodini 1989, Thompson 1994, Sweeney et al. 2012, Atreya et al. 2014). Erste Hypothesen über ein mögliches zoonotisches Potential von MAP erfolgten aufgrund der Ähnlichkeit der Symptomatik und Pathogenese der Paratuberkulose mit dem *Morbus Crohn* des Menschen (Patterson und Allen 1972, Morgan 1987). Wenig später konnten Mykobakterien (Chiodini et al. 1984b) und im speziellen MAP (McFadden et al. 1987) aus an *Morbus Crohn* erkrankten Patienten isoliert werden. Es liegen lediglich Fallberichte von Patienten vor, die mit eingeschränkter Funktion des Immunsystems, wie bei humanem Immundefizienz-Virus (Richter et al. 2002) oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Collins et al. 2000), positiv auf MAP getestet wurden. Ein eindeutiger Beweis, dass MAP *Morbus Crohn* auslöst oder daran beteiligt ist, fehlt bislang.

2.1.5 Diagnostik

Allgemein bekannt ist, dass man unter der Diagnostik die Gesamtheit der Maßnahmen versteht, die zur Erkennung einer Erkrankung oder Infektion führen. Eine ideale diagnostische Methode zeichnet sich demnach durch das Auffinden aller infizierten Tiere eines Erregers aus, also einer 100 %-igen Sensitivität (Se), ohne fälschlicherweise gesunde Tiere als positiv einzustufen (100 %-ige Spezifität, Sp). Im besten Fall sollte dies auch für subklinische Stadien einer Erkrankung gelten. Die Diagnostik der Paratuberkulose wird durch die sehr lange Inkubationszeit und erst spät im Erkrankungsverlauf einsetzende Antikörperbildung sowie Erregerausscheidung, die lediglich intermittierend auftritt (siehe 2.1.3.2 Übertragungswege), erschwert. Diese Eigenschaften einer MAP-Infektion beeinträchtigen sowohl die Se als auch die Sp v.a. im latenten und subklinischen Stadium. Die Folge ist, dass es keine Referenzmethode zur Evaluierung neuer diagnostischer Ansätze *ante mortem* im Sinne einer Früherkennung gibt (Nielsen und Toft 2008).

Gewünschte Voraussetzung für ein routinemäßiges Bekämpfungsprogramm wäre ein Test, der kostengünstig, einfach und schnell ist (hoher Probenumsatz) und der eine möglichst hohe Se und Sp aufweist. All diese Eigenschaften gemeinsam weist keine der momentan verfügbaren und nachfolgend beschriebenen Methoden auf.

2.1.5.1 Direkter Erregernachweis

Mikroskopische Untersuchung von Kotausstrichen und Organabklatschpräparaten

Eine Möglichkeit des Nachweises von Mykobakterien ist die lichtmikroskopische Untersuchung von mit der Ziehl-Neelsen-Methode gefärbten Präparaten. Traditionell basiert das Prinzip der Ziehl-Neelsen-Färbung auf der Säure- und Alkoholfestigkeit der mykobakteriellen Zellwand (Ziehl 1882, Neelsen 1892). Dadurch kann der eingedrungene rote Farbstoff (Carbolfuchsin) nicht durch salzsauren Alkohol entfernt werden. Das hat zur Folge, dass Mykobakterien deutlich rot angefärbt werden und sie in Nestern zusammengedrängt unter dem Lichtmikroskop zu finden sind. Eine neuere Färbemethode, die Acridin-orange-Fluoreszenzfärbung, basiert ebenfalls auf der Säurefestigkeit der Mykobakterien (Smithwick et al. 1995). Beide Färbemethoden werden zumeist an Kotproben klinischer Verdachtsfälle oder postmortal gewonnenen Organproben durchgeführt und sind weniger für die Identifizierung subklinisch erkrankter Tiere geeignet (Merkal et al. 1968). Außerdem zeigen beide Methoden jegliche säurefeste Stäbchen an und sind somit nicht

spezifisch für MAP. In verschiedenen Studien wurde von einer unzureichenden Sp von 83-88 % (Mercier et al. 2009, Weber et al. 2009) und einer sehr geringen Se (43-49 % bei klinischen Fällen) berichtet (Zimmer et al. 1999, Weber et al. 2009, Rawther et al. 2012).

Kulturelle Anzucht von MAP aus Gewebs- oder Kotproben

Aufgrund der hohen Substratansprüche von MAP werden für die kulturelle Isolierung i. d. R. Eidotter- oder Vollei-haltige Nährmedien verwendet, denen Mykobaktin J (ein zellwandständiger Eisenchelatbildner) zugesetzt wird (Merkal und Curran 1974). Die Generationszeit von MAP beträgt 1,3–4,4 Tage, was zur Folge hat, dass Kulturen frühestens nach 4 Wochen und oft erst nach 6 Wochen sichtbar sind (Lambrecht et al. 1988). Die Kultivierungsdauer sinkt mit steigender Erregerdichte im Kot, steigendem Alter und zunehmendem Erkrankungsstadium des Tieres (Collins et al. 1990, Kalis et al. 1999, Gierke 2009). Auf diesen Erkenntnissen basiert die Empfehlung, in Kultur gebrachte Isolate von Rindern 16 Wochen zu inkubieren, um auch schwächere Ausscheider diagnostizieren zu können (Kalis et al. 1999). Mit dieser Inkubationsdauer können Keimzahlen ab 50-100 Kbe/g Kot nachgewiesen werden (Merkal 1973, Chiodini et al. 1984a). MAP-Isolate von Schafen, welche auf Festmedien inokuliert wurden, sollten bis zu mehr als einem Jahr inkubiert werden, während in Flüssigmedium i. d. R. 8 Wochen reichen (Whittington et al. 1998). Eine besondere Schwierigkeit stellen Überwucherungen der Nährmedien mit Bakterien oder Pilzen dar, welche vor allem durch die langen Inkubationszeiten begünstigt werden (Kim et al. 1989), aber auch anderen Faktoren wie bspw. schlechter Qualität von verfütterter Silage. Eine sehr aufwendige Probenvorbereitung in Verbindung mit MAP-Anreicherung durch Sedimentations-, Dekontaminations- und Zentrifugationsschritte soll eine solche Überwucherung verhindern (Stabel 1997, Eamens et al. 2000). Im Anschluss steht immer die Speziesidentifizierung, welche i. d. R. durch Prüfung der Mykobaktinabhängigkeit und den Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) erfolgt.

Die Se einer kulturellen Anzucht von MAP aus Kot beträgt im Verhältnis zur Gewebekultur auf Festmedium 30-83 % (Sockett et al. 1992a, Whitlock et al. 2000, Huda und Jensen 2003) und liegt in Flüssigkultur etwas höher mit zusätzlich kürzerer Inkubationsdauer. Die Sp beträgt je nach Referenzmethode 53-100 % (Sockett et al. 1992a, Collins 1996). Bei angepasstem Protokoll der Probenvorbereitung sind optimierte Werte der Se der Grund, weswegen die Kotkultur nach wie vor als Goldstandard der *ante mortem* Einzeltierdiagnostik angesehen wird (Clark et al. 2008, Köhler et al. 2008, Gierke 2009). Daher findet der kulturelle Nachweis von MAP im Kot in verschiedenen Programmen zur Bekämpfung bzw. Reduktion der Paratuberkulose Verwendung. In Thüringen (Elschner 2005), in Nordrhein-Westfalen (Vom Schloß 2000), in den Niederlanden und in einzelnen Staaten der USA basieren diese Programme entweder teilweise oder ausschließlich auf der Kotkultur.

Molekularbiologischer Nachweis von MAP aus Kotproben

Der molekularbiologische Nachweis von MAP mittels PCR erfolgt durch Primer für die Genomabschnitte IS900, *f57*, *Locus 255*, *ISMap02* und *ISMav2*, die einzeln oder kombiniert Anwendung finden (Vary et al. 1990, Poupart et al. 1993, Strommenger et al. 2001, Stabel und Bannantine 2005). Je nach Auswahl der Primer kommen falsch-positive Ergebnisse vor, da ähnliche Sequenzen auch in anderen Mykobakterien-Spezies gefunden wurden (Cousins et al. 1999, Englund et al. 2002). Die „nested“ PCR, eine Weiterentwicklung mit zwei hintereinander geschalteten Amplifikationsschritten zweier unterschiedlicher Primerpaare, erhöht die Se deutlich (Collins et al. 1993), allerdings besteht durch das mehrfache Probenhandling die Gefahr von Kontamination und somit falsch-positiven Ergebnissen (Collins et al. 1993, Möbius et al. 2008, Douarre et al. 2010). Eine quantitative Möglichkeit bietet die real-time PCR, bei

der die Zunahme des PCR-Produktes nach jeder Amplifikation gemessen wird und die Probe bei Überschreitung eines Schwellenwertes als positiv gewertet wird (Bögli-Stuber et al. 2005, Alinovi et al. 2009). Je eher dieser Schwellenwert erreicht wird, desto mehr Ziel-DNA befindet sich in der Ausgangsprobe.

Bei der konventionellen PCR muss das entstandene Produkt im Anschluss an die Vervielfältigung sichtbar gemacht werden. MAP ist aufgrund seiner Zellwandstruktur sehr widerstandsfähig gegenüber enzymatischen oder thermischen Methoden zur Lyse, so dass häufig zusätzliche mechanische Arbeitsschritte angewendet werden müssen (Stephan 2007, Zhang und Zhang 2011). Die untere Nachweisgrenze der konventionellen PCR wird in Kotproben natürlich infizierter Rinder mit 50 KbE/g Kot (Collins et al. 1993) bzw. 100 KbE/ml Kot angegeben (Vary et al. 1990). Die Sp bzw. Se der PCR-Untersuchung werden im Vergleich zur Kotkultur mit 83-100 % bzw. 3-100 % angegeben (van der Giessen et al. 1992, Christopher-Hennings et al. 2003, Stabel und Bannantine 2005) und im Vergleich zur Kultur aus Gewebe betrug die Se 57-82 % (Erume et al. 2001).

2.1.5.2 Indirekter Erregernachweis

Antikörperbestimmung mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Antikörper gegen MAP im Blutserum von Tieren stehen verschiedene kommerzielle Testsysteme zur Verfügung, welche sich hauptsächlich durch die Beschichtungsantigene unterscheiden. In der Regel kommen biologisch heterogene protoplasmatische Antigene aus MAP-Stämmen und dem *M. avium* Stamm 18 zur Anwendung (Yokomizo et al. 1983, Yokomizo et al. 1985, Cox et al. 1991, Molina et al. 1991, Sockett et al. 1992a, Sockett et al. 1992b, Rajukumar et al. 2001, Sergeant et al. 2003). Leider ist die Se der erhältlichen Test-Kits eher gering und schwankt stark (Rind 7-96 %, Ziege 16-88 %, Schaf 20-50 %), wohingegen die Sp 80-100 % beträgt (Molina et al. 1991, Yokomizo et al. 1991, Dargatz et al. 2001, Sergeant et al. 2003, McKenna et al. 2005, Gumber et al. 2006, Singh et al. 2009). Diese starken Schwankungen kommen unter anderem auch durch die verschiedenen Vergleichsmethoden zustande, die bei der jeweiligen Testvalidierung Verwendung fanden (z. B. kulturelle Anzucht von MAP aus Kot- oder postmortalen Gewebeproben). Mittels einer Vorabsorption des Serums mit *M. phlei*-Extrakt konnten Kreuzreaktionen mit Antikörpern anderer Mykobakterien-Spezies verringert werden (Yokomizo et al. 1985), allerdings auf Kosten der Se (Bech-Nielsen et al. 1992, Singh et al. 2009). Die Menge nachzuweisender Antikörper im Serum unterliegt den gleichen populations- und einzeltierbedingten Einflussfaktoren wie bei der Kotkultur (siehe 2.1.3.2 Übertragungswege) (Bech-Nielsen et al. 1992, Whitlock et al. 2000, Dargatz et al. 2001, Sergeant et al. 2003, Mercier et al. 2009). Aufgrund verschiedener Schwellenwerte, Durchführungsprotokolle und Testchargen, die mit schwankenden Se und Sp einhergehen (Yokomizo et al. 1991, Dargatz et al. 2004, McKenna et al. 2005, Köhler et al. 2008, Gierke 2009), werden ELISAs als alleiniges Diagnostikum lediglich für das Herdensingreening, nicht aber für die Einzeltierdiagnostik empfohlen (Dargatz et al. 2001, McKenna et al. 2005, Gierke 2009, Khol et al. 2012). Des Weiteren finden ELISA-Systeme auch Anwendung in der Antikörperbestimmung in Milchseren (Hendrick et al. 2005, Salgado et al. 2007, Kumar et al. 2008).

Hauttest zum indirekten Nachweis der zellulären Immunantwort

Beim Hauttest wird dem Tier am seitlichen Hals eine definierte Menge eines spezifischen Antigens *intrakutan* injiziert. Vor der Injektion und 24h bis 72h danach wird die Hautdicke an der Injektionsstelle gemessen und die Differenz zum Ausgangswert gebildet (Konst und McIntosh 1958b, Konst und McIntosh 1958a). Überschreitet diese den Schwellenwert von

2-5 mm, gilt die Reaktion als positiv (Larsen et al. 1963, de Lisle et al. 1980, Collins 1996, Kalis et al. 2003). Eine positive Reaktion deutet auf eine lokale allergische Reaktion vom verzögerten Typ hin und zeigt das rasche Einwandern von Immunzellen in die Injektionsstelle an, da der Organismus im Vorhinein bereits Kontakt zum Antigen hatte (Sikes 1953, Merkal 1973). Antigene zur Paratuberkulosedagnostik sind purified protein derivatives (PPD) von MAA (aviäres PPD, aPPD) oder MAP (Johnin, jppD) (M'Fadyean et al. 1916, Larsen et al. 1955, de Lisle et al. 1980, Kalis et al. 2003, Stephan 2007). Der Test wird aufgrund der geringen Sp und Se nicht empfohlen (Larsen et al. 1963, Collins 1996, Perez et al. 1999, Klawonn et al. 2002).

IFN- γ -Release Assay

Ähnlich wie bei der verzögerten Entzündungsreaktion des Hauttests wird nach Stimulation IFN- γ ausgeschüttet. Dies geschieht beim IFN- γ -Release Assay *in vitro* nach Zugabe von PPDs zu Vollblut (Kalis et al. 2003) oder isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, engl. peripheral blood mononuclear cell) (Stabel 1996). Zu den PBMC zählen Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten. Im Anschluss der Stimulation wird die IFN- γ -Konzentration im Serum bzw. Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Etablierte IFN- γ -Tests sind kaum miteinander zu vergleichen (Nielsen und Toft 2008), da neben unterschiedlichsten Protokollen (unterschiedliche Stimulantien, Konzentrationen etc.) (Stabel 1996, Jungersen et al. 2002, Huda und Jensen 2003, Kalis et al. 2003) unspezifische Kreuzreaktionen auftraten (McDonald et al. 1999, Jungersen et al. 2002) und Positivkontrollen teils fehlten (Robbe-Austerman et al. 2006). Daraus folgten, je nach Studiendesign und Vergleichsmethode, hohe Schwankungen in der Sp (44-99 %) für das Rind (Jungersen et al. 2002, Huda und Jensen 2003, Kalis et al. 2003). Die Se lag bei infizierten Rindern im Alter von 1-2 Jahren bei 75 % und erhöhte sich durch Wiederholung des Assays (Huda et al. 2004). Mit steigendem zeitlichem Abstand zur Infektion bzw. Erstkontakt sinkt die zelluläre Immunität und die Se des Tests sinkt ebenfalls. Dieser Test ermöglicht als einziger die Anzeige von subklinisch erkrankten Tieren, bevor es zur Erregerausscheidung bzw. Antikörperbildung kommt. Allerdings kann er nicht zwischen infizierten Tieren und lediglich exponierten Tieren unterscheiden (Lybeck et al. 2013).

Weitere Tests des indirekten Erregernachweises

Die indirekten Erregernachweise mittels Agargelimmundiffusion, passive Hämagglutination und Komplementbindungsreaktion finden in Deutschland keine Anwendung mehr. Diese drei Methoden weisen eine unzureichende Se auf, sowohl im Vergleich zu Enzym- und Antikörpervermittelten Tests (Yokomizo et al. 1991, Ferreira et al. 2002, Ikonopoulou et al. 2007), als auch im Vergleich zu direkten diagnostischen Methoden des Erregernachweises (Sherman et al. 1990, Sockett et al. 1992a, Sockett et al. 1992b).

2.2 Flüchtige organische Substanzen als potentielle Biomarker

Flüchtige organische Verbindungen sind organische, also Kohlenstoff-haltige Stoffe, die aufgrund ihres niedrigen Siedepunktes bzw. hohen Dampfdruckes bereits bei niedrigen Temperaturen (z. B. Raumtemperatur) vollständig oder teilweise im gasförmigen Zustand vorliegen. Sie werden sowohl von anthropogenen Quellen (z. B. Baustoffe, Farben, Reinigungsmittel) als auch von natürlichen Quellen emittiert. Zu letzteren zählen alle Pflanzen, Menschen, Tiere und Mikroorganismen. Daher haben die VOC in verschiedensten Forschungsgebieten Beachtung gefunden, wie z. B. der Umwelt- (Wolkoff 2003, Dicke und Loreto 2010, Insam und Seewald 2010) und Lebensmittelanalytik (Mayr et al. 2003, Xu et al. 2010, Biasioli et al. 2011). In der Medizin werden sie als potentielle diagnostische und nicht-

invasiv zu ermittelnde Biomarker angesehen (Miekisch et al. 2004, Pereira et al. 2015). Ihre Analyse liefert sowohl qualitative als auch quantitative Messwerte. Sie werden in verschiedensten Gasgemischen gemessen, wie z. B. in der Atemluft (Kim et al. 2012, Amann et al. 2014a) und in der Gasphase (Headspace) über flüssigen und festen Proben (z. B. Urin, Kot, Gewebe) (Garner et al. 2007, Probert et al. 2009, Amann et al. 2014a), aber auch im Headspace von Bakterienkulturen (Bos et al. 2013, Filipiak et al. 2013). Bei der Überwachung und dem Monitoring von Patienten könnten sie wichtige zusätzliche und eventuell prognostische Informationen liefern (Schubert et al. 2005).

2.2.1 Historischer Überblick

Schon den griechischen Gelehrten der Antike, wie Hippokrates von Kos (um 460-370 v. Chr.), half der Geruch von Ausatemluft sowie diverser Se- und Exkrete bei der Diagnosestellung verschiedener Erkrankungen ihrer Patienten (Phillips 1992, West 2011). Es dauerte allerdings Jahrhunderte, bis diese diagnostischen Gerüche erstmals katalogisiert wurden. Dabei unterschied man nach allgemeinem Körpergeruch, Geruch des Atems und Geruch des Urins (Hayden 1980). Das erste im Atem nachgewiesene Molekül war Kohlenstoffdioxid (CO₂). Lavoisier und Laplace beschrieben 1784 die Bildung von CO₂ im Körper und die Elimination desselben über den Atem (Duveen und Klickstein 1955). Noch heute werden mittels Kapnometrie, also der CO₂-Bestimmung in der Expirationsluft, anästhesierte und beatmete Patienten ventilatorisch überwacht. Im 19. Jahrhundert wurden weitere Moleküle im Atem nachgewiesen, wie z. B. Aceton bei Diabetes durch Nebelthau (Hubbard 1920) und Ethanol durch Anstie (Baldwin 1977). Den Grundstein für die moderne VOC-Analytik in der Medizin legten Pauling et al. (1971), indem mittels GC über 200 Substanzen im Atem nachgewiesen wurden (Teranishi et al. 1972). Mit fortschreitenden technischen Möglichkeiten zur Analyse von VOC, die ebenfalls die Identifikation der Substanzen ermöglichten, etablierten sich im Laufe des 20. Jahrhunderts verschiedene Atemtests. Dazu zählen der Atemalkoholtest (Jones et al. 1992), der Wasserstoff-Atemtest zur Diagnostik von Störungen der Kohlenhydratverdauung (z. B. Laktoseintoleranz, Fruktosemalabsorption) (Eisenmann et al. 2008) und der Nachweis einer Besiedlung des Magens mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* mittels des ¹³C-Harnstoff-Atemtests (Klein et al. 1996, Amann et al. 2014b). Zusammenhänge zwischen bestimmten VOC und pathologischen Zuständen rückten immer weiter in den Vordergrund der Forschung. Auch die in der Literatur zunehmenden Berichte von Hunden, die Patienten mit verschiedenen Tumoren erschnüffeln konnten (Williams und Pembroke 1989, Church und Williams 2001, Pickel et al. 2004, Willis et al. 2004), trieben dieses Forschungsfeld und die Identifikation der Biomarker verschiedener Erkrankungen weiter an. In der Infektionsmedizin gibt es Berichte über die potentielle Nutzung von VOC in der Diagnostik, wie z. B. Afrikanischen Riesenhamsterratten, die zur Identifikation von an *M. tuberculosis* erkrankten Patienten genutzt werden, indem sie Sputumproben beschnüffeln (Weetjens et al. 2009). Die Identifikation einer Infektionskrankheit mittels Geruchs erklärt auch das Vorhaben, VOC-Profile von unterschiedlichen Bakterienspezies und anderen pathogenen Mikroorganismen definieren zu wollen.

2.2.2 VOC-Profil von Bakterienkulturen

Die verschiedenen Aufgaben der mikrobiellen VOC sind seit längerem bekannt. Dazu zählen sowohl die Funktion als Lockstoff für Tiere, v. a. Insekten (Tosi und Sola 1993, Robacker und Bartelt 1997, Hockelmann und Juttner 2004, Robacker et al. 2004), als auch die Funktion als Abwehr- oder Abschreckmittel gegen Tiere, die als Konkurrenten um Nährstoffe auftreten (Jardine et al. 1999). Des Weiteren fungiert eine Vielzahl an Substanzen als Schutz gegen mikrobielle Antagonisten und Konkurrenten (Mackie und Wheatley 1999, Ryu et al. 2004, Kai et al. 2007), aber auch als Mittel der Kommunikation innerhalb und zwischen Spezies

(Wheatley 2002, Ryu et al. 2003). Der Großteil der VOC ist als Zwischen- oder Endprodukt des Metabolismus anzusehen (Bunge et al. 2008). Emittierte Substanzen können somit Informationen liefern über das Vorhandensein von bestimmten wachsenden Bakterienspezies, über die jeweilige Stoffwechsellage (von z. B. fakultativ pathogenen Bakterien), die vorherrschende Wachstumsphase und vieles mehr. Die Initiative, VOC über Bakterien zu analysieren, wurde aufgrund der charakteristischen Gerüche vieler Bakterien- und Pilzspezies entwickelt, Beispiele dafür sind *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas* species (spp.), *Serratia* spp. und *Enterobacter* spp. (Larsson et al. 1978, Schöller et al. 1997).

Volatile Substanzen, die von Mikroorganismen gebildet werden, werden i. d. R. mithilfe eines experimentellen Aufbaus im Labor analysiert. Die qualitativen und quantitativen Unterschiede der VOC im Headspace der verschiedenen Bakterienspezies führte dazu, Bakterienspezies-spezifische VOC-Profile definieren zu wollen, selbst von Bakterien, die für den menschlichen Geruchssinn keine merkliche Charakteristik aufweisen. Dabei stützte man sich zunächst auf das Analyseverfahren der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) (Cox und Parker 1979, Labows et al. 1980, Zechman et al. 1986, Julak et al. 2000, Elgaali et al. 2002, Lechner et al. 2005, Wood et al. 2006, Filipiak et al. 2012a, Nawrath et al. 2012). Später nutzte man „realtime“-Messmethoden (Online-Analytik) wie bspw. die Protonen Transfer Reaktions-Massenspektrometrie (PTR-MS) (Critchley et al. 2004, Bunge et al. 2008, Crespo et al. 2012, Romano et al. 2015), Selected Ion Flow Tube-Massenspektrometrie (SIFT-MS) (Carroll et al. 2005, Allardyce et al. 2006b, Scotter et al. 2006, McNerney et al. 2012) oder Ionen Mobilitäts Spektroskopie (IMS) (Junger et al. 2012, Purkhart et al. 2017). Vor allem Ergebnisse von unmittelbar verfügbaren Echtzeitanalysen lenkten die Aufmerksamkeit der Forschung auf das diagnostische Potential der mikrobiellen VOC (Probert et al. 2004, Lechner et al. 2005). Methodische Einflussfaktoren, wie z. B. die Art des Kulturmediums (Scotter et al. 2005, O'Hara und Mayhew 2009, Ratiu et al. 2017) mit eventuell bakteriziden bzw. bakteriostatischen Inhaltsstoffen (Allardyce et al. 2006a, Buszewski et al. 2018), die Bakteriendichte des Inokulates (Allardyce et al. 2006b, Bunge et al. 2008, O'Hara und Mayhew 2009) und der Wachstumsrate traten dabei immer mehr in den Focus. Aufgrund der Vielzahl an methodischen und biologischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil, wurde bisher noch kein mikrobielles Markersset zweifelsfrei identifiziert.

2.2.3 Von tierischen bzw. menschlichen Organismen emittierte VOC

Die biochemisch-medizinische Forschung beschäftigt sich momentan intensiv mit der Bedeutung von VOC im Alveolargas. Diese werden als potentielle Biomarker von klinischer Relevanz sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin betrachtet (Miekisch et al. 2004, Ahmed et al. 2017).

Über die Herkunft der VOC im Atemgas werden zwei Hypothesen angenommen. Zum einen wird diskutiert, dass die volatilen Substanzen aus den Atemwegen direkt stammen und somit Hinweise auf respiratorische Erkrankungen oder Infektionen geben können. Zum anderen wird postuliert, dass die volatilen Zielsubstanzen aus dem Blut des Testorganismus stammen, welches die Lungen durchströmt. Dabei können die VOC über die Blut-Luft-Schranke je nach Polarität, Fettlöslichkeit und Volatilität der Substanzen in das Alveolargas übertreten, (Abbott et al. 2003). Somit können diese Substanzen bezüglich ihrer Konzentration und Zusammensetzung wichtige Informationen über metabolische und pathologische Zustände im Körper liefern (Miekisch und Schubert 2006, Amann et al. 2014b). Neben den bereits etablierten Atemtests (siehe Abschnitt 2.2.1 Historischer Überblick) zeigen weitere Studien das diagnostische Potential von VOC im Atem von Patienten mit verschiedenen Tumoren (Phillips

et al. 1999, Altomare et al. 2013, Handa et al. 2014, Queralto et al. 2014), diversen Organerkrankungen (Chen et al. 1970, Tangerman et al. 1983, Sehnert et al. 2002), aber auch Infektionen (Phillips et al. 2007, Purkhart et al. 2011, Sethi et al. 2013, Filipiak et al. 2015). VOC werden natürlich auch von Urin, Fäzes, Haut, Sputum, Blut, Serum, Eiter, Aspirat, Gewebe etc. emittiert (Amann et al. 2014b, Turner 2016). Somit ist es auch denkbar, dass für die Diagnostik bestimmter Erkrankungen andere Probenmatrices für eine Analyse von VOC als geeigneter erscheinen (z. B. Fäzes bei gastrointestinalen Erkrankungen). Allerdings hat das Atemgas eine Reihe von Vorteilen, und zwar ist das Probegas jederzeit verfügbar und die Messung erfolgt nicht-invasiv, ist unbegrenzt wiederholbar und kontinuierlich durchführbar.

Um VOC im Atemgas potentiell diagnostisch nutzen zu können, müssen Einflussfaktoren auf die Substanz-Konzentration abgeklärt werden (Manolis 1983). Mithilfe von einigen Studien in der Humanmedizin wurden bereits endogene Faktoren wie die Mundatmung im Gegensatz zur Nasenatmung (Sukul et al. 2017a), ein unterschiedliches FEV₁ (forced expiratory volume in einer Sekunde) (Sukul et al. 2016), das Luftanhalten (Sukul et al. 2014) sowie andere Atemmanöver (Thekedar et al. 2011), der Atemwiderstand (Sukul et al. 2017b), die Körperposition (Sukul et al. 2015), das Alter (Taucher et al. 1997, Spanel et al. 2007) und körperliche Arbeit (King et al. 2009) untersucht und deren Einfluss auf bestimmte VOC gezeigt. Auch der Einfluss exogener Faktoren wie z. B. das Rauchen (Gaida et al. 2016) und eine bestimmte Diät bzw. Ernährung (Crofford et al. 1977, Lindinger et al. 1997, Baranska et al. 2013, Raninen et al. 2016), wurden erforscht. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen an Tieren bezüglich der Einflussfaktoren auf die Atemgasmessung in der Veterinärmedizin (Kistler et al. 2014, Fischer et al. 2015a, Fischer et al. 2015b).

2.2.4 Analyse von VOC

Prinzipiell unterscheidet man zwei zugrundeliegende Abläufe: zum einen das Analysieren von Sammelgasproben im Labor (Offline-Analyse) und zum anderen die Online-Messung, welche durch direkte Analyse in Echtzeit unmittelbar verfügbare Ergebnisse liefert.

Das Probegas kann entweder in Gaskanistern oder –beuteln (z. B. Tedlar-Bags) gesammelt werden oder mithilfe von mit Adsorptionsmaterial gepackten Kanülen, Röhrchen etc. vor der Analyse aufkonzentriert werden. Das Aufkonzentrieren ist vorteilhaft, da VOC in niedrigen Konzentrationen im ppbV (parts per billion by volume; entspricht 10⁻⁷ Vol.-%) oder pptV (parts per trillion by volume; entspricht 10⁻¹⁰ Vol.-%) Bereich vorliegen (Libardoni et al. 2006, Trefz et al. 2012). Dafür stehen verschiedene technische Lösungen zur Verfügung. Zum einen existieren die Extraktions-basierten Techniken, wie z. B. mit organischem Polymer gepackte Tenax Röhrchen (Tangerman et al. 1983, Tonzetich et al. 1991, Ghittori et al. 2004, Alonso et al. 2011) und verschiedene Graphite, Kohlenstoff-Molekularsiebbetten und synthetische Polymere, welche in unterschiedlichen Zusammensetzungen in ‚needle trap devices‘ (NTD) Verwendung finden (Mieth et al. 2009, Alonso et al. 2011, Trefz et al. 2012, Trefz et al. 2013b). Zum anderen kommen Verteilungs-basierte Techniken zur Anwendung, wie z. B. ‚solid phase micro extraction‘ (SPME), welche ähnliche Adsorbentien wie die NTD enthalten (Grote und Pawliszyn 1997, Saba et al. 1999, Smith 2003). Die aufkonzentrierten Substanzen müssen im Anschluss in sogenannten Offline-Systemen, also im Labor, analysiert werden, z. B. mittels GC-MS (Awano et al. 2004, Miekisch et al. 2004, Amann und Smith 2005) oder SIFT-MS (Diskin et al. 2003b, Diskin et al. 2003a, Smith und Spanel 2005, Spanel et al. 2005).

In der Humanmedizin findet auch eine Vielzahl an Online-Analysetechniken Anwendung, bei denen die Ergebnisse in Echtzeit und kontinuierlich verfügbar sind. Das sind Laser-basierte spektroskopische Techniken (Risby und Sehnert 1999, Studer et al. 2001, Sehnert et al. 2002), unspezifische Laser, wie z. B. elektronische Nasen (E-nose) (Groves und Zellers 2001,

Di Natale et al. 2003, Mohamed et al. 2003, Machado et al. 2005), IMS (Baumbach 2006) und PTR-MS (Harrison et al. 2003, Lirk et al. 2003, Moser et al. 2005).

Einige Autoren beschreiben Atemgasanalysen an Mäusen (Vautz et al. 2010, Zhu et al. 2013, Szymczak et al. 2014) und Schweinen (Kamysek et al. 2011), welche in experimentellen Studien als repräsentativ für die Humanmedizin angesehen werden, und in denen mit anästhesierten und intubierten Tieren gearbeitet wird. Darüber hinaus gibt es einige etablierte Modelle, die mithilfe von Analysetechniken nicht anästhesierte Tiere beproben (Studie 4 Table 1). Die meisten dieser Studien fokussieren Atemgas, aber einige auch emittierte VOC des gesamten Organismus, in dem die Tiere in einer Umweltkammer beprobt werden (Spinhirne et al. 2004, Kistler et al. 2014, Kistler et al. 2016).

Auch bei *In-vitro*-Studien finden die Online-Techniken zunehmend Anwendung, da vor allem die Wachstumskinetik der Bakterien hier besser nachvollzogen werden kann (Bunge et al. 2008). Allgemein ist zu bemerken, dass - ungeachtet des Probegases oder der Analysetechnik - eine eindeutige Identifikation der Substanzen das Ziel sein sollte, die wenn nötig mithilfe einer anderen Analysetechnik, wie z.B. GC-MS (Lindinger et al. 2005), und Referenzsubstanzen validiert werden sollte.

Die vielen Möglichkeiten der Analyse von VOC bedingen eine fehlende Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der bislang produzierten Forschungsergebnisse (Brodrick et al. 2015).

Eigene Untersuchungen

Bei der Nutzung der VOC-Analyse als potentielle diagnostische Methode sowohl im Headspace von Bakterienkulturen als auch im Atemgas kommt es auf ein detailliertes Verständnis der Herkunft von VOC im zu beprobenden Gas an um Biomarker sicher nutzen zu können. Dabei müssen sowohl biologische (physiologische), methodische und technische Einflussfaktoren untersucht als auch die genauen metabolischen Prozesse, aus denen VOC resultieren, verstanden werden.

Die Literatur wies vor Beginn der eigenen Untersuchungen nur eine Studie zu VOC im Headspace von MAP auf (Trefz et al. 2013a). Durch den speziellen Aufbau der Zellwand von Mykobakterien, d. h. den hohen Anteil an Mykolsäuren, ist eine Abgrenzung des VOC-Profiles von Mykobakterien zu anderen Bakterienspezies vielversprechend. Allerdings unterliegt die Analyse von VOC über Mykobakterien aufgrund der langen Inkubationszeiten, der hohen Nährsubstratansprüche und der damit verbundenen aufwendigen Probenvorbereitung besonderen Schwierigkeiten. Diese Aspekte machen eine Untersuchung von biologischen, methodischen und technischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil notwendig um ein robustes MAP-spezifisches VOC-Profil zu definieren und es von anderen Mykobakterien-Spezies und Bakterien-Gattungen abzugrenzen.

Des Weiteren gab es in der Literatur keine Berichte über eine VOC-Analytik im Atemgas adulter Rinder in Echtzeit. Außerdem fehlten für diese Tierart Untersuchungen zur Variabilität der VOC-Zusammensetzung im Atemgas.

2.3 Fragestellungen

Diesem Dissertationsvorhaben lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

1. Kann ein robustes VOC-Profil im Headspace von MAP definiert werden?
2. Welche biologischen, methodischen und technischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil sind zu beachten um VOC im Headspace von MAP diagnostisch nutzen zu können?
3. Können Rückschlüsse auf die Herkunft der VOC im Headspace von MAP geschlossen werden?
4. Ist es möglich durch einen von uns entwickelten technischen Aufbau Online-Analysen von VOC im Atemgas von adulten Rindern unter Feldbedingungen durchzuführen?
5. Wie variabel ist das VOC-Profil im Atemgas von Rindern im Tagesverlauf?

2.4 Studiendesign

2.4.1 VOC-Analyse im Headspace von MAP [Studien 1-3]

In den Studien 1 und 2 wurden VOC im Headspace von MAP-Kulturen analysiert. Mithilfe definierter Inkubationsprotokolle sowie standardisierter VOC-Analyse wurden die Einflüsse biologischer und methodischer Faktoren auf die ermittelten VOC-Profile evaluiert (Tab. 1). Studie 1 bezog sich auf den Einfluss des Nährmediums, der Inkubationszeit und der Bakteriendichte im Inokulat. Studie 2 beschäftigte sich mit biologischen Einflussfaktoren, insbesondere der Abgrenzung verschiedener Mykobakterien untereinander mithilfe des VOC-Profiles.

Studie 3 entsprach einer Meta-Analyse, in die alle zuvor über MAP-Kulturen publizierten VOC-Daten einbezogen wurden (Trefz et al. 2013a sowie Studien 1 und 2). Es galt zu prüfen, ob aus der übergreifenden Betrachtung ein robustes VOC-Profil definiert werden kann, das mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein kulturelles Wachstum von MAP indikativ ist.

Tab. 1: Versuchsaufbau der Studien zur VOC-Analytik im Headspace von MAP.

	Studie 1	Studie 2
Verwendete Stämme	3 MAP Stämme	2 MAP Stämme, 12 weitere Mykobakterien-Spezies (15 versch. Stämme)
Nährmedium	Herrold's Egg Yolk Medium, 4 weitere Nährmedien	Herrold's Egg Yolk Medium
Inkubations-temperatur	37°C	37°C (und 30°C bei <i>M. marinum</i>)
Inkubationsdauer	2, 4 und 6 Wochen	2, 3 oder 4 Wochen (je nach Spezies)
Inokulat	Ausgangslösung und Verdünnungen in 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6}	Ausgangslösung
Methode zur Aufkonzentrierung	needle trap micro extraction	needle trap micro extraction
VOC-Analyse	GC-MS	GC-MS
Identifikation der Substanzen	NIST 2005 Gatesburg und Analyse entsprechender Referenzsubstanzen	NIST 2005 Gatesburg und Analyse entsprechender Referenzsubstanzen

VOC: volatile organic compound, MAP: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, GC-MS: gas chromatography – mass spectrometry

2.4.2 VOC-Analyse im Atemgas von Rindern [Studie 4]

Nachdem eine technische Lösung etabliert wurde, um an adulten Rindern unter Feldbedingungen Atemgasanalysen in Echtzeit (Online-Analytik) durchzuführen (Abb. 3), wurde die Messtechnik an 83 klinisch unauffälligen adulten Rindern getestet. Die Tiere stammten aus acht verschiedenen Milchviehherden und repräsentierten jeweils alle Laktationsstadien (Frischmelker mit Hochleistung bis Altmelker). Es erfolgte keine Vorauswahl der Rinder nach tierbezogenen Parametern und somit wiesen die Tiere zum Zeitpunkt der VOC-Messungen ein Alter von 27-115 Monaten, BCS (body condition scores) von 1,25-4,0 und Atemfrequenzen zwischen 11-52 Atemzügen/min auf. Alle Tiere wurden zweimal im Abstand von 7 Tagen für jeweils 3 min beprobt. Dabei waren sie mit dem Kopf im Fressgitter fixiert und standen betriebsbedingt entweder auf Vollspalten- oder geschlossenem Boden. Um eine mögliche Kontaminationsgefahr der Atemgasproben durch die Umgebungsluft (betriebsspezifische Einflüsse durch Gülle, Futtermittel, Stalltechnik, etc.) abschätzen zu können, wurden stets zusätzlich Proben der Umgebungsluft analysiert. Letztere wurden zum Beispiel in Kopfhöhe der Tiere sowie in Nähe des Güllekanals und in geeigneter Entfernung von diesem gewonnen.



Abb. 3: Aufbau einer Atemgasanalyse in Echtzeit bei adulten Rindern.

Um zusätzlich Informationen über die Variabilität von VOC-Analysen im Atemgas ein und desselben Tieres im Tagesverlauf zu gewinnen, wurden 2 Rinder im Alter von 5-6 Monaten aus dem Versuchstierbestand des Friedrich-Loeffler-Instituts in Studie 4 einbezogen. Die Einflüsse von Tageszeit und Futteraufnahme wurden evaluiert, indem insgesamt sechs Atemgasanalysen je Tier und Tag im Abstand von jeweils zwei Stunden durchgeführt wurden. Die Tiere standen auf Stroh, hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Heu und erhielten direkt im Anschluss an die erste und vierte VOC-Messung jeweils 50 g Kraftfutter. Um die erhaltenen Ergebnisse auf Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde die Versuchsdurchführung an beiden Tieren in identischer Weise eine Woche später wiederholt.

3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form folgender publizierter Originalarbeiten.

STUDIE 1:

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold und Heike Köhler (2016):
Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Journal of Breath Research 10 (3): e037103

<http://dx.doi.org/10.1088/1752-7155/10/3/037103>

STUDIE 2:

Anne Küntzel, Peter Oertel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Phillip Trefz, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch, Petra Reinhold und Heike Köhler (2018):
Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species.

PLoS One 13 (3): e0194348

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0194348>

STUDIE 3:

Anne Küntzel, Michael Weber, Peter Gierschner, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold und Heike Köhler:

Core profile of volatile organic compounds related to growth of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* – a comparative extract of three independent *in vitro* studies.

PLoS One (submitted)

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221031>

STUDIE 4:

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler und Petra Reinhold (2018):

Animal science meets agricultural practice: Preliminary results of an innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions.

Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 2018 (7-8): 444-452

<http://dx.doi.org/10.2376/0005-9366-17101>

3.1 STUDIE 1:

Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Autoren: **Anne Küntzel**, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold und Heike Köhler

Jahr: 2016

Zeitschrift: Journal of Breath Research 10 (3): e037103

PMID: 27604146

DOI: 10.1088/1752-7155/10/3/037103

Persönlicher Beitrag zur Umsetzung:

- Durchführung der experimentellen Untersuchungen
 - Beteiligung an der Vorbereitung der Bakterieninokulate (Anreicherung, Keimzahlbestimmung)
 - Beteiligung an der Inokulation der Probenröhrchen
 - Beteiligung am Erheben der Ergebnisse und Auswertung der kulturellen Anzucht der Bakterien
 - Beteiligung an der Probenaufarbeitung und Analyse der VOC
- Erfassung und statistische Auswertung der Daten
- Entwurf des Manuskripts inklusive der Abbildungen und Tabellen

Zusammenfassung

Zielstellung: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose der Wiederkäuer. Diese Erkrankung geht mit einer chronischen granulomatösen Enteritis einher. Die diagnostische Methode der Wahl ist der direkte Erregernachweis mittels kultureller Anzucht von MAP, welche sehr langwierig und arbeitsintensiv ist. Ein MAP-spezifisches Profil aus flüchtigen organischen Substanzen (VOC) im Headspace von MAP-Kulturen könnte diese diagnostische Maßnahme beschleunigen. Das Ziel dieser Studie war es, das VOC-Profil von MAP-Kulturen in Bezug zur Wachstumskinetik der Bakterien zu untersuchen.

Methodik: Dabei wurde das Inkubationsprotokoll wie folgt definiert: fünf verschiedene Kulturmedien, drei verschiedene MAP-Stämme, Inokulate mit je vier Verdünnungsstufen, drei verschiedene Inkubationszeiten (Details sind in Originalarbeit aufgeführt – vgl. Studie 1). Zur Probenaufarbeitung wurden die VOC mittels needle trap micro extraction (NTME) aufkonzentriert und anschließend mit Gaschromatographie-Massenspektroskopie analysiert.

Die volatilen Substanzen wurden mit Hilfe der Analyse reiner Referenzsubstanzen verifiziert und kalibriert.

Ergebnisse: Im Headspace sowohl der mit MAP inokulierten Kulturröhrchen als auch der Kontrollröhrchen wurden jeweils über 100 VOC gemessen. Das VOC-Profil wies erhebliche Unterschiede über den fünf verschiedenen Kulturmedien auf, wobei gut zwischen Ei-haltigen und synthetischen Medien differenziert werden konnte. Als potentielle Biomarker für MAP auf Herrold‘ Egg Yolk Medium konnten 43 Substanzen identifiziert werden, die zwischen den drei MAP-Stämmen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Diese Substanzen gehörten den chemischen Klassen der Alkohole, Aldehyde, Ester, Ketone, aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffe an. Mit ansteigender Bakteriendichte auf der Medienoberfläche zeichneten sich 3 sich unterscheidende Konzentrationsverläufe der VOC ab: Konzentrationsanstieg mit Sättigung, Konzentrationsanstieg ohne Sättigung, und Konzentrationsabfall.

Schlussfolgerungen: Die Untersuchungsergebnisse stützen die Hypothesen, dass (i) ein und dasselbe Bakterium auf unterschiedlichen Kulturmedien verschiedene Substanzen emittiert; (ii) verschiedene MAP-Stämme ein einheitliches VOC-Profil aufzeigen können; und (iii) der direkte Erregernachweis mittels kultureller Anzucht mit Hilfe von VOC-Profilen beschleunigt werden kann.

3.2 STUDIE 2:

Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species.

Autoren: **Anne Küntzel**, Peter Oertel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Phillip Trefz, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch, Petra Reinhold und Heike Köhler

Jahr: 2018

Zeitschrift: PLoS One 13 (3): e0194348

PMID: 29558492

DOI: 10.1371/journal.pone.0194348

Persönlicher Beitrag zur Umsetzung:

- Durchführung der experimentellen Untersuchungen
 - Vorbereitung der Bakterieninokulate (Anreicherung, Keimzahlbestimmung)
 - Inokulation der Probenröhrchen
 - Erheben der Ergebnisse und Auswertung der kulturellen Anzucht der Bakterien
 - Beteiligung an der Probenaufarbeitung und Analyse der VOC
- Erfassung und statistische Auswertung der Daten
- Entwurf des Manuskripts inklusive der Abbildungen und Tabellen

Zusammenfassung

Zielstellung: Spezies der Familie Mycobacteriaceae können bei den meisten Säugetieren ernsthafte zoonotische Erkrankungen verursachen. *Mycobacterium (M.) tuberculosis* ist der Erreger der Tuberkulose des Menschen, kann aber auch auf Tiere übertragen werden (z. B. Hunde, Papageienspezies oder Elefanten). *M. bovis* und *M. caprae* verursachen primär Tuberkulose bei Wiederkäuern, können jedoch auch analoge Erkrankungen beim Menschen verursachen. Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) sind unter anderem mit Atemwegserkrankungen, Lymphknotenentzündungen, Hauterkrankungen oder Systemerkrankungen assoziiert. Die momentane Methode der Wahl zur Diagnostik und Identifizierung der jeweiligen *Mycobacterium*-Spezies ist der direkte Erregernachweis mittels kultureller Anzucht, mit einer nachfolgenden Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Analyse von flüchtigen organischen Substanzen (VOC, volatile organic compounds) in der Gasphase über Bakterienkulturen stellt einen vielversprechenden methodischen Ansatz zur Beschleunigung der Diagnostik und Identifikation des Bakteriewachstums dar. Das Ziel dieser Studie bestand darin, die VOC im Headspace von 13 verschiedenen Mykobakterien-Spezies zu analysieren, Spezies-spezifische VOC-Profile zu definieren und eine Auswahl an Substanzen zusammenzustellen, die das Vorhandensein von wachsenden Mykobakterien anzeigen.

Methodik: Die Analyse der VOC erfolgte im Headspace von 17 verschiedenen Mykobakterienstämmen, welche alle auf Herrold's Egg Yolk Medium inkubiert wurden, sowie über nicht-inokulierten Kontrollmedien. Die Aufkonzentrierung der Substanzen erfolgte mittels needle trap micro extraction, die nachfolgende Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie. Alle detektierbaren VOC wurden mithilfe reiner Referenzsubstanzen identifiziert und quantifiziert.

Ergebnisse: Sowohl in den inokulierten als auch in den Kontrollröhrchen wurden jeweils über 130 Substanzen detektiert. Signifikante Substanzemissionen wiesen all die Röhrchen auf, in denen ein gutes bakterielles Wachstum zu verzeichnen war. Aber auch die Röhrchen ohne optisch sichtbares Bakterienwachstum zeigten Konzentrationsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollröhrchen. Die VOC über den mykobakteriellen Kulturen konnten eingruppiert werden in Substanzen, deren Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollmedien entweder höher-gleich konzentriert, niedriger-gleich oder sowohl höher als auch niedriger konzentriert waren. Insgesamt konnten 17 Substanzen identifiziert werden, die sich über allen Mykobakterien-Spezies gleich verhielten und somit das Vorhandensein von wachsenden Mykobakterien anzeigten. Außerdem unterschieden sich die VOC-Profile der verschiedenen Mykobakterien-Spezies zum einen anhand von Substanzen mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationsleveln und zum anderen anhand von Substanzen mit unterschiedlichen Tendenzen vergleichend zu den Kontrollröhrchen.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse dieser Studie führten zu definierten Spezies-spezifischen VOC-Profilen all derer Mykobakterien-Spezies (n=11), die optisch erkennbares Wachstum aufwiesen.

3.3 Studie 3: Core profile of volatile organic compounds related to growth of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* – a comparative extract of three independent *in vitro* studies.

Autoren: **Anne Küntzel**, Michael Weber, Peter Gierschner, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold und Heike Köhler

Jahr: submitted

Zeitschrift: PLoS One

Persönlicher Beitrag zur Umsetzung:

- Erfassung und statistische Auswertung der Original-Daten in den Studien 1 und 2
- Mitarbeit bei der statistischen Analyse
- Entwurf des Manuskripts inklusive der Abbildungen und Tabellen

Zusammenfassung

Zielstellung: Die Analyse von flüchtigen organischen Substanzen (volatile organic compounds, VOC) im Gasraum über Bakterienkulturen wird als eine neue vielversprechende Möglichkeit betrachtet, um das Wachstum von langsam wachsenden Bakterien schneller erkennen zu können als dies durch eine visuelle Kontrolle möglich ist. Für eine praktische Anwendung von VOC als Diagnostikum muss das Substanz-Profil robust sein, d. h. es sollte unter verschiedenen Kulturbedingungen reproduzierbar sein. Das Ziel dieser meta-analytischen Betrachtungen bestand darin, ein VOC-Profil für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), den Erreger der Paratuberkulose, zu definieren, welches so robust ist, dass es sich unter verschiedenen *In-vitro*-Bedingungen reproduzieren lässt.

Methodik: Hierfür wurden die Ergebnisse von drei separat durchgeführten und voneinander unabhängigen Studien zum VOC-Profil über MAP mithilfe von zwei statistischen Ansätzen analysiert: a) eine beschreibende Analyse, welche die drei individuellen VOC-Profile betrachtete und verglich und b) eine meta-statistische Analyse mit gebündelten und standardisierten Werten von allen drei Studien.

Ergebnisse: Aus der meta-statistischen Analyse resultierten 30 Substanzen, welche sich (vergleichend zu den Kontrollröhrchen) als signifikant für MAP erwiesen. Nachdem Substanzen, die in den Studien unterschiedliche Tendenzen aufwiesen, ausgeschlossen wurden, konnte ein Core-Profil von 28 VOC definiert werden, welches indikativ für das Wachstum von MAP ist. Die Konzentrationen von vier dieser Substanzen fielen im Vergleich zu den Kontrollröhrchen ab während 24 Substanzen in ihrer Konzentration anstiegen.

Schlussfolgerung: Die Robustheit dieses Core-VOC-Profiles für MAP wurde durch die Anwendung von zwei verschiedenen statistischen Analyseverfahren erhärtet.

3.4 STUDIE 4:

Animal science meets agricultural practice: *Preliminary results of an innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions.*

Angewandte Versuchstierkunde unter den Bedingungen landwirtschaftlicher Praxis: *Erste Ergebnisse einer unter Feldbedingungen anwendbaren technischen Lösung zur Analyse von Atemgas bei Rindern.*

Autoren: **Anne Küntzel**, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler und Petra Reinhold

Jahr: 2018

Zeitschrift: Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 2018 (7-8): 444-452

DOI: 10.2376/0005-9366-17101

Persönlicher Beitrag zur Umsetzung:

- Durchführung der VOC-Analysen an Rindern
- Durchführung folgender ergänzenden Untersuchungen:
 - Klinische Befundung der Rinder
 - Gewinnung und Aufbereitung von Atemgas- und Raumluftproben
 - Beteiligung an der Analyse der VOC
- Erfassung und statistische Auswertung der Daten
- Entwurf des Manuskripts inklusive der Abbildungen und Tabellen

Eine deutschsprachige Zusammenfassung ist in der Originalpublikation enthalten.

4 Diskussion

4.1 Validität und Relevanz der *In-vitro*-Studien

Die VOC-Analyse über Bakterienkulturen ermöglicht das Detektieren bakteriellen Wachstums (Bos et al. 2013) und scheint Informationen über spezifische Stoffwechsellagen, wie beispielsweise Wachstumsphase, Umgang mit Stressoren und Nährstoffverfügbarkeit, zu liefern (O'Hara und Mayhew 2009, Ratiu et al. 2017, Rees et al. 2017b, Buszewski et al. 2018).

Sowohl im Headspace von MAP-Kulturen, als auch von Kontrollmedien konnten mehr als 100 flüchtige organische Substanzen gemessen und quantifiziert werden. Um eine Kontamination des Aufkonzentrierungsschrittes durch Umgebungsluft ausschließen zu können, wurden parallel zu jedem Messtag mehrere Raumluftproben genommen und analysiert. Detektierte VOC wurden lediglich einer weiterführenden Datenanalyse zugeführt, wenn die Konzentration der Substanz größer war als in der umgebenden Laborluft. Bakteriell Wachstum wurde angenommen, wenn die VOC-Konzentrationen im Headspace der Kulturen sich signifikant von denen der Kontrollmedien unterschieden. Dadurch konnten VOC-Profile für MAP (Studie 3) und für sonstige Mykobakterien-Spezies (Studie 2 Figure 5) definiert werden. Es wurde stets zwischen Substanzen unterschieden, die in den Gasphasen über den Bakterienkulturen niedriger oder höher konzentriert waren als in den Gasphasen über den unbeimpften Kulturmedien. Diese Unterscheidung ist konform zu anderen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen (Crespo et al. 2012, Filipiak et al. 2012a). Man geht einerseits davon aus, dass einige Substanzen im Medium vorhanden sind, welche als Nährsubstrat dienen und folglich während des Wachstums der Bakterien verbraucht werden (VOC-Konzentration über Bakterienkulturen niedriger als über Medium, Studie 1 Figure 6, Studie 2 Figure 3). Andererseits entstehen im Bakterienmetabolismus Substanzen, welche im Medium nicht oder in geringeren Konzentrationen zu finden sind (VOC-Konzentration über Bakterienkulturen höher als über Medium, Studie 1 Figure 6, Studie 2 Figure 3). Des Weiteren fielen Substanzen auf, die in bestimmten Phasen des bakteriellen Wachstums im Headspace über den bakteriellen Kulturen höher und zu anderen Phasen niedriger waren als über den Kontrollmedien (Studie 1 Figure 6). Diese können als mögliche Signalstoffe zur interbakteriellen Kommunikation (intra- oder intergenerisch) angesprochen werden, welche beispielsweise die Anpassung an die vorhandenen Wachstumsbedingungen anzeigen bzw. verbessern (Steinert 2014, Aussel et al. 2016).

Als eine Limitation unserer experimentellen Ansätze stellte sich heraus, dass die Wachstumskontrolle der inokulierten Röhrchen lediglich über eine visuelle Kontrolle erfolgte. Durch diese semi-quantitative Auswertung des bakteriellen Wachstums konnte kein direkter Vergleich von Substanzkonzentration und Keimzahl erfolgen. Eine andere Möglichkeit der Wachstumskontrolle wäre das Abspülen der Agaroberfläche mit anschließender PCR gewesen; allerdings wären dort auch nicht teilungsfähige MAP als positives Ergebnis erschienen, so dass eine Beziehung zwischen Keimzahl und VOC-Konzentration ebenfalls fraglich geblieben wäre.

4.1.1 Studienübergreifendes MAP-anzeigendes VOC-Profil

Aus dem in dieser Dissertationschrift beschriebenen Vorgehen der Datenauswertung ergaben sich studienübergreifende Übereinstimmungen der einzelnen VOC-Profile über MAP-Kulturen. Die Anzahl der VOC, welche als indikativ für ein Wachstum von MAP auffielen, unterschied sich zwischen den Studien 1 und 2. Die Ergebnisse differierten auch im Vergleich zu einer Studie aus der vorhergehenden Projektphase (Trefz et al. 2013a, Anlage 1), welche einen vergleichbaren Studienaufbau aufwies. Um ein allgemeingültiges und robustes VOC-

Profil für MAP-Wachstum zu definieren, wurden studienübergreifend verschiedene meta-analytische Ansätze angewandt (Studie 3). Dieser Ansatz hat Neuheitswert, denn für kein anderes bakterielles VOC-Profil sind bislang in der Literatur studienübergreifende Betrachtungen bzw. Analysen zur Reproduzierbarkeit publizierter VOC-Daten beschrieben.

Die studienübergreifenden Betrachtungen in Studie 3 stützte sich auf zwei methodische Ansätze: Zum einen wurden die Ergebnisse von drei Einzelstudien gegenübergestellt und verglichen (beschreibende Analyse) und zum anderen wurde eine Signifikanzberechnung auf gebündelten Daten aus allen 3 Studien durchgeführt, die jeweils auf den Maximalwert der jeweiligen Substanz pro Studie normalisiert wurden (meta-statistische Analyse).

Mithilfe dieser beiden analytischen Betrachtungen konnte ein Kernprofil aus 28 volatilen Substanzen extrahiert werden, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit indikativ für MAP-Wachstum *in vitro* ist, und welches nachfolgend als „Core-VOC-Profil“ für MAP bezeichnet wird (Studie 3 Table 4). Die beschreibende Analyse betrachtete Substanzen, die in mindestens zwei der drei Studien auftraten, und prüfte die Tendenzen der Substanzkonzentrationen vergleichend zu den Kontrollröhrchen. Die meta-statistische Analyse umfasste alle Messwerte aller drei Studien und ermöglichte aufgrund des größeren Probenumfangs eine größere statistische Power. Allerdings wird letzterer Ansatz durch die Variabilität der Messwerte zwischen den drei Studien negativ beeinflusst. Dem wurde mithilfe einer Standardisierung der Werte und der nachfolgenden Anwendung Rang-basierter Hypothesen-Tests entgegengewirkt.

Obwohl das in Studie 3 vorgeschlagene „Core-VOC-Profil“ mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Wachstum von MAP hinweist, ist dessen Zusammensetzung keineswegs starr, sondern kann aufgrund nicht standardisierbarer Eigenschaften des Mediums variieren. In diesem Zusammenhang ist die Variabilität des Nährmediums aufgrund unterschiedlicher Chargen und des Alters zu nennen. Herrold's Egg Yolk Medium ist kein rein synthetisches Medium, sondern beinhaltet Eigelb, welches in der Zusammensetzung in den unterschiedlichen Chargen Schwankungen unterliegt. Des Weiteren kann bei natürlichen Zutaten der Nährmedien die Alterung und Zersetzung gewisser Inhaltsstoffe nicht ausgeschlossen werden. Es ist auch bei zukünftigen Studien davon auszugehen, dass Variationen der Zusammensetzung des Nährmediums das VOC-Profil sowohl quantitativ als auch qualitativ beeinflussen werden (weitere Ausführungen hierzu unter Abschnitt 5.1.2.2 Methodische Einflussfaktoren).

Des Weiteren ist bei einer potentiellen diagnostischen Nutzung der VOC-Analytik über MAP-Kulturen die Keimzahl des Inokulates nicht beeinflussbar und wirkt somit ebenfalls als Variabilitätsfaktor auf das VOC-Profil. Nach unseren Erkenntnissen ist die Bakteriendichte, die aus der Keimzahl des Inokulates und der Inkubationsdauer resultiert, vermutlich als der bedeutendste quantitative Einflussfaktor auf das VOC-Profil anzusehen (weitere Ausführungen hierzu unter Abschnitt 5.1.2.2 Methodische Einflussfaktoren). Allerdings wiesen die im Core-Profil zusammengefassten 28 Substanzen in allen 3 Einzelstudien dieselbe Tendenz auf (Studie 3 Table 2), was auf eine Robustheit der Ergebnisse hinweist.

Die unterschiedlichen Techniken zur präanalytischen Konzentrierung der VOC, die in den verschiedenen Einzelstudien zum Einsatz kamen, erklären weitere, vor allem qualitative, Unterschiede der einzelnen VOC-Profile. Der Hauptunterschied zwischen SPME und NTME ist die unterschiedlich hohe Schwelle der Nachweisgrenze (limit of detection) der einzelnen VOC. Das hatte zur Folge, dass – je nach Methodik der Präkonzentration - einige in unseren Betrachtungen relevant erscheinenden Substanzen nur in sehr hohen Konzentrationen oder gar nicht detektierbar waren. Im Falle der Nutzung von SPME betraf dies die Substanzen Methylcyclopentane, alle Alkohole (3-Octanol), 2-Methyl-2-butenal, Heptanal, Benzene, 3-Methylfuran und 2-Butanone und bei Nutzung von NTME die Substanzen Methylacetate und

2-Methylfuran. Für eine potentielle diagnostische Nutzung der VOC-Analytik ergibt sich folglich die unbedingte Notwendigkeit der Standardisierung des Protokolls der Präanalytik (vgl. 5.1.2.3 Technische Einflussfaktoren).

4.1.2 VOC als diagnostischer Ansatz

Um VOC als potentielle Biomarker in der *In-vitro*-Diagnostik nutzen zu können, sollten sie möglichst unabhängig von methodischen Einflussfaktoren sein, wie z. B. Nährsubstrat, Bakteriendichte, Inkubationsprotokoll und VOC-Analyse-Verfahren. Ist dies nicht möglich, empfiehlt sich die Definition von bestimmten Standardbedingungen. Biologische Einflussfaktoren hingegen können in der Diagnostik hilfreich sein, beispielsweise bei der Speziesidentifizierung.

4.1.2.1 Biologische Einflussfaktoren

In den Studien 1 und 2 wurde mit 3 bzw. 2 verschiedenen MAP-Stämmen gearbeitet. Diese umfassten jeweils einen Referenzstamm (Typ II, 44133 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), einen Feldstamm (Typ II) aus einer Rinderkotprobe (nur Studie 1) und einen Feldstamm (Typ III), welcher aus einer Kotprobe eines Schafes gewonnen worden war. In beiden Studien wurden für die meisten VOC des jeweiligen MAP-Profiles (Studie 1: 35 von 43 VOC, Studie 2: 34 von 34 VOC) keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen MAP-Stämmen festgestellt. Zusätzlich wurden in Studie 2 jeweils 2 Stämme von *M. avium* ssp. *avium* (MAA), *M. avium* ssp. *hominissuis* (MAH) und *M. intracellulare* (MI) der VOC-Analyse zugeführt. Auch für diese Spezies zeigt der Großteil der Substanzen des Spezies-spezifischen VOC-Profiles keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen auf (MAA: 18 von 27 VOC, MAH: 18 von 24 VOC, MI: 24 von 38 VOC, vgl. Studie 2 Table 3). Ähnliche Ergebnisse findet man auch in der Literatur, bspw. für *Pseudomonas aeruginosa* (Zscheppank et al. 2014). Für eine mögliche methodische Erklärung für die wenigen Substanzen, die sich zwischen den Stämmen einer Bakterienspezies unterscheiden, könnte die tatsächliche Bakteriendichte herangezogen werden. Die Keimzahlen der Inokulate wurden lediglich durch das Einstellen der optischen Dichte ($0,306 \pm 0,02$) angeglichen, woraus zwischen den Stämmen geringe Unterschiede bezüglich der Keimzahl des jeweiligen Inokulates resultierten (Studie 2 Table 1). Des Weiteren wurde zum Zeitpunkt der VOC-Analyse das Wachstum lediglich optisch semi-quantitativ bewertet. Das hatte zur Folge, dass wir die exakte Bakteriendichte auf dem Medium zum Zeitpunkt der VOC-Analyse nicht kannten und daher quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen einer Spezies nicht in Beziehung zueinander setzen konnten.

Laut Studie 2 ergaben sich Spezies-spezifische VOC-Profile von elf verschiedenen Mykobakterien-Spezies (Studie 2 Figure 5). Für die Spezies-spezifischen VOC-Profile betrachteten wir zum einen Substanzen, die nur über einzelnen Mykobakterien-Spezies messbar waren. Ein gutes Beispiel stellt Benzoesäuremethylester dar (Studie 2 File A1), welcher ausschließlich über Kulturen von MAA, MAH und *M. marinum* (Inkubation bei 37°C) messbar war. Zum anderen definierten wir Indikatorsubstanzen, welche über einer Spezies (im Vergleich zu allen anderen Spezies) nicht nur die signifikant höchste Konzentration aufwiesen, sondern für die auch galt, dass jeder einzelne Messwert aller Kulturröhrchen einer Spezies über den Messwerten aller Kulturröhrchen aller anderen Spezies lag (Studie 2 File A1). Darüberhinaus wurden je Spezies verschiedene Konzentrationslevel einer Substanz definiert, d. h., dass eine Substanz im Vergleich zum Kontrollmedium über verschiedenen Spezies um unterschiedlich große Faktoren ansteigt (Studie 2 File A1a-d).

Innerhalb der von uns definierten Spezies-spezifischen VOC-Profile für Mykobakterien wurden drei Konzentrations-Verläufe bzw. VOC-Eigenschaften akzeptiert: (a) Substanzen, deren Konzentration über den Bakterien signifikant höher war als im Headspace der unbeimpften Kontrollmedien, (b) Substanzen, deren Konzentration über den Bakterien signifikant niedriger war als im Headspace der unbeimpften Kontrollmedien, (c) Fehlen der Substanz, d.h. die Substanzkonzentration befand sich im Headspace über den Bakterien unterhalb der Nachweisgrenze, war aber in den Kontrollröhrchen nachweisbar. Diese komplexe Betrachtung war zuvor nicht in der Literatur beschrieben. Daher ist es schwierig, unsere Ergebnisse mit den im Schrifttum veröffentlichten Mykobakterienprofilen (Tabelle 3) zu vergleichen. Den von Crespo et al. (2012) beschriebenen Aceton-Anstieg über *M. smegmatis* (MS) konnten wir nicht bestätigen. Signifikant erhöhte Konzentrationen von 3-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-butanol, 2-Methyl-1-propanol und 2-Butanon über *M. bovis* BCG (McNerney et al. 2012) konnten wir mit unseren Messungen über *M. bovis* bestätigen. Zu der Studie von Mellors et al. (2017) gibt es keine durch uns zu bestätigenden Ergebnisse, beispielsweise werden einige Aldehyde mit signifikantem Anstieg über den Spezies genannt, welche in unserer Studie (im Vergleich zu den Kontrollmedien) prinzipiell absanken. Vergleichend zu den Ergebnissen von Nawrath et al. (2012), welche unter anderem auch die VOC über MAA und MS analysierte, konnte lediglich Hexanol als signifikant erhöht über MS bestätigt werden. Die geringen Übereinstimmungen unserer Ergebnisse vergleichend zu den in der internationalen Literatur beschriebenen Studien können zum einen durch unterschiedliche Inkubationsprotokolle (Tab. 3 Limitationen, vgl. 5.1.2.2 Methodische Einflussfaktoren), aber auch durch die verschiedenen VOC-Analyse-Techniken, die Anwendung fanden (Tab. 3 VOC-Analytik-Technik, 5.1.2.3 Technische Einflussfaktoren), erklärt werden.

Tab. 2: In der Literatur dokumentierte Untersuchungen zu VOC-Profilen im Headspace von verschiedenen Mykobakterien-Spezies.

Autor	Mykobakterien-Spezies	VOC-Analyse-Technik	Limitationen
Crespo et al. 2012	<i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. smegmatis</i>	PTR-MS, Tenax-GC-MS, teilweise Substanzidentifikation	
McNerney et al. 2012	<i>M. bovis</i> BCG, <i>M. smegmatis</i>	SIFT-MS, Tenax-GC-MS, teilweise Substanzidentifikation	Inkubation auf verschiedenen Medien, keine Angabe über Bakteriendichte
Mellors et al. 2017	<i>M. avium</i> , <i>M. bovis</i> BCG, <i>M. intracellulare</i> , <i>M. xenopi</i>	SPME-GCxGC-ToF-MS, teilweise Substanzidentifikation	keine Angabe über Bakteriendichte
Nawrath et al. 2012	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. aurum</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. aichiense</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. avium</i> spp. <i>avium</i> , <i>M. vaccae</i>	CLSA-GC-MS	Inkubation auf verschiedenen Medien, keine Angabe über Bakteriendichte
Purkhart et al. 2017	MAP	IMS, keine Substanzidentifikation	

PTR: proton transfer reaction, MS: Massenspektroskopie, GC: Gaschromatographie, SIFT: selected ion flow tube, SPME: solid phase microextraction, ToF: time of flight, CLSA: closed loop stripping analysis, IMS: Ionen Mobilitäts Spektroskopie

Interessanterweise ergaben unsere Untersuchungen, dass innerhalb der Familie der Mykobakterien 17 Substanzen ein ähnliches Konzentrationsverhalten über allen untersuchten Spezies aufwiesen, was für ein ‚übergreifendes‘ VOC-Profil für Mykobakterien spricht. Hiervon zeigten acht Substanzen (2-Methylpropanol, 2-Methylbutanol, Pentan, Heptan, Octan, 2,3-Butadion, 3-Pentanon und 3-Octanon) über allen Spezies einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrollröhrchen, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationsleveln. Im Gegensatz dazu sanken neun Substanzen (Acetaldehyd, Propanal, 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanal, Pentanal, Hexanal, Heptanal, Benzaldehyde, und 2-Methylpropanal) signifikant bis unter die Nachweisgrenze ab, die alle zur Klasse der Aldehyde zählten.

Für eine diagnostische Anwendbarkeit der VOC-Analytik im Gasraum von Bakterienkulturen ist eine hohe Spezifität der Biomarker zwingend notwendig. Eine Reihe von bislang identifizierten Substanzen des Core-VOC-Profiles von MAP ist auch Teil des VOC-Profiles der Familie der Mykobakterien. Würden in zukünftigen Studien weitere Mykobakterien-Spezies bzw. -Stämme einbezogen, dann ist damit zu rechnen, dass das bisher definierte Core-VOC-Profil für MAP, aber auch das der Familie der Mykobakterien, sich noch weiter schärfen lässt und somit an Spezifität gewinnt. Des Weiteren sollte in zukünftigen Studien ein großes Augenmerk auf die Konzentrationslevel über den verschiedenen Bakterienspezies bzw. den Grad des relativen Anstiegs oder Abfalls in Bezug zu den Kontrollröhrchen liegen.

4.1.2.2 Methodische Einflussfaktoren

Für eine auf der VOC-Analytik basierende Diagnostik wären Biomarker ideal, welche unabhängig von den Inkubationsprotokollen verlässliche Ergebnisse liefern würden. Nach unseren Erkenntnissen und in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Ergebnissen kann dies nur eingeschränkt erwartet werden, da es Einflussfaktoren gibt, die erheblich zur Verschiebung der VOC-Profile beitragen. So basieren die in der MAP-Diagnostik eingesetzten Nährmedien entweder auf Vollei (bzw. Eibestandteilen) oder auf synthetischen Nährsubstraten, was bei identischen Inkubationsprotokollen zu signifikant verschiedenen VOC-Profilen führt (Studie 1 Figure 3). Effekte von Nährmedien auf VOC-Profile sind auch für *Escherischia coli* (Ratiu et al. 2017), medizinisch bedeutende Pilzspezies (Scotter et al. 2005) und *Staphylococcus aureus* (O'Hara und Mayhew 2009) beschrieben. Ein zusätzlicher Einfluss geht von Inhaltsstoffen des Nährmediums aus, die das bakterielle Wachstum des Zielerregers negativ beeinflussen, wie zum Beispiel Nanopartikel (Buszewski et al. 2018) oder antibakterielle Bestandteile (Allardyce et al. 2006a).

Schlussfolgernd aus den Untersuchungen zur Wachstumskinetik muss man von einem sich verändernden VOC-Profil über die Zeit ausgehen. Es gibt Substanzen (oder Substanzgruppen), die mit bestimmten Phasen des bakteriellen Wachstums in Verbindung gebracht werden können, wie z. B. hohe Aldehydkonzentrationen über mykobakteriellen Kulturen zu Beginn des Wachstums, und dies vor allem in Röhrchen mit sehr geringer Keimzahl (bspw. 2-Methyl-2-butenal, Studie 1 Figure 6c). Des Weiteren gibt es Substanzen, die zu Phasen des exponentiellen Bakterienwachstums die höchsten Konzentrationen aufweisen (Studie 1 Figure 6a), und solche, die auch in der stationären Phase des bakteriellen Wachstums stetig weiter steigen (Studie 1 Figure 6b). Ein Großteil der messbaren VOC im Headspace von Bakterienkulturen ist mit metabolischen Prozessen der Zellteilung und vor allem des Zellwandaufbaus in Verbindung zu bringen (O'Hara und Mayhew 2009, Rees et al. 2016, Rees et al. 2017a). Somit bestimmt vorrangig die Bakteriendichte die Höhe der VOC-Konzentrationen der Substanzen, die aufgrund von Aufbauprozessen während der Zellteilung entstehen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit in der Literatur beschriebenen Versuchen (Bunge et al. 2008, O'Hara und Mayhew 2009, Purkhart et al. 2017). Es ist folglich zu konstatieren, dass mit fortschreitenden Inkubationszeiten eine sich ändernde Zusammensetzung der VOC existiert (Allardyce et al. 2006b, Bunge et al. 2008). Eine veränderte Wachstumsrate führt demzufolge auch zu einem veränderten VOC-Profil. Diese wird unter anderem durch die Inkubationsbedingungen, wie der Inkubationstemperatur, beeinflusst (Gumber et al. 2009, Gumber und Whittington 2009). Den Einfluss der Temperatur auf das VOC-Profil konnten wir durch die Inkubation von *M. marinum* bei 30 und 37°C zeigen (Studie 2). Des Weiteren führt eine reduzierte Inkubationstemperatur zu einer erhöhten Menge an ungesättigten Fettsäuren in der Zellwand, also einer veränderten Fettsäurezusammensetzung (Suutari und Laakso 1993), welche das VOC-Profil signifikant beeinflusst (vgl. 5.1.3 Ursprung VOC).

Folglich sind reproduzierbare Ergebnisse nur bei Studien mit standardisierten Inkubationsprotokollen zu erwarten. Dies gilt nicht nur für experimentelle Studien, sondern auch eine mögliche Nutzung der VOC-Analytik in der Diagnostik.

4.1.2.3 Technische Einflussfaktoren

Eine weitere Schwierigkeit, die eigenen Untersuchungsergebnisse mit denen bereits publizierter Studien zu vergleichen, bestand darin, dass in den unterschiedlichen Arbeitsgruppen unterschiedliche (kommerziell verfügbare) Techniken zur VOC-Analyse angewandt wurden bzw. werden (Tab. 3). Leider gibt es kaum Studien, in denen die verschiedenen Analysetechniken auf Vergleichbarkeit bezgl. ihrer Messergebnisse untersucht

wurden. Bereits durch verschiedene Materialien und Verfahren zur Aufkonzentrierung der volatilen Substanzen entstehen signifikante Unterschiede, sowohl quantitativer als auch qualitativer Natur (Oertel et al. 2018b, Anlage 4). Als Ursache für divergierende Analyseergebnisse infolge der Präkonzentrationsverfahren und -materialien kommen z. B. ein sogenannter Durchbruch (Nicht-Anhaftung) einzelner Substanzen am Adsorbens oder die Übertragung von Substanzen zwischen verschiedenen Messungen aufgrund unvollständiger thermischer Desorption des Adsorbens in Frage (Buszewski et al. 2007, Klich et al. 2012). Verschiedene Eigenschaften der Adsorbentien favorisieren spezifische Substanzgruppen in Abhängigkeit von deren Molekülgröße. Materialien mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber Luftfeuchte weisen unterschiedliche Wärmestabilitäten auf, was vor allem für die Adsorption halbflüchtiger Substanzen nachteilig sein kann (Mueller et al. 1998, Risby und Sehnert 1999, Harper 2000, Miekisch et al. 2004). Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht in der Kombination mehrerer Adsorbentien (Harper 2000, Miekisch et al. 2004). In unseren beiden *In-vitro*-Studien (Studien 1 und 2) kamen dreifach gepackte ‚needle trap devices‘ zur Anwendung. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Trefz et al. (2013a, Anlage 1) mit Fasern zur ‚solid-phase micro-extraction‘ gearbeitet. So kamen zur Präkonzentration zwar in allen drei Studien identische Adsorbentien zum Einsatz, aber dennoch unterschiedliche Verfahren. Das für die ‚needle trap devices‘ angewandete Verfahren, NTME, ist ein Extraktions-basiertes Verfahren während SPME ein Verteilungs-basiertes Verfahren darstellt. Dieser methodische Unterschied führt nachweislich zu qualitativen und quantitativen Unterschieden der gemessenen Substanzen (Oertel et al. 2018b, Anlage 4).

Des Weiteren resultieren unterschiedliche Messergebnisse aus unterschiedlichen Analysetechniken, denn verschiedene Auftrennverfahren nutzen verschiedene physikalische Eigenschaften der zu analysierenden VOC für deren Detektion. Zum Beispiel werden im GC die Substanzen nach Polarität und Dampfdruck aufgetrennt, während die PTR lediglich nach Masse trennt und die IMS Polarisierbarkeit, Molekülgröße und -form zur Auftrennung nutzt. Dies hat zur Folge, dass bei unzureichender Auftrennung der Substanzen nur eine unzureichende Identifikation stattfinden kann. In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse unserer Studien 1 und 2 mit denen von Trefz et al. (2013a, Anlage 1) sehr gut vergleichbar, da auch dort GC-MS genutzt wurde. Der Ergebnisvergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Studien (Tab. 3) ist nur eingeschränkt möglich, da in jeder Studie eine andere Analysetechnik verwandt wurde.

Bezüglich der methodisch bedingten Gefahr für Kontaminationen bei VOC-Analysen lässt sich ergänzend feststellen, dass diese umso größer ist, je mehr Arbeitsschritte bis zur endgültigen VOC-Analyse nötig sind (d. h. Sammeln der Gasprobe, Aufkonzentrieren, Analyse). Diesbezüglich sind Online-Messverfahren, wie z. B. PTR-MS oder IMS, am wenigsten anfällig (O'Hara und Mayhew 2009).

4.1.3 Erklärungsmodelle zur Herkunft flüchtiger organischer Substanzen über Mykobakterien-Kulturen

Für alle Bakterienkulturen gilt, dass messbar angestiegene VOC (vergleichend zum Kontrollmedium) mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem bakteriellen Stoffwechsel stammen. Vor allem in der exponentiellen Phase des bakteriellen Wachstums ist der zelluläre Metabolismus am intensivsten und ermöglicht somit Zellteilungen und Zellwandsynthesen (O'Hara und Mayhew 2009).

Bezüglich des metabolischen Ursprungs bakterieller VOC sind im Schrifttum bisher hauptsächlich Hypothesen formuliert, jedoch nur wenige Zusammenhänge bewiesen (Schulz und Dickschat 2007, Bos et al. 2013, Ratiu et al. 2017). Durch die Decarboxylierung

verschiedener Zwischenprodukte in der Fettsäurensynthese entstehen Alkane, Alkene und Methylketone (Abb. 4) (Han et al. 1969, Naccarato et al. 1974, Ney und Boland 1987, Fridman et al. 2005, Schulz und Dickschat 2007). Aber auch während der β -Oxidation im Abbau von Fettsäuren finden Umbauvorgänge zu volatilen Kohlenwasserstoffen statt (Ney und Boland 1987, Bos et al. 2013).

Die in unseren Untersuchungen deutlich gewordene Abhängigkeit des VOC-Profiles von den verfügbaren Nährstoffsubstraten steht im Einklang mit Ergebnissen von Zechman et al. (1986), wonach unterschiedliche Konzentrationen der Ausgangssubstanzen des Nährmediums zu unterschiedlichen VOC-Profilen derselben Mikroorganismen führten. Wichtige Bausteine der Zellwand sind zudem Ester und verzweigte Ketone, welche durch Modifikation von Aminosäuren entstehen. Während des Umbaus der Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und deren Zwischenprodukten entstehen verzweigte kurzkettige Aldehyde, wie z. B. 3-Methylbutanal und 2-Methylbutanal (Schulz und Dickschat 2007, Bos et al. 2013). Letztere wurden beispielsweise in der exponentiellen Wachstumsphase von Staphylokokken nachgewiesen (Beck et al. 2002, Beck 2005). Unsere Studie ergänzt diese Information, indem Aldehyde in mit MAP beimpften Röhren bei niedriger Bakteriendichte hochreguliert waren und im weiteren Verlauf des Wachstums (ansteigende Bakteriendichte) in ihrer Konzentration wieder abfielen, bis unterhalb der Nachweisgrenze. Bisher gibt es in der Literatur noch keine vergleichbaren Ergebnisse, die belegen, dass Aldehyde von MAP oder anderen Bakterienspezies aus dem Medium konsumiert werden, so dass offen bleibt, in welche metabolischen Prozesse diese bei Mykobakterien einfließen.

Mykolsäuren als ein quantitativ und funktional wichtiger Bestandteil der Zellwand stellen eine Besonderheit von Mykobakterien dar. Mykolsäuren sind Gebilde aus langkettigen Fettsäuren, Ketonen und Alkoholen (Rafidinarivo et al. 2009). Während der Synthese und des Abbaus von Mykolsäuren können Zwischenprodukte jeder Stufe modifiziert werden, wobei beispielsweise verzweigte Kohlenwasserstoffe durch Spaltung entstehen, aber auch Ester gebildet werden (Barry et al. 1998, Yuan et al. 1998). Die Veresterung von Essigsäure und Fettsäuren führt zu Essigsäureestern (Bos et al. 2013), wie z. B. Ethylazetat oder 3-Methyl-1-Butanolazetat, allerdings sind die genauen Prozesse nicht weitreichend in der Literatur beschrieben.

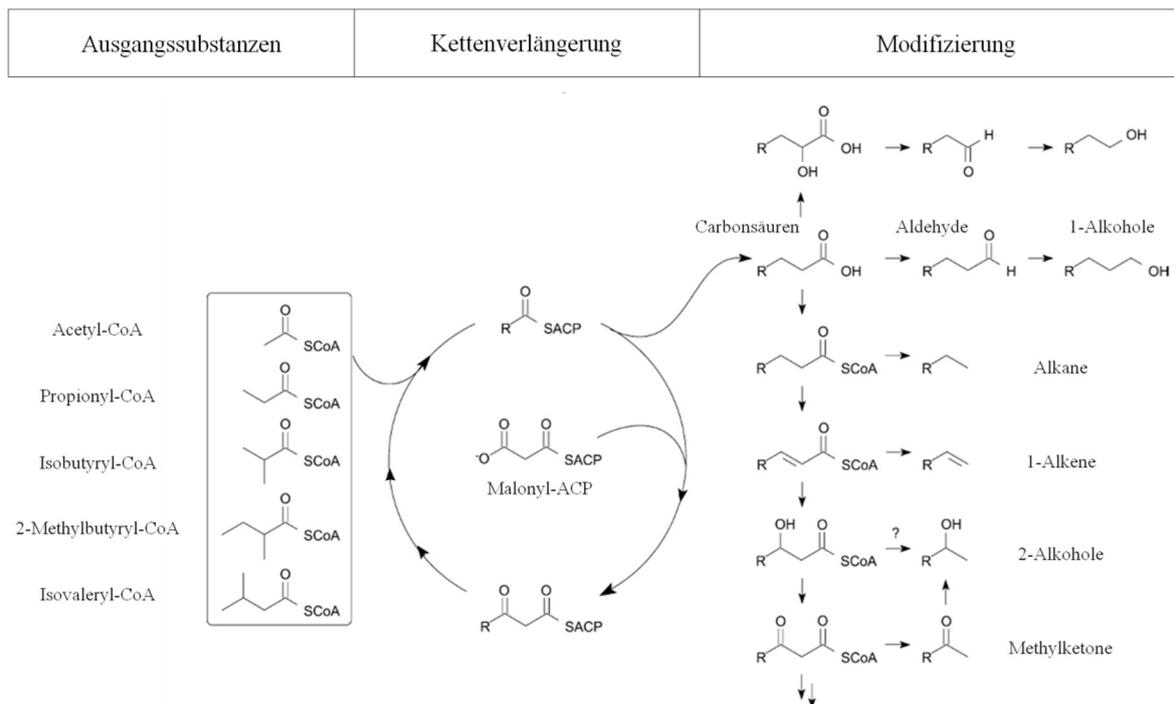


Abb. 4: Synthese kettenförmiger VOC in Verbindung mit der Fettsäuresynthese. (modifiziert nach Schulz und Dickschat 2007).

Aromatische volatile Substanzen entstehen hauptsächlich bei der Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan mittels des Shikimisäureweges oder während des Abbaus dieser drei Aminosäuren (Schulz und Dickschat 2007). Die beiden in das von uns definierte VOC-Profil von MAP inbegriffenen aromatischen Kohlenwasserstoffe 3-Methylfuran bzw. 2-Methylfuran wurden auch im Headspace von *Streptomyces* (Scholler et al. 2002) bzw. *Thermoactinomyces* (Wilkins 1996) nachgewiesen. Außerdem konnte 2-Pentylfuran auch im Headspace von *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden sowie im Atem von Patienten, in deren Atemwegen *Aspergillus fumigatus* kolonisierte. Letztere Befunde waren Anlass, 2-Pentylfuran als Biomarker einer Aspergillose vorzuschlagen (Chambers et al. 2011). In der Literatur werden zwei Stoffwechselwege als Quelle von 2-Pentylfuran vermutet: zum einen die Oxidation von Linolsäure mittels Lipooxygenase oder Dioxygenase, wie in einigen Pflanzen beschrieben (St Angelo et al. 1980, Boue et al. 2005) und zum anderen die direkte Interaktion von Linolsäure mit reaktivem Sauerstoff, die in bestimmten Nahrungsmitteln vorkommt (Min und Boff 2002). Da Linolsäure auch in der Zellwand von Mykobakterien vorkommt (Suutari und Laakso 1993), könnten diese beiden Abbauvorgänge in der Zusammensetzung des VOC-Profiles von MAP eine entscheidende Rolle spielen. Ein weiterer spezifischer Baustein der mykobakteriellen Zellwand ist das Glykolipid Lipoarabinomannan (LAM), welches durch Hemmung der Makrophagenaktivität das zelluläre Immunsystem des Wirtes beeinträchtigt (Appelmelk et al. 2008, Dhiman et al. 2011). Die Grundstruktur von LAM ist an α -Arabinofuranan und D-Galactofuran geknüpft und wird vor allem in Vorbereitung der Zellteilung synthetisiert. Während der Synthese von α -Arabinofuranan und D-Galactofuran ist die Bildung von volatilen Furanen außerdem denkbar.

Die bedeutende Rolle der Fettsäurezusammensetzung der Zellwand auf das VOC-Profil zeigt sich in der Korrelation der Mykobakterienklassifizierung mittels Fettsäuremuster nach Lechevier et al. (1971) mit der in unserer Studie aufgezeigten Gruppierung der Spezies (Studie 2 Figure 1). Denn die in unserer Studie aufgezeigte Gruppierung deckt sich nicht mit

der üblichen Klassifizierung der Mykobakterien nach Phänotyp nach Ernest H. Runyon (1965). Auch die Einteilung in MTC, MAI und NTM spiegelt nicht die Gruppierung in unserer Studie wider.

4.1.4 Fazit

In den *In-vitro*-Studien 1 und 2 waren sowohl über den Bakterienkulturen, als auch dem Nährmedium jeweils über 100 Substanzen messbar, die nicht in der umgebenden Laborluft zu verzeichnen waren. Die Untersuchungen zeigten signifikante Unterschiede zwischen der VOC-Konzentration über Bakterienkulturen und der über Nährmedien auf. Quantitative, aber auch qualitative Unterschiede des VOC-Profiles ergaben sich aus unterschiedlichen Nährsubstraten, variierender Bakteriendichte des Inokulates und ansteigenden Inkubationszeiten. Obwohl über verschiedenen Mykobakterien-Spezies signifikante Unterschiede in den VOC-Emissionen zu verzeichnen waren, wurden 17 Substanzen detektiert, die sich über allen mykobakteriellen Kulturen gleich verhielten, also Konzentrationsanstieg bzw. -abfall vergleichend zum Nährmedium.

Die von uns erarbeiteten Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass im Headspace über sich vermehrenden Mykobakterien-Kulturen VOC-Profile entstehen, die von diagnostischer Bedeutung sein können. MAP wies dabei ein spezifisches Profil auf, welches 28 VOC umfasste und für alle getesteten Stämme identisch war. Mithilfe sowohl qualitativer als auch quantitativer Eigenschaften des MAP-anzeigenden Core-VOC-Profiles lässt es sich von VOC-Profilen anderer Mykobakterien-Spezies unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass der Hauptteil der VOC im Headspace von wachsenden Bakterienkulturen aus der Zellwandsynthese herrührt, sodass Substanzen, deren Konzentration ansteigt, Zwischen- oder Endprodukte des bakteriellen Metabolismus darstellen. Weitere Substanzen, deren Konzentration abfällt, stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus dem Nähr- bzw. Kulturmedium und fungieren als Nährstoffe, die im bakteriellen Metabolismus verarbeitet, also konsumiert, werden.

Signifikante Veränderungen im VOC-Profil der Gasphase der mit MAP inokulierten Kulturröhrchen waren bereits messbar, bevor optisch sichtbares Bakteriumwachstum zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis impliziert, dass insbesondere bei langsam wachsenden Mykobakterien mittels der VOC-Analyse ein zeitlicher Gewinn in der *In-vitro*-Diagnostik zu erzielen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mittels VOC-Analytik die kulturelle Anzucht von Mykobakterien unter zwei Gesichtspunkten optimierbar wäre: zum einen kann die Diagnostik beschleunigt werden und zum anderen würden Arbeitsschritte reduziert, wenn die Identifikation der Spezies bereits auf Basis des VOC-Profiles erfolgen könnte. Wie sich die Sensitivität und Spezifität der MAP-Diagnostik mittels VOC-Analytik über Bakterienkulturen darstellt, muss noch geprüft werden. Außerdem gilt es, die Ergebnisse über bakteriellen Kulturen aus nativen Proben zu verifizieren. In der weiteren Entwicklung des diagnostischen Potentials von VOC ist es notwendig, mithilfe definierter Inkubations- und Analyseprotokolle bekannte Einflussfaktoren, wie z. B. Kulturmedium, Bakteriendichte, Inkubationszeit und Analyseverfahren weitgehend zu standardisieren. Um zur praktischen Anwendung der Diagnostik mithilfe von VOC zu gelangen, müssen weitere Faktoren untersucht und die Wachstumskinetik, möglichst mittels Online-Verfahren, genauer beschrieben werden. Der letzte Schritt wäre die Entwicklung einfacher, handlicher, preiswerter Analysegeräte, mit geringer Nachweisgrenze für MAP- oder Mykobakterien-spezifische volatile Substanzen.

4.2 Validität und Relevanz der *In-vivo*-Studien

4.2.1 Übertragbarkeit von bakteriellen VOC-Profilen auf die *In-vivo*-Situation

In der Literatur finden sich zunehmend Studien, in denen versucht wird, VOC-Profile im Headspace von Bakterienkulturen als Markersets zu definieren, die sich auch in Atemgasprofilen von mit diesen Bakterien infizierten Patienten wiederfinden lassen. Solche Studien beziehen sich i.d.R. auf Pneumonie-assoziierte Erreger und wurden bisher unter anderem für *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Candida* spp. und *Acinetobacter baumannii* durchgeführt (Filipiak et al. 2015, Gao et al. 2016).

Nach unseren Ergebnissen ist nicht davon auszugehen, dass *in vitro* und *in vivo* identische VOC-Profile generiert werden, denn die Bakterien finden in der *In-vivo*-Situation andere Bedingungen als im Kulturröhrchen vor. Im Makroorganismus gelten andere Verhältnisse, vor allem in Bezug zu Nährstoffquellen und -verfügbarkeit (Russell et al. 2010, Knief et al. 2011). Des Weiteren sind Konkurrenz und Interaktion mit anderen Bakterienspezies und dem Immunsystem (Aussel et al. 2016) von Bedeutung. Die genannten Faktoren stehen beispielhaft für eine Vielzahl von *In-vivo*-Bedingungen, die ihrerseits Einfluss auf den bakteriellen Metabolismus und somit auf das bakterielle VOC-Profil haben.

Das dieser Dissertation übergeordnete Gesamtprojekt beinhaltete auch Untersuchung des Headspaces von Kotproben MAP-infizierter Ziegen (Bergmann et al. 2015; Kasbohm et al. 2017, Anlage 2). Erwartungsgemäß traten in diesen Studien nicht unbedeutende Variationen zwischen dem über Kotproben gemessenen VOC-Profil und dem unter *In-vitro*-Bedingungen ermittelten VOC-Profil für MAP auf. Die beobachteten Unterschiede können u. a. damit erklärt werden, dass bei einer Infektion des Darmes eine metabolische Adaptation von MAP an die intestinale Umgebung stattfindet (Weigoldt et al. 2013), was sich unter anderem auch in variierenden Phänotypen des bakteriellen Stoffwechsels äußert (Weigoldt et al. 2011). Des Weiteren ist zu bedenken, dass MAP in Fäzes quantitativ im Vergleich zu der Begleitflora eine untergeordnete Rolle spielt und dass Futterreste, lebende und tote wirtseigene Zellen (Immunsystem, Darmepithel etc.) ebenfalls VOC emittieren. Allerdings findet man in der Literatur Studien, die mittels VOC-Analytik im Headspace von Fäzes erfolgreich verschiedene infektiöse Magen-Darm-Erkrankungen spezifischen VOC-Profilen zuordnen konnten (Probert et al. 2004).

Für den direkten Vergleich des im Rahmen der eigenen Untersuchungen ermittelten *In-vitro*-VOC-Profiles für MAP mit Atemgas-Analysen von mit MAP-infizierten Tieren kann ebenfalls auf Ergebnisse zurückgegriffen werden, die in anderen Teilprojekten innerhalb des Forschungsverbundes erarbeitet wurden. So wurden im alveolären Gasmisch mittels Atemgas-Analysen bei Ziegen, die experimentell mit MAP inokuliert worden waren, für zahlreiche VOC signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den mit MAP inokulierten (respektive infizierten) Tieren und den nicht-infizierten Kontrolltieren gefunden (Bergmann et al. 2015; Kasbohm et al. 2017, Anlage 2). Auffällig war, dass signifikant veränderte VOC im Atemgas der infizierten Tiere eher niedriger konzentriert waren als *in vitro* (quantitative Unterschiede) und dass die Substanzen, die sich *in vivo* als relevant für ein potentielles MAP-Profil herauskristallisierten deutlich verschieden waren von denen, die *in vitro* als diagnostisch relevant auffielen (qualitative Unterschiede).

Die Hypothese, im Atemgas diagnostische Marker für eine systemische oder in anderen Organsystemen als der Lunge lokalisierte Infektion zu finden, basiert auf der Annahme, dass die mit dem Blut transportierten Stoffwechselprodukte des lokalen Infektions- oder Entzündungsgeschehens über den Lungenkreislauf zur Blut-Luft-Schranke gelangen und dort

teilweise per Diffusion in das Alveolargas übertreten. Im Unterschied zu einer Pneumonie ist bei dem von uns gewählten Modell einer bakteriellen Infektion des Darms nicht zu erwarten, dass von Erregern emittierte VOC direkt im Atemgas erscheinen. Daher war davon auszugehen, dass im alveolären VOC-Profil von mit MAP infizierten Ziegen eher die sog. ‚host response‘, also die lokale und systemische Reaktion des Wirtes auf die Infektion mit MAP und die daraus resultierenden metabolischen Prozesse widergespiegelt werden. Bei einer MAP-Infektion stehen zunächst lokale immunologische Vorgänge im Darm und der dazugehörigen Lymphknoten im Vordergrund. Lokale inflammatorische Reaktionen setzen Entzündungsmediatoren frei. Durch das geschädigte Darmepithel werden resorptive Vorgänge beeinträchtigt, so dass infolge der Malabsorption von einer niedrigen Anflutung von Nährsubstraten für Anabolismus und Milchbildung im Blut auszugehen ist. In der Summe dieser pathogenetischen Komponenten einer MAP-Infektion ist zu erwarten, dass das im Atemgas messbare VOC-Profil bei MAP-positiven Tieren Hinweise auf den immunologischen Status der Tiere und auf das Erkrankungsstadium zu geben vermag. Um dieser Hypothese zukünftig nachgehen zu können, sind weitere Studien nötig, für die der in dieser Arbeit validierte Ansatz zur Atemgasanalyse die methodische Basis liefert.

4.2.2 Beurteilung des experimentellen Aufbaus

Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurden die zuvor unter experimentellen Bedingungen erprobten und ausschließlich an Ziegen angewandten Verfahren zur Sammlung und Analyse von Atemgas (Fischer et al. 2015a, Fischer et al. 2015b) weiterentwickelt. Ziel war es, eine technische Lösung zu etablieren, die Atemgasanalysen auch in Echtzeit ermöglicht und so zu optimieren, dass die zudem an verschiedenen Tierarten (adulte Rinder, Schafe und Ziegen) und unter den Bedingungen der landwirtschaftlichen Praxis zuverlässig anwendbar ist. Wie in Studie 4 beschrieben, wurden hierfür die CO₂-gesteuerte Sammlung von Atemgas in NTD mit einer Echtzeit-Messung mittels Proton Transfer Reaction-Time of Flight-Massenspektroskopie (PTR-ToF-MS) kombiniert. Diese neue technische Lösung kam an 85 Rindern (83 Kühe und 2 Jungrinder), 4 Schafen und 4 Ziegen zum Einsatz. Die eigenen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Anwendbarkeit an Rindern (Studie 4). Weiterführende Ergebnisse wurden im Rahmen des Gesamtprojektes auch an Schafen und Ziegen erarbeitet (Oertel et al. 2018a, Anlage 3), wobei dort vor allem der Einfluss der Eruktionen der Wiederkäuer auf die Atemgas-Messungen untersucht wurden. Dabei ist festzustellen, dass lediglich mittels einer Messung in Echtzeit Verunreinigungen durch Pansengase zu detektieren sind und diese getrennt vom Atemgas analysiert werden können.

Die erfolgreich durchgeführten Atemgasanalysen an 83 adulten nicht sedierten Rindern in acht verschiedenen Milchviehbetrieben belegten die Anwendbarkeit des vorgestellten technischen Aufbaus unter Feldbedingungen. Der technische Aufbau, vor allem die dicht abschließende Atmungsmaske und das Fixieren der Tiere im Fressgitter (zusätzlich mit Halfter und Stricken), wurden von allen 83 Tieren in allen acht Betrieben sehr gut toleriert. Das alveoläre Atemgas konnte kontinuierlich und nicht-invasiv gesammelt und für spätere GC-MS-Analysen asserviert werden. Die in Echtzeit ermittelten Messergebnisse standen hingegen unmittelbar zur Verfügung. Beide Arten von Atemgasanalysen waren parallel durchführbar und beliebig oft wiederholbar. Die Faktoren Atmungsfrequenz, Körperkondition und Alter der Tiere hatten keinen Einfluss auf die Durchführbarkeit und die Auswertbarkeit der Messungen.

Beide methodischen Komponenten der Atemgasanalyse, sowohl das Aufkonzentrieren des Alveolargases aus mehreren Expirationen mittels NTME (mit anschließender Analyse mittels GC-MS) als auch die Echtzeitanalyse mittels PTR-ToF-MS, lieferten in allen 153 Fällen verlässliche Daten. Der Vorteil der GC-MS-Analyse aufkonzentrierter Alveolargasproben liegt

in der niedrigen Nachweisgrenze (ppbV-Bereich) und vor allem in der Auftrennung der Substanzen nach Polarität und Dampfdruck sowie der sehr guten Identifikation mithilfe von Fragmentierungsmustern (Trefz et al. 2013b). Die PTR-ToF-MS ermöglichte eine Echtzeit-Atemgasanalyse direkt am Tier, in Analogie zu humanmedizinischen Patienten bzw. Probanden (Herbig et al. 2009, Miekisch et al. 2014). Die in dieser Studie gewählte Kombination beider Verfahren führte zu der eindeutigen Identifikation und kontinuierlichen Messung von potentiellen Biomarkern in Echtzeit (Trefz et al. 2013c). Diese Kombination stellt einen erheblichen Vorteil dar, weil zum einen sowohl zu erwartende als auch nicht zu erwartende Verunreinigungen der Messung detektierbar und getrennt voneinander analysierbar sind und zum anderen die eindeutige Identifikation der Substanzen gewährleistet werden kann.

Die zuvor in der Literatur beschriebenen technischen Lösungen zur Atemgasanalyse beim Rind basierten entweder auf verschiedenen Aufkonzentrierungsverfahren in Kombination mit GC-MS (Spinhirne et al. 2004, Peled et al. 2012) oder auf PTR-ToF-MS, wobei hierbei alle emittierten VOC eines Rindes (über Haut, Urin, Fäzes, etc.) mittels Klimakammer analysiert wurden (Shaw et al. 2007). Für andere Wiederkäuer gibt es in der Literatur keine Studien anderer Autoren. Somit etablierten wir erstmalig einen technischen Aufbau zur Echtzeitanalyse der Atemgas-VOC, der an Wiederkäuern verschiedener Spezies unter praxisrelevanten Bedingungen einsetzbar ist und mit dessen Hilfe unerwünschte Kontaminationen des Atemgases (bsp. durch Pansengas) identifiziert werden können.

4.2.3 Biologische Einflussfaktoren der VOC-Analytik im Atemgas

Auch in der *In-vivo*-Analytik von volatilen Substanzen kommen alle methodischen und technischen Einflussfaktoren zum Tragen, die bereits unter Abschnitt 5.1.2.2 und 5.1.2.3 für die *In-vitro*-Studien diskutiert wurden. Zusätzlich spielen aber auch biologische Variabilitätsursachen eine entscheidende Rolle, von denen nachfolgend der für Wiederkäuer relevante Vorgang des Ruktus sowie Einflüsse im tageszeitlichen Verlauf näher betrachtet werden sollen.

4.2.3.1 Ruktus

Mit Online-Messverfahren zur Atemgasanalyse in Echtzeit können Änderungen der VOC-Konzentration im zeitlichen Verlauf nachverfolgt werden. So können langfristige aber auch kurzfristige Anstiege oder Abfälle einzelner VOC-Konzentrationen gemessen und ausgewertet werden. Kurzfristige Änderungen, die möglicherweise nur eine oder wenige Expirationen betreffen, können auf Kontaminationen der Messung hinweisen. Bei Wiederkäuern wird das Atemgas regelmäßig durch die physiologisch auftretenden Eruptionen von Pansengas kontaminiert. Das Pansengas wird bei einem Ruktus in die Maulhöhle abgegeben, anschließend ein- und später wieder ausgeatmet. Das hat zur Folge, dass je nach Substanz zwischen 1 bis 36 Expirationen nach dem aufgetretenen Ruktus mit Pansengas kontaminiert sind (Oertel et al. 2018a, Anlage 3). Ausgehend von diesen erstmals erhobenen Befunden und der daraus gewonnenen Erkenntnisse wird deutlich, dass für diagnostisch relevante VOC exakt zu definieren ist, um welchen Faktor sich die Konzentration der entsprechenden Substanz nach Ruktus ändert und nach wievielen Expirationen die Ausgangskonzentration im Atemgas wieder erreicht ist. Mit der in dieser Studie etablierten Atemgasmessung in Echtzeit ist erstmals für landwirtschaftliche Nutztiere ein Verfahren etabliert worden, mit dessen Hilfe Expirationsphasen, die durch Pansengas kontaminiert bzw. ‚verunreinigt‘ sind, erkannt und von der eigentlichen Atemgasanalyse separiert werden können. Andererseits eröffnet dieser technische Aufbau die Möglichkeit, exhalierte Gasgemische aus den Vormägen separat zu analysieren, was ggf. für weiterführende Fragestellungen außerhalb des eigenen Forschungsthemas von Interesse sein könnte.

4.2.3.2 Tageszeitliche Einflüsse

In der Atemgasanalytik müssen physiologische Änderungen des Metabolismus bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden (Manolis 1983). Exemplarisch konnten wir in einer Pilotstudie an zwei Kälbern im Alter von 5 Monaten zeigen, dass variierende Tageszeiten und unterschiedliche Tage Einfluss auf das VOC-Profil im Atem haben (Studie 4). Eine mögliche Ursache für ansteigende bzw. abfallende VOC-Konzentrationen im Atem im Laufe des Tages könnten tageszeitliche Variationen der Lungenfunktion sein, wie bspw. die funktionelle Residualkapazität oder die Atemleitfähigkeit (Hlastala et al. 1973, Kerr 1973). Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass der Metabolismus in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme bzw. den Fütterungszeiten tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Nicht nur die Nährstoffzusammensetzung (Kistler et al. 2014, Fischer et al. 2015b), sondern auch die Futteraufnahme an sich beeinflusst die Konzentrationen der volatilen Substanzen im Atemgas erheblich. Fischer et al. (2015a) konnte den signifikanten Anstieg von sechs Substanzen im Atemgas nach der morgendlichen Futteraufnahme an Ziegen zeigen. Interessanterweise waren die tageszeitlichen Variationen der VOC-Konzentrationen am zweiten Messtag je Tier deutlich geringer als am ersten Messtag (Studie 4 Figure 5B). Messtag 1 zeichnete sich durch einen plötzlich geänderten Tagesverlauf für die Tiere aus mit ihnen unbekanntem Untersuchungen (Aufsetzen einer Atmungsmaske) und ihnen unbekanntem Personen. Das heißt am Messtag 1 waren die Tiere in einer für sie neueren Situation als am Messtag 2, weswegen wir auch "Stress" als Einflussfaktor auf die Atemgasmessung zählen. Dass Tiere sich an diese Art von Untersuchung gewöhnen können und die "Stressantwort" von Tag zu Tag deutlich geringer ausfällt, konnte die Studie von Hildenbrand (2009) an Schafen zeigen. Man kann von einem "gewöhnungsbedingten Trainingseffekt" sprechen.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass für tierexperimentelle Studien zur Atemgasanalytik demzufolge ein standardisiertes Untersuchungsprotokoll notwendig ist mit exakt definierten Fütterungs- und Messzeiten. Des Weiteren ist - sofern möglich - ein Training der Tiere an die Maske und den Messvorgang empfehlenswert.

4.2.4 Fazit

Die *In-vivo*-Studien zeigten, dass der technische Aufbau zur Atemgasanalyse bei verschiedenen Wiederkäuer-Arten (Rindern, Schafen und Ziegen) sowie unter den verschiedenen Bedingungen der landwirtschaftlichen Praxis als auch unter experimentellen Bedingungen auswertbare Ergebnisse lieferte. Sowohl die CO₂-gesteuerte Offline-Messung der aufkonzentrierten VOC als auch die Online-Messung funktionierten unabhängig von Atmungsfrequenz, Körperkondition und Alter der Tiere und die daraus resultierenden Messergebnisse waren uneingeschränkt auswertbar. Als Einflussfaktoren auf die Variabilität von VOC im Atemgas galten die Tageszeit und Gewöhnungs- bzw. Trainingseffekte. Diese Erkenntnisse sind hilfreich, um für zukünftige Atemgasanalysen standardisierte Protokolle zu entwickeln. Eine weitere entscheidende Ursache für bislang unterschätzte Variabilitäten bei der Atemgasanalyse von Wiederkäuern resultiert aus der Kontamination einzelner Atemzüge durch Eruptionen von Pansengas. Um exhalierendes VOC aus dem alveolären Gasraum und VOC aus der Vormagenverdauung sicher voneinander abgrenzen zu können, bewährte sich allein die Online-Messung des Atemgases, da nur mittels dieses Verfahrens Konzentrationsunterschiede relevanter VOC in den einzelnen Expirationen in Echtzeit erkennbar waren.

Um zukünftig zu klären, ob im Atemgas flüchtige Substanzen als Biomarker einer MAP-Infektion in Erscheinung treten, sind weiterführende Untersuchungen nötig. Eine direkte Übertragung des spezifischen VOC-Profiles von MAP-Kulturen *in vitro* auf eventuell im Alveolargas bzw. exhalierendem Gasmisch vorhandene und noch zu evaluierende Marker einer

MAP-Infektion *in vivo* erscheint aufgrund der bislang erarbeiteten Erkenntnisse wenig erfolgversprechend. Vielmehr könnten exhalierbare Marker, die aus der immunologischen oder inflammatorischen Antwortreaktion des Wirtes auf die MAP-Infektion resultieren ein interessantes Forschungsfeld der Zukunft sein.

4.3 Einordnung des Erkenntniszuwachses in das Gesamtprojekt

Die Untersuchungen im Rahmen des von der DFG geförderten Gesamtprojektes dienen dem langfristigen Ziel der Identifizierung von VOC als Biomarker für eine Infektion mit MAP. Dafür wurden 2 Strategien der VOC-Analytik verfolgt; 1) VOC im Headspace von Bakterienkulturen (*In-vitro*-Diagnostik) und 2) VOC, die von Tieren mit einer MAP-Infektion emittiert werden (*In-vivo*-Diagnostik). *In vivo* konzentrierten sich die Untersuchungen auf Substanzen im Headspace von Kotproben und VOC im alveolären Atemgas.

Das Hauptaugenmerk der dieser Dissertation zugrunde liegenden *In-vitro*-Versuche konzentrierte sich auf die Erstellung eines VOC-Profiles, welches indikativ für das kulturelle Wachstum von MAP ist. Die Ergebnisse der Studien 1-3 belegen, dass es prinzipiell möglich ist, VOC als diagnostischen Ansatz zu nutzen, um das Vorhandensein von wachsenden Bakterien zu detektieren. Es konnte ein Profil bestehend aus 17 Substanzen zusammengestellt werden, welches das Wachstum von Mykobakterien im Allgemeinen anzeigt. Des Weiteren wurde ein MAP-anzeigendes Core-VOC-Profil definiert, welches 28 Substanzen umfasst und mithilfe von drei Einzelstudien dargelegt wurde. Somit wurde erstmals ein bakterielles VOC-Profil auf Reproduzierbarkeit und Robustheit gegenüber Einflussfaktoren untersucht. Dabei wurden biologische (Spezies-Vergleich, Stamm-Vergleich), methodische (Inkubationszeit, Bakteriendichte, Nährmedium, Inkubationstemperatur) und technische (Adsorbentien und Verfahren zur Aufkonzentrierung, Analysetechnik) Einflussfaktoren untersucht und die Notwendigkeit eines standardisierten Inkubations- und Analyseprotokolls festgestellt. Unter Beachtung dieser Einflussfaktoren könnte im Vergleich zum direkten kulturellen Nachweisverfahren von MAP die Sensitivität mittels VOC-Analytik gesteigert, die Diagnostik beschleunigt und das Protokoll von einem two-step-Verfahren (Kultur und PCR) auf ein one-step-Verfahren reduziert werden. Dies bedarf Untersuchungen des MAP-anzeigenden Core-VOC-Profiles über MAP aus nativen Proben (Kot- und Gewebeproben) und der Abgrenzung des Profils zu anderen bakteriellen Genera, vor allem bei Wiederkäuer relevanten Mikrobiota sowie potentiellen Erregern des Gastrointestinaltraktes.

In der vorangegangenen ersten Förderphase des Projektes wurde in einem Tierexperiment mit MAP-inokulierten Ziegen die von Trefz et al. (2013b) etablierte, automatisierte und kontrollierte Sammlung von Alveolargas an Ziegen angepasst. Zusätzlich wurden die physiologischen Effekte von somatischem Wachstum, Rumination und der morgendlichen Fütterung auf das VOC-Profil von Ziegen evaluiert (Fischer et al. 2015a, Fischer et al. 2015b). Im caprinen Modell resultierten aus dem Vergleich von Ziegen mit einer experimentell induzierten MAP-Infektion und nicht-inokulierten Kontrolltieren ein Markersatz im Headspace von Kot (n=21) und im Atemgas (n=9), welches sich hypothetisch als ‚Biomarker‘ für eine Infektion mit MAP eignen könnte (Bergmann et al. 2015). Diese ersten Ergebnisse wurden im Rahmen der zweiten Förderphase und eines weiteren Tierexperiments, in welchem erneut Ziegen mit MAP inokuliert wurden, sowie unter Einbeziehung komplexerer statistischer Analysemethoden (random forest) weiterführend evaluiert (Kasbohm et al. 2017, Anlage 2). Die biomathematischen Auswertungen der in den caprinen Tiermodellen analysierten VOC obliegen Kooperationspartnern mit spezieller bioinformatischer Expertise und dauern noch an.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die VOC-Analyse im Atemgas auf die Tierart Rind erweitert. Die hierfür konzipierte technische Lösung kombinierte die Aufkonzentrierung von Alveolargas für spätere GC-MS-Analysen mit der Atemgas-Analyse in Echtzeit. Dieser neuartige Versuchsaufbau wurde erstmals an adulten Rindern, Ziegen und Schafen unter den Bedingungen der landwirtschaftlichen Praxis getestet. Erste Validierungen zur standardisierten Atemgasanalyse an 83 adulten Rindern aus acht verschiedenen Milchviehbetrieben zeigten die Durchführbarkeit von Atemgasanalysen in Echtzeit, welche unmittelbar verfügbare Ergebnisse jedes einzelnen Atemzuges zur Verfügung stellten. Dadurch konnte die, vor allem bei Wiederkäuern, nötige Trennung der einzelnen Atembereiche (Inspiration, Expiration mit Mischluft und Alveolarluft) von etwaigen physiologischen Kontaminationen (Eruktion von Pansengas) sicher separiert werden. Somit steht für weiterführende Untersuchungen ein sicher handhabbares System zur Verfügung, welches an verschiedene Großtierarten adaptierbar ist und zuverlässige Ergebnisse liefert.

4.4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten

4.4.1 *In-vitro*-Untersuchungen

4.4.1.1 Schlussfolgerungen

Mit diesen Studien wurden die unter 3.1 aufgestellten Fragen umfassend bearbeitet. Erstmals wurde ein bakterielles VOC-Profil auf verschiedene Einflussfaktoren untersucht und zudem die Reproduzierbarkeit und die Robustheit des Profils getestet, um die Anwendbarkeit von VOC als Diagnostikum zu prüfen.

Welche biologischen, methodischen und technischen Einflussfaktoren auf das VOC-Profil sind zu beachten um VOC im Headspace von MAP diagnostisch nutzen zu können?

Das Detektieren von wachsenden Mykobakterien (mit besonderer Hinsicht auf MAP) mittels VOC-Analytik im Headspace der Bakterienkulturen ist möglich.

Verschiedene Einflussfaktoren verändern das VOC-Profil qualitativ als auch quantitativ;

- a. Zu den biologischen Faktoren gehören die unterschiedlichen Mykobakterien-Spezies und Bakterien-Stämme.
- b. Zu den methodischen Faktoren zählen die Zusammensetzung des Nährmediums, die Bakteriendichte (ausgehend von Inkubationszeit und Keimzahl des Inokulates) und die Inkubationstemperatur.
- c. Technische Faktoren, wie das Adsorptionsmaterial während der Aufkonzentrierung sowie verschiedene Parameter der Substanztrennung verschiedener Analyseverfahren, sind zu beachten und zu standardisieren.

Kann ein robustes VOC-Profil im Headspace von MAP definiert werden?

Die im Headspace der Kulturen identifizierten MAP-VOC-Profile von 3 einzelnen Studien überschneiden sich in einer Reihe von Substanzen. Nach Betrachtung meta-statistischer Verfahren ergibt sich ein MAP-anzeigendes VOC-Profil von 28 Substanzen, welche perspektivisch diagnostisch genutzt werden können.

Können Rückschlüsse auf die Herkunft der VOC im Headspace von MAP geschlossen werden?

Der Ursprung der VOC über MAP-Kulturen liegt hauptsächlich in der Zellwandsynthese während des bakteriellen Wachstums.

4.4.1.2 Empfehlungen

Ausgehend von den durchgeführten *In-vitro*-Studien ergeben sich Empfehlungen für weitere wichtige Untersuchungen, um zum einen das Grundlagenwissen der VOC-Analytik über Bakterienkulturen weiter auszubauen und zum anderen das diagnostische Potential von VOC-Profilen über MAP-Kulturen belegen zu können. Zunächst sollten weitere Einflussfaktoren, wie das Alter bzw. die Charge des Nährmediums und der zeitliche Abstand von Inkubationsende bis VOC-Analyse untersucht werden. Beide Faktoren können nicht standardisiert werden (aufgrund Einfluss Dritter bei Produktion der Nährmedien und Versand der Kulturröhrchen zwischen verschiedenen spezialisierten Laboren), dennoch sollte die Auswirkung auf das VOC-Profil bekannt sein. Des Weiteren wäre die VOC-Analyse von MAP-Kulturen in Flüssigkultur essentiell um emittierte und katabolisierte VOC und deren Konzentrationen mit der exakten bakteriellen Keimzahl in Verbindung bringen zu können. Möglicherweise korrelieren einzelne Substanzen positiv mit der Keimzahl. Um das diagnostische Potential von VOC über MAP-Kulturen belegen zu können, muss die Robustheit, Sensitivität und Spezifität des durch uns definierten VOC-Profiles für MAP evaluiert werden. Dazu sollten für alle folgenden Studien die Kriterien des Inkubations- und Analyse-Protokolls standardisiert werden. Es wäre anzuraten eine hohe Anzahl verschiedener MAP-Stämme in verschiedenster bakterieller Dichte zu analysieren und auszuwerten. Des Weiteren sollten MAP-Kulturen aus nativen Proben (Kot- und Gewebeproben) einer VOC-Analyse zugeführt werden. Mithilfe eines Abgleichs des VOC-Profiles im Headspace von Bakterienkulturen und Kot von MAP-infizierten Tieren, könnte eine potentielle *In-vivo*-Diagnostik von MAP untersucht werden.

4.4.2 *In-vivo*-Untersuchungen

4.4.2.1 Schlussfolgerungen

Ist es möglich durch einen von uns entwickelten technischen Aufbau Online-Analysen von VOC im Atemgas von adulten Rindern unter Feldbedingungen durchzuführen?

In den Untersuchungen eines Online-Analyse-Verfahrens zur Atemgasanalytik beim Rind wurde unter Feldbedingungen die Anwendbarkeit bei adulten Tieren unabhängig von Atmungsfrequenz, Körperkondition und Alter bestätigt. Die VOC sind damit ebenso verlässlich messbar wie mit dem in diesem Projekt zuvor etablierten Offline-Messverfahren an Ziegen unter experimentellen Bedingungen.

Wie variabel ist das VOC-Profil im Atemgas von Rindern im Tagesverlauf?

Es wurden erste Versuche zu Einflussfaktoren wie Tag, Tageszeit und Stress durchgeführt und deren Relevanz als Variabilitäts-Faktoren bestätigt. Des Weiteren konnten Verunreinigungen des Atemgases durch Eruptionen von Pansengas erkannt und getrennt voneinander analysiert werden.

4.4.2.2 Empfehlungen

Der Abgleich der Messungen an Ziegen unter experimentellen Bedingungen aus der früheren Phase dieses Projektes mit Messungen an Ziegen unter Feldbedingungen ist empfehlenswert. Des Weiteren sollte ein Vergleich von Atemgasmessungen an Ziegen und adulten Rindern

erfolgen. Unter Zuhilfenahme des in dieser Dissertation etablierten Online-Messverfahrens anwendbar unter Feldbedingungen, könnten die Ergebnisse aus Online- und Offline-Methoden untersucht und verglichen werden. Außerdem ist es notwendig weitere Faktoren, wie den Einfluss des Melkvorganges, verschiedene Stoffwechsellagen (Trächtigkeit, Laktationsstadien, etc.) und jahreszeitliche Einflüsse zu untersuchen. All diese Faktoren sollten in Hinblick auf eine potentielle diagnostische Nutzung von VOC-Profilen im Atemgas von Wiederkäuern bekannt sein um standardisierte Protokolle entwerfen zu können. Erst dann können Studien zu Infektions- oder Erkrankungs-anzeigenden VOC-Profilen im Atemgas (bspw. für MAP) durchgeführt werden. Auch die Analyse von VOC-Profilen im Pansengas von Wiederkäuern könnte als potentielles Diagnostikum (z. B. für Störungen der Pansenfermentation) interessant sein.

5 Zusammenfassung

Flüchtige organische Substanzen als Biomarker von Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Die Etablierung einer Methode zur Messung von flüchtigen organischen Substanzen im Headspace von Bakterienkulturen und im Atemgas von adulten Rindern und die Untersuchung von möglichen Einflussfaktoren.

Einleitung

Flüchtige organische Substanzen (volatile organic compounds, VOC) werden zunehmend als potentielle diagnostische Marker angesehen. Vor allem für Erkrankungen, bei denen bisherige Diagnostika nicht zufriedenstellend effizient sind, kann die Analyse von VOC über Bakterienkulturen bspw. zur Beschleunigung und Vereinfachung des kulturellen Nachweises beitragen. Aber auch für Krankheitsbilder, für die möglichst nicht-invasive Screeningmethoden gesucht werden, ist die Analyse von VOC im Atemgas oder im Gasraum über nativen Proben (z. B. Kot, Sputum, Harn) sehr vielversprechend.

Paratuberkulose betrifft alle Haus- und Wildwiederkäuer und wird durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verursacht. Infizierte Tiere entwickeln eine chronische granulomatöse Enteritis, wobei die Inkubationszeit Jahre umfasst und Symptome, wie intermittierende Diarrhoe und Gewichtsverlust, sehr unspezifisch sind. Aktuell verfügbare diagnostische Methoden sind arbeitsintensiv, langwierig, teuer und unzureichend sensitiv. Aufgrund der hohen Prävalenz von Paratuberkulose in Milchviehherden, ist eine schnelle, nicht-invasive und preiswerte Screeningmethode notwendig.

Ziele

Das Hauptziel dieser Arbeit war es ein robustes VOC-Profil im Gasraum über MAP-Kulturen zu finden, welches von anderen Mykobakterien-Spezies abgrenzbar ist, und dieses auf relevante Einflussfaktoren, die zu seiner Variabilität beitragen, hin zu untersuchen (*in vitro*). Ein weiteres Ziel war es einen technischen Aufbau zu etablieren, der es ermöglicht VOC im Atemgas von adulten Rindern unter Feldbedingungen in Echtzeit zu analysieren und diesen Aufbau an Tieren unterschiedlichsten Alters, Körperkondition und Atmungsfrequenzen anzuwenden und mögliche Einflussfaktoren zu definieren (*in vivo*).

Material und Methoden

In-vitro-Studien

Mithilfe von *In-vitro*-Studien wurden Spezies-spezifische VOC-Profile erstellt, die im Gasraum über verschiedenen Mykobakterien zu messen sind. Dabei wurden 3 verschiedene MAP-Stämme und 12 weitere Mykobakterien-Spezies (15 verschiedene Stämme) eingesetzt und die Einflussfaktoren Nährmedium, Inkubationszeit und Keimzahl des Inokulates evaluiert. Unter Zuhilfenahme von Daten einer zuvor publizierten Studie wurde ein studienübergreifendes Core-VOC-Profil für MAP definiert und seine Robustheit statistisch analysiert und getestet.

In-vivo-Studien

Der technische Aufbau zur Atemgasanalyse in Echtzeit wurde an 83 klinisch gesunden adulten Rindern unter Feldbedingungen evaluiert. Physiologische Einflussfaktoren auf das Atemgasprofil, wie Tag, Tageszeit und Adaptation an die Untersuchungsbedingungen, wurden mithilfe einer experimentellen Studie an zwei Jungrindern getestet.

Ergebnisse

In-vitro-Studien

Das Vorkommen von replizierenden Mykobakterien (mit speziellem Hinblick auf MAP) konnte mithilfe der VOC-Analytik im Gasraum der Bakterienkulturen detektiert werden. Vergleichend zu den Substanzkonzentrationen in den Kontrollröhrchen gab es VOC, deren Konzentration über den Bakterienkulturen anstieg und Substanzen, deren Konzentration abfiel. Aus den Ergebnissen von drei Studien konnte ein MAP-assoziiertes Core-VOC-Profil extrahiert werden. Es setzte sich aus 28 Substanzen sechs verschiedener chemischer Stoffklassen zusammen (Aldehyde, Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Furane, Ketone und Ester), die in allen drei Studien jeweils die gleiche Tendenz aufwiesen (Konzentrationsanstieg bzw. -abfall). Die Faktoren Inkubationszeit und Keimzahl des Inokulates haben einen quantitativen Einfluss auf die einzelnen Substanzen des VOC-Profiles. Unterschiedliche Nährmedien haben sowohl einen quantitativen als auch einen qualitativen Einfluss.

In-vivo-Studien

Die methodisch erstmals etablierte Atemgasanalyse in Echtzeit wurde von allen Tieren gut toleriert und war unabhängig der Atmungsfrequenz zuverlässig durchführbar und produzierte vertrauenswürdige Daten. Mithilfe des Online-Messverfahrens konnten sowohl kurz- bis mittelfristige als auch langfristige Änderungen der Substanzkonzentration registriert und getrennt analysiert werden. Dies zeigte sich durch die bei Wiederkäuern physiologisch auftretenden Eruptionen von Pansengas, die zu einem Konzentrationsanstieg der meisten VOC der sich an die Eruption anschließenden Expirationen führte. Die VOC unterlagen tageszeitlichen Schwankungen und variierten in ihrer Konzentration auch aufgrund der Messung an unterschiedlichen Tagen. Stress schien auf die Mehrheit von Substanzen einen hohen quantitativen Einfluss zu haben.

Schlussfolgerungen

In-vitro-Studien

Das bakterielle VOC-Profil unterliegt einer Reihe von Einflussfaktoren, die für eine potentielle diagnostische Anwendung zukünftig standardisiert werden müssen. Des Weiteren gibt es Faktoren, wie z. B. Alter oder Charge des Nährmediums, die ebenfalls einen Einfluss haben, allerdings nicht standardisierbar sind. Obwohl die standardisierbaren als auch die nicht standardisierbaren Einflussfaktoren in den drei Studien teilweise Unterschiede aufwiesen, ergaben die beiden statistischen Tests ähnliche Ergebnisse, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das studienübergreifende Core-VOC-Profil für MAP robust ist. Mit der Überprüfung dieses MAP-anzeigenden VOC-Profil über nativen Proben (Kot oder Gewebe) und der weiteren Abgrenzung dieses Profils zu anderen Bakterienfamilien wird sich das diagnostische Potential und die damit verbundene Spezifität und Sensitivität der Methode weiter herausstellen.

In-vivo-Studien

Eine Atemgasanalyse in Echtzeit ist vor allem dann notwendig, wenn kurz- bis mittelfristige Änderungen der Substanzkonzentrationen während der Messung zu erwarten sind. Dies zeigte sich in unseren Untersuchungen durch das Auftreten von Kontaminationen des Atemgases durch Pansengase. Mithilfe des Online-Messverfahrens konnte gezeigt werden, dass die Eruptionen bei Rindern einen quantitativen Einfluss auf die VOC-Konzentrationen in den darauffolgenden Expirationen haben. Des Weiteren haben die evaluierten Einflüsse von (Tag,

Tageszeit und Handling bzw. Stress) gezeigt, dass auch Atemgasmessungen standardisiert werden sollten um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen.

6 Summary

Volatile organic compounds as biomarker for infections caused by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. The establishment of a method to measure volatile organic compounds in the headspace of bacterial cultures and in breath of adult cattle and the investigation of possible influencing factors.

Introduction and Objective

Volatile organic compounds (VOC) as potential markers for disease detection have gained increased attention. Especially the analysis of VOC above bacterial cultures is considered as promising approach towards acceleration and simplification of the diagnosis via cultural isolation. On the other hand, the analysis of VOC in breath or above body fluids (such as faeces, sputum or urine) offers the possibility of non-invasive screening methods.

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) causes paratuberculosis, a chronic granulomatous enteritis affecting all ruminants. The symptoms, intermittently appearing diarrhoea and weight loss, are aspecific while incubation takes years. Current available diagnostic methods are very labour intensive, time consuming, expensive and insufficiently sensitive. Also, a rapid, non-invasive and low-priced screening method is needed due to the increasing prevalence of paratuberculosis in dairy cattle and herds.

The main goal of this study was to define a robust VOC-profile in the headspace of MAP-cultures, which is definable to other mycobacterial species (*in vitro*). Also, factors which contribute to the variability of the VOC-profile were investigated. A further aim was to introduce a technical set-up for real-time breath analysis in adult cattle (*in vivo*). Applicability of the system to conscious cattle of different age and with variable body condition and respiratory rates as well as the reliability of the signals obtained under field conditions were to be tested.

Animals, material and methods

In-vitro-studies

By means of different *in-vitro*-studies species-specific VOC-profiles were measured in the headspace of different mycobacteria. Three different MAP-strains and twelve further mycobacterial species (15 different strains) were investigated, and the influencing factors (i. e. culture medium, duration of incubation and microbial count of the inoculum) were evaluated. A MAP-associated core-VOC-profile was defined based on data of a previously published study and was comparatively analysed with two approaches to ensure statistical robustness consisting of a set-based intersection analysis and a meta-statistical analysis.

In-vivo-studies

The technical set-up for breath analysis in real-time was applied under field conditions to 83 clinically healthy adult cattle. Physiological influencing factors, such as day, time of day and handling of the animals, were tested by means of an experimental study on two calves.

Results

In-vitro-studies

The presence of replicating mycobacteria, with special regard to MAP, could be detected by means of VOC-analysis in the headspace of bacterial cultures. The concentration of the

substances above bacterial cultures either increased or decreased compared to pure media vials (control vials). Taking data of three independent studies into account a MAP-associated core-VOC-profile could be extracted. The core-VOC-profile contained 28 substances from six different chemical classes (aldehydes, hydrocarbons, alcohols, furans, ketones and ester), which performed identically in all three studies (increase or decrease of concentration). The two factors duration of incubation and bacterial count of the inoculum influenced the single substances of the VOC-profile quantitatively while differing culture media affected the profile both quantitatively and qualitatively.

In-vivo-studies

The breath analysis in real-time was well tolerated by each of the cows and produced consistent data sets throughout varying respiratory rates. Both short-term, medium-term and long-term changes could be detected by means of online breath analysis and could be analysed separately from each other. This was shown via physiologically occurring eructations of ruminal gases of ruminants, which led to increased substance concentrations in the subsequent expirations. Variations of substance concentrations showed a sensitivity to measurements taken on different days or at different times of the day. Adaptation to the procedure seemed to have a substantial impact and influenced substances quantitatively.

Conclusions

In-vitro-studies

The bacterial VOC-profile may vary due to a number of influencing factors that need to be standardised for a potential diagnostic approach. Further factors, such as age or batch of the culture media have an impact and cannot be standardised. Even though the three individual studies were carried out with slight differences in methodology, the robustness of the defined core-volatome is justified by the outcome of a two-step statistical analysis of data consisting of a set-based intersection analysis and a meta-statistical analysis. To prove the diagnostic potential of the MAP-associated core-VOC-profile and therefore specificity and sensitivity of the method VOC need to be analysed in field samples (faeces and tissue). Also the profile needs to be evaluated with respect to possible overlapping VOC from other bacteria.

In-vivo-studies

A breath analysis in real-time is especially necessary for measurements with expected short and medium-term changes in substance concentration. This was shown due to the occurrence of contaminations of the measurements by ruminal gases. By means of the online-analysis of breath we recognised the quantitative impact of eructations of cattle on the concentrations of VOC in subsequent expirations. Further influencing factors (i. e. day, time of day and training) stress the importance of standardised protocols for breath analysis to achieve repeatable results in conscious animals.

7 Literaturverzeichnis

Abbott SM, Elder JB, Španěl P, Smith D (2003): Quantification of acetonitrile in exhaled breath and urinary headspace using selected ion flow tube mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 228: 655-665.

Ahmed WM, Lawal O, Nijsen TM, Goodacre R, Fowler SJ (2017): Exhaled Volatile Organic Compounds of Infection: A Systematic Review. *ACS Infect Dis*: 695-710.

Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Moore GE, Wu CC (2009): Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 136: 177-179.

Allardyce RA, Hill AL, Murdoch DR (2006a): The rapid evaluation of bacterial growth and antibiotic susceptibility in blood cultures by selected ion flow tube mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55: 255-261.

Allardyce RA, Langford VS, Hill AL, Murdoch DR (2006b): Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *J Microbiol Methods* 65: 361-365.

Alonso M, Godayol A, Antico E, Sanchez JM (2011): Needle microextraction trap for on-site analysis of airborne volatile compounds at ultra-trace levels in gaseous samples. *J Sep Sci* 34: 2705-2711.

Altomare DF, Di Lena M, Porcelli F, Trizio L, Travaglio E, Tutino M, Dragonieri S, Memeo V, de Gennaro G (2013): Exhaled volatile organic compounds identify patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 100: 144-150.

Amann A, Smith D (2005): Breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring. World Scientific, Singapore: i–xviii.

Amann A, Costello Bde L, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Pleil J, Ratcliffe N, Risby T (2014a): The human volatilome: volatile organic compounds (VOC) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res* 8: 034001.

Amann A, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Ligor T, Jezierski T, Pleil J, Risby T (2014b): Analysis of exhaled breath for disease detection. *Annu Rev Anal Chem* 7: 455-482.

Antognoli C, Hirst HL, Garry FB, Salman MD (2007): Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses Public Health* 54: 152-159.

Appelmelk BJ, den Dunnen J, Driessen NN, Ummels R, Pak M, Nigou J, Larrouy-Maumus G, Gurcha SS, Movahedzadeh F, Geurtsen J, Brown EJ, Smeets MME, Besra GS, Willemsen PTJ, Lowary TL, van Kooyk Y, Maaskant JJ, Stoker NG, van der Ley P, Puzo G, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Wieland CW, van der Poll T, Geijtenbeek TBH, van der Sar AM, Bitter W (2008): The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the Mycobacterium-host interaction. *Cell Microbiol* 10: 930-944.

- Aranaz A, Liebana E, Pickering X, Novoa C, Mateos A, Dominguez L (1996):** Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *Vet Rec* 138: 276-280.
- Atreya R, Bulte M, Gerlach GF, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, Meens J, Möbius P, Roeb E, Weiss S (2014):** Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Int J Med Microbiol* 304: 858-867.
- Aussel L, Beuzon CR, Cascales E (2016):** Meeting report: Adaptation and communication of bacterial pathogens. *Virulence* 7: 481-490.
- Awano S, Koshimune S, Kurihara E, Gohara K, Sakai A, Soh I, Hamasaki T, Ansai T, Takehara T (2004):** The assessment of methyl mercaptan, an important clinical marker for the diagnosis of oral malodor. *J Dent* 32: 555-559.
- Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I (2004):** Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol* 103: 209-217.
- Ayele WY, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I (2005):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* 71: 1210-1214.
- Baldwin AD (1977):** Anstie's alcohol limit: Francis Edmund Anstie 1833-1874. *Am J Public Health* 67: 679-681.
- Bang B (1906).** Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde: Autoreferat mit einigen Zusätzen. *Berl Tierarztl Wochenschr* 41-42
- Baranska A, Tigchelaar E, Smolinska A, Dallinga JW, Moonen EJ, Dekens JA, Wijmenga C, Zhernakova A, van Schooten FJ (2013):** Profile of volatile organic compounds in exhaled breath changes as a result of gluten-free diet. *J Breath Res* 7: 037104.
- Barry CE, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y (1998):** Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res* 37: 143-179.
- Baumbach JI (2006):** Process analysis using ion mobility spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 384: 1059-1070.
- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM (2001):** Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol* 39: 1517-1521.
- Beaudeau F, Belliard M, Joly A, Seegers H (2007):** Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) infection in dairy cows. *Vet Res* 38: 625-634.
- Bech-Nielsen S, Jorgensen JB, Ahrens P, Feld NC (1992):** Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J Clin Microbiol* 30: 613-618.

- Beck HC, Hansen AM, Lauritsen FR (2002):** Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosum*. *Enzyme Microb Technol* 31: 94-101.
- Beck HC (2005):** Branched-chain fatty acid biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* 243: 37-44.
- Benazzi S, Berrada J, Schliesser T (1995):** First report of paratuberculosis (Johne's disease) in sheep in Morocco. *Zentralbl Veterinärmed B* 42: 339-344.
- Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J (1987):** Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec* 121: 142-146.
- Bergmann A, Trefz P, Fischer S, Klepik K, Walter G, Steffens M, Ziller M, Schubert JK, Reinhold P, Köhler H, Miekisch W (2015):** *In vivo* Volatile Organic Compound Signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One* 10: e0123980.
- Biasioli F, Gasperi F, Yeretjian C, Märk TD (2011):** PTR-MS monitoring of VOC and BVOC in food science and technology. *Trends Analyt Chem* 30: 968-977.
- Biet F, Boschioli ML (2014):** Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res Vet Sci* 97: S69-S77.
- Bögli-Stuber K, Kohler C, Seitert G, Glanemann B, Antognoli M, Salman M, Wittenbrink M, Wittwer M, Wassenaar T, Jemmi T (2005):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J Appl Microbiol* 99: 587-597.
- Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ (2013):** Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog* 9: e1003311.
- Boue SM, Shih BY, Carter-Wientjes CH, Cleveland TE (2005):** Effect of soybean lipoxygenase on volatile generation and inhibition of *Aspergillus flavus* mycelial growth. *J Agric Food Chem* 53: 4778-4783.
- Bratanovic U, Doguer M, Katic I, Kocjan L, Kujumgiev I, Tunki B, Yilmaz S (1965):** Incidence of Johne's disease in south-eastern europe. *Vet Rec* 77: 191-193.
- Brennan PJ, Nikaido H (1995):** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64: 29-63.
- Brode SK, Daley CL, Marras TK (2014):** The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 18: 1370-1377.
- Brodrick E, Davies A, Neill P, Hanna L, Williams EM (2015):** Breath analysis: translation into clinical practice. *J Breath Res* 9: 027109.
- Bunge M, Araghipour N, Mikoviny T, Dunkl J, Schnitzhofer R, Hansel A, Schinner F, Wisthaler A, Margesin R, Mark TD (2008):** On-line monitoring of microbial volatile metabolites by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74: 2179-2186.

- Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A (2007):** Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed Chromatogr* 21: 553-566.
- Buszewski B, Ratiu IA, Milanowski M, Pomastowski P, Ligor T (2018):** The effect of biosilver nanoparticles on different bacterial strains' metabolism reflected in their VOC profiles. *J Breath Res* 12: 027105.
- Carroll W, Lenney W, Wang T, Spanel P, Alcock A, Smith D (2005):** Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatr Pulmonol* 39: 452-456.
- Chambers ST, Bhandari S, Scott-Thomas A, Syhre M (2011):** Novel diagnostics: progress toward a breath test for invasive *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 49: 54-61.
- Chen S, Mahadevan V, Zieve L (1970):** Volatile fatty acids in the breath of patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 75: 622-627.
- Chiodini RJ, van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984a):** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet* 74: 218-262.
- Chiodini RJ, van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR, Coutu JA (1984b):** Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 20: 966-971.
- Chiodini RJ (1989):** Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev* 2: 90-117.
- Christopher-Hennings J, Dammen MA, Weeks SR, Epperson WB, Singh SN, Steinlicht GL, Fang Y, Skaare JL, Larsen JL, Payeur JB (2003):** Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *J Vet Diagn Invest* 15: 87-93.
- Church J, Williams H (2001):** Another sniffer dog for the clinic? *Lancet* 358: 930.
- Clark DL, Jr., Koziczowski JJ, Radcliff RP, Carlson RA, Ellingson JL (2008):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 91: 2620-2627.
- Clarke CJ (1997):** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol* 116: 217-261.
- Collins DM, Stephens DM, de Lisle GW (1993):** Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol* 36: 289-299.
- Collins MT, Kenefick KB, Sockett DC, Lambrecht RS, McDonald J, Jorgensen JB (1990):** Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J Clin Microbiol* 28: 2514-2519.
- Collins MT (1996):** Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 357-371.

- Collins MT, Lisby G, Moser C, Chicks D, Christensen S, Reichelderfer M, Hoiby N, Harms BA, Thomsen OO, Skibsted U, Binder V (2000):** Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. *J Clin Microbiol* 38: 4373-4381.
- Corbett CS, de Buck J, Orsel K, Barkema HW (2017):** Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in group-housed dairy calves. *Vet Res* 48: 27.
- Corn JL, Manning EJ, Sreevatsan S, Fischer JR (2005):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol* 71: 6963-6967.
- Cousins D, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans R, Kluver P (1999):** Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes* 13: 431-442.
- Cox CD, Parker J (1979):** Use of 2-aminoacetophenone production in identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 9: 479-484.
- Cox J, Drane D, Jones S, Ridge S, Milner A (1991):** Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* 68: 157-160.
- Crespo E, de Ronde H, Kuijper S, Pol A, Kolk AHJ, Cristescu SM, Anthony RM, Harren FJM (2012):** Potential biomarkers for identification of mycobacterial cultures by proton transfer reaction mass spectrometry analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 26: 679-685.
- Critchley A, Elliott TS, Harrison G, Mayhew CA, Thompson JM, Worthington T (2004):** The proton transfer reaction mass spectrometer and its use in medical science: applications to drug assays and the monitoring of bacteria. *Int J Mass Spectrom* 239: 235-241.
- Crofford OB, Mallard RE, Winton RE, Rogers NL, Jackson JC, Keller U (1977):** Acetone in breath and blood. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 88: 128-139.
- Crowther RW, Polydorou K, Nitti S, Phyrilla A (1976):** Johne's disease in sheep in Cyprus. *Vet Rec* 98: 463.
- Dargatz DA, Byrum BA, Barber LK, Sweeney RW, Whitlock RH, Shulaw WP, Jacobson RH, Stabel JR (2001):** Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 218: 1163-1166.
- Dargatz DA, Byrum BA, Collins MT, Goyal SM, Hietala SK, Jacobson RH, Koprak CA, Martin BM, McCluskey BJ, Tewari D (2004):** A multilaboratory evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay test for the detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *J Vet Diagn Invest* 16: 509-514.
- Davidson RM (1970):** Ovine Johne's disease in New Zealand. *N Z Vet J* 18: 28-31.
- de Juan L, Mateos A, Dominguez L, Sharp JM, Stevenson K (2005):** Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 106: 249-257.

- de Lisle GW, Seguin P, Samagh BS, Corner AH, Duncan JR (1980):** Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can J Comp Med* 44: 177-182.
- Dhiman RK, Dinadayala P, Ryan GJ, Lenaerts AJ, Schenkel AR, Crick DC (2011):** Lipoarabinomannan Localization and Abundance during Growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 193: 5802-5809.
- Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A (2003):** Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 18: 1209-1218.
- Dicke M, Loreto F (2010):** Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends Plant Sci* 15: 115-117.
- Diskin AM, Spanel P, Smith D (2003a):** Time variation of ammonia, acetone, isoprene and ethanol in breath: a quantitative SIFT-MS study over 30 days. *Physiol Meas* 24: 107-119.
- Diskin AM, Spanel P, Smith D (2003b):** Increase of acetone and ammonia in urine headspace and breath during ovulation quantified using selected ion flow tube mass spectrometry. *Physiol Meas* 24: 191-199.
- Donat K, Soschinka A, Erhardt G, Brandt HR (2014):** Paratuberculosis: decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* depends on within-herd prevalence. *Animal* 8: 852-858.
- Douarre PE, Cashman W, Buckley J, Coffey A, O'Mahony JM (2010):** Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog* 2: 11.
- Dufour B, Pouillot R, Durand B (2004):** A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet Res* 35: 69-81.
- Duveen DI, Klickstein HS (1955):** Antoine Laurent Lavoisier's contributions to medicine and public health. *Bull Hist Med* 29: 164-179.
- Eamens G, Whittington R, Marsh I, Turner M, Saunders V, Kemsley P, Rayward D (2000):** Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol* 77: 357-367.
- Eisenmann A, Amann A, Said M, Datta B, Ledochowski M (2008):** Implementation and interpretation of hydrogen breath tests. *J Breath Res* 2: 046002.
- Elgaali H, Hamilton-Kemp TR, Newman MC, Collins RW, Yu KS, Archbold DD (2002):** Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. *J Basic Microbiol* 42: 373-380.
- Elschner M (2005):** Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09.-11. März 2005
- Englund S, Bölske G, Johansson KE (2002):** An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 209: 267-271.

- Erume J, Spergser J, Rosengarten R (2001):** Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr Health Sci* 1: 83-89.
- Espeschit IF, Schwarz DGG, Faria ACS, Souza MCC, Paolicchi FA, Juste RA, Carvalho IA, Moreira MAS (2017):** Paratuberculosis in Latin America: a systematic review. *Trop Anim Health Prod* 49: 1557-1576.
- Falkinham 3rd JO (1996):** Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9: 177-215.
- Ferreira R, Fonseca LS, Lilenbaum W (2002):** Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol* 35: 173-175.
- Filipiak W, Sponring A, Baur MM, Ager C, Filipiak A, Wiesenhofer H, Nagl M, Troppmair J, Amann A (2012a):** Characterization of volatile metabolites taken up by or released from *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by using GC-MS. *Microbiol* 158: 3044-3053.
- Filipiak W, Sponring A, Baur MM, Filipiak A, Ager C, Wiesenhofer H, Nagl M, Troppmair J, Amann A (2012b):** Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 12: 113.
- Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, Baur M, Ager C, Wiesenhofer H, Margesin R, Nagl M, Troppmair J, Amann A (2013):** Volatile Organic Compounds (VOC) released by Pathogenic Microorganisms *in vitro*: Potential Breath Biomarkers. *Volatile Biomarkers: Non-Invasive Diagnosis in Physiology and Medicine*: 463.
- Filipiak W, Beer R, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schiefecker A, Lanthaler S, Helbok R, Nagl M, Troppmair J, Amann A (2015):** Breath analysis for *in vivo* detection of pathogens related to ventilator-associated pneumonia in intensive care patients: a prospective pilot study. *J Breath Res* 9: 016004.
- Fischer S, Bergmann A, Steffens M, Trefz P, Ziller M, Miekisch W, Schubert JS, Köhler H, Reinhold P (2015a):** Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model. *J Breath Res* 9: e047113.
- Fischer S, Trefz P, Bergmann A, Steffens M, Ziller M, Miekisch W, Schubert JS, Köhler H, Reinhold P (2015b):** Physiological variability in volatile organic compounds (VOC) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model. *J Breath Res* 9: e027108.

- Fridman E, Wang J, Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E (2005):** Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* 17: 1252-1267.
- Gaida A, Holz O, Nell C, Schuchardt S, Lavae-Mokhtari B, Kruse L, Boas U, Langejuergen J, Allers M, Zimmermann S, Vogelmeier C, Koczulla AR, Hohlfeld JM (2016):** A dual center study to compare breath volatile organic compounds from smokers and non-smokers with and without COPD. *J Breath Res* 10: 026006.
- Gao J, Zou Y, Wang Y, Wang F, Lang L, Wang P, Zhou Y, Ying K (2016):** Breath analysis for noninvasively differentiating *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia from its respiratory tract colonization of ventilated patients. *J Breath Res* 10: 027102.
- Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, White P, Spencer R, Probert CS, Ratcliffe NM (2007):** Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *Faseb j* 21: 1675-1688.
- Ghittori S, Alessio A, Negri S, Maestri L, Zadra P, Imbriani M (2004):** A field method for sampling toluene in end-exhaled air, as a biomarker of occupational exposure: correlation with other exposure indices. *Ind Health* 42: 226-234.
- Gierke F (2009):** Ermittlung von Einflussfaktoren auf die *intra vitam* Diagnostik der Paratuberkulose. Berlin, FU, veterinärmed. Fak., Inaugural – Diss
- Goto H, Yachida S, Shirahata T, Shimizu K, Ono T (1972):** Some observations on bovine paratuberculosis in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 34: 291-296.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT (1998):** Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett Appl Microbiol* 26: 166-170.
- Grote C, Pawliszyn J (1997):** Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem* 69: 587-596.
- Groves WA, Zellers ET (2001):** Analysis of solvent vapors in breath and ambient air with a surface acoustic wave sensor array. *Ann Occup Hyg* 45: 609-623.
- Gumber S, Eamens G, Whittington RJ (2006):** Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet Microbiol* 115: 91-101.
- Gumber S, Taylor DL, Marsh IB, Whittington RJ (2009):** Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol* 133: 344-357.
- Gumber S, Whittington RJ (2009):** Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to heat. *Vet Microbiol* 136: 82-90.
- Gunnarsson E (1979):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from sheep and cattle in Iceland. *Acta Vet Scand* 20: 191-199.

- Han J, Chan HW, Calvin M (1969):** Biosynthesis of alkanes in *Nostoc muscorum*. J Am Chem Soc 91: 5156-5159.
- Handa H, Usuba A, Maddula S, Baumbach JI, Mineshita M, Miyazawa T (2014):** Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry. PLoS One 9: e114555.
- Harper M (2000):** Sorbent trapping of volatile organic compounds from air. J Chromatogr A 885: 129-151.
- Harrison GR, Critchley ADJ, Mayhew CA, Thompson JM (2003):** Real-time breath monitoring of propofol and its volatile metabolites during surgery using a novel mass spectrometric technique: a feasibility study. Br J Anaesth 91: 797-799.
- Hayden GF (1980):** Olfactory diagnosis in medicine. Postgrad Med 67: 110-116.
- He Z, de Buck J (2010):** Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. Proteome Sci 8: 21.
- Hendrick SH, Duffield TE, Kelton DE, Leslie KE, Lissemore KD, Archambault M (2005):** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. J Am Vet Med Assoc 226: 424-428.
- Herbig J, Muller M, Schallhart S, Titzmann T, Graus M, Hansel A (2009):** On-line breath analysis with PTR-TOF. J Breath Res 3: 027004.
- Hildenbrand A (2009):** Variabilität und Reproduzierbarkeit lungenfunktionsdiagnostischer Kenngrößen klinisch gesunder Schafe. Berlin, FU, veterinärmed. Fak., Inaugural – Diss
- Hlastala M, Wranne B, Lenfant C (1973):** Cyclical variations in FRC and other respiratory variables in resting man. J Appl Physiol 34: 670-676.
- Hockelmann C, Juttner F (2004):** Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of *Calothrix* and *Plectonema*. Water Sci Technol 49: 47-54.
- Holmstrom A, Kyhlstedt U, Robertsson JA, Stengarde L (2003):** Control of paratuberculosis in Sweden. Acta Vet Scand 44: 285-286.
- Hubbard RS (1920):** Determination of acetone in expired air. J. Biol. Chem 43: 57-65.
- Huda A, Jensen HE (2003):** Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. J Comp Pathol 129: 259-267.
- Huda A, Jungersen G, Lind P (2004):** Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet Microbiol 104: 43-53.
- Ikonomopoulos J, Balaskas C, Kantzoura B, Fragiadaki E, Pavlik I, Bartos M, Lukas JC, Gazouli M (2007):** Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture. Vet J 174: 337-343.

- Insam H, Seewald MS (2010):** Volatile organic compounds (VOC) in soils. *Biol Fertil Soils* 46: 199-213.
- Jardine CG, Gibson N, Hrudehy SE (1999):** Detection of odour and health risk perception of drinking water. *Water Sci Technol* 40: 91-98.
- Jarlier V, Nikaido H (1994):** Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 123: 11-18.
- Johne HA, Frothingham L (1895):** Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch Z Tiermed Pathol* 21: 438-453.
- Jolly A, Colavecchia SB, Fernandez B, Fernandez E, Mundo SL (2011):** Antibodies Induced by Lipoarabinomannan in Bovines: Characterization and Effects on the Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Macrophages *In vitro*. *Vet Med Int* 2011: 258479.
- Jones A, Beylich K, Bjørneboe A, Ingum J, Mørland J (1992):** Measuring ethanol in blood and breath for legal purposes: variability between laboratories and between breath-test instruments. *Clin Chem* 38: 743-747.
- Jorgensen JB (1972):** Studies on the occurrence of paratuberculosis in cattle in Denmark. *Nord Vet Med* 24: 297-308.
- Julak J, Stranska E, Prochazkova-Francisci E, Rosova V (2000):** Blood cultures evaluation by gas chromatography of volatile fatty acids. *Med Sci Monit* 6: 605-610.
- Junger M, Vautz W, Kuhns M, Hofmann L, Ulbricht S, Baumbach JI, Quintel M, Perl T (2012):** Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: a new identification tool for human pathogenic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 2603-2614.
- Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P (2002):** Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 453-460.
- Kai M, Effmert U, Berg G, Piechulla B (2007):** Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* 187: 351-360.
- Kalis CH, Hesselink JW, Russchen EW, Barkema HW, Collins MT, Visser IJ (1999):** Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 11: 345-351.
- Kalis CH, Collins MT, Hesselink JW, Barkema HW (2003):** Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet Microbiol* 97: 73-86.
- Kamysek S, Fuchs P, Schwoebel H, Roesner JP, Kischkel S, Wolter K, Loeseken C, Schubert JK, Miekisch W (2011):** Drug detection in breath: effects of pulmonary blood flow and cardiac output on propofol exhalation. *Anal Bioanal Chem* 401: 2093-2102.
- Kasbohm E, Fischer S, Küntzel A, Oertel P, Bergmann A, Trefz P, Miekisch W, Schubert J, Reinhold P, Ziller M, Fröhlich A, Liebscher V, Köhler H (2017):** Strategies for the identification of disease-related patterns of volatile organic compounds: prediction of paratuberculosis in an animal model using random forests. *J Breath Res* 11: 047105.

- Katayama N, Tanaka C, Fujita T, Saitou Y, Suzuki S, Onouchi E (2000):** Effect of ensilage on inactivation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Grassland Science 46: 282-288.
- Kerr HD (1973):** Diurnal Variation of Respiratory Function, Independent of Air Quality. Arch Environ Health 26: 144-152.
- Khol JL, Geisbauer E, Wassertheurer M, Revilla-Fernandez S, Damoser J, Oesterreicher E, Dunser M, Kleb U, Baumgartner W (2012):** Outcome of three commercial serum ELISAs and faecal detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in consecutive samples from a cattle herd with low prevalence of paratuberculosis (Johne's disease). Transbound Emerg Dis 59: 197-207.
- Kim K-H, Jahan SA, Kabir E (2012):** A review of breath analysis for diagnosis of human health. Trends Analyt Chem 33: 1-8.
- Kim Y, Bech-Nielsen S, Gordon J, Slemons R, Spangler E (1989):** Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. Am J Vet Res 50: 1110-1113.
- King J, Kupferthaler A, Unterkofler K, Koc H, Teschl S, Teschl G, Miekisch W, Schubert J, Hinterhuber H, Amann A (2009):** Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer. J Breath Res 3: 027006.
- Kistler M, Szymczak W, Fedrigo M, Fiamoncini J, Hollriegl V, Hoeschen C, Klingenspor M, Hrabe de Angelis M, Rozman J (2014):** Effects of diet-matrix on volatile organic compounds in breath in diet-induced obese mice. J Breath Res 8: 016004.
- Kistler M, Muntean A, Szymczak W, Rink N, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wurst W, Hoeschen C, Klingenspor M, Hrabe de Angelis M, Rozman J (2016):** Diet-induced and mono-genetic obesity alter volatile organic compound signature in mice. J Breath Res 10: 016009.
- Klawonn W, Cussler K, Drager KG, Gyra H, Köhler H, Zimmer K, Hess RG (2002):** The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate. Dtsch Tierarztl Wochenschr 109: 510-516.
- Klein PD, Malaty HM, Martin RF, Graham KS, Genta RM, Graham DY (1996):** Noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in clinical practice: the ¹³C urea breath test. Am J Gastroenterol 91: 690-694.
- Klisch M, Kuder T, Philp RP, McHugh TE (2012):** Validation of adsorbents for sample preconcentration in compound-specific isotope analysis of common vapor intrusion pollutants. J Chromatogr A 1270: 20-27.
- Knief C, Delmotte N, Vorholt JA (2011):** Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. Proteomics 11: 3086-3105.
- Köhler H, Gierke F, Möbius P (2008):** Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis. Magy Allatorvosok Lapja 130: 67-69.
- Konst H, McIntosh C (1958a):** Studies of Johne's Disease In Canada. II. Results of Early Intradermal Testing With Johnin PPD. Can J Comp Med Vet Sci 22: 203.

- Konst H, McIntosh C (1958b):** Studies Of Johne's Disease In Canada. I. The Use Of Johnin PPD. *Can J Comp Med Vet Sci* 22: 157.
- Kumar S, Singh S, Sevilla I, Singh A, Whittington R, Juste R, Sharma G, Singh P, Sohal J (2008):** Lacto-incidence and evaluation of 3 tests for the diagnosis of Johne's disease using milk of naturally infected goatherds and genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Small Rumin Res* 74: 37-44.
- Labows JN, McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ (1980):** Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 12: 521-526.
- Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H, Whittington RJ (2004):** Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Aust Vet J* 82: 504-508.
- Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT (1988):** A model for analyzing growth-kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 54: 910-916.
- Larsen A, Vardaman TH, Merkal R (1963):** An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. 1. Significance of intradermic Johnin test. *Am J Vet Res* 24: 91.
- Larsen AB, Baisden LA, Merkal RS (1955):** A comparison of regular intradermic johnin and a purified protein derivative of intradermic johnin on artificially and naturally sensitized ruminants. *Am J Vet Res* 16: 35-37.
- Larsen AB, Merkal RS, Vardaman TH (1956):** Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 17: 549-551.
- Larsen AB, Moon HW, Merkal RS (1971):** Susceptibility of swine to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 32: 589-595.
- Larsen AB, Stalheim OH, Hughes DE, Appell LH, Richards WD, Himes EM (1981):** *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. *J Am Vet Med Assoc* 179: 169-171.
- Larsson L, Mardh PA, Odham G (1978):** Detection of alcohols and volatile fatty acids by head-space gas chromatography in identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 7: 23-27.
- Lechevalier MP, Horan AC, Lechevalier H (1971):** Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. *J Bacteriol* 105: 313-318.
- Lechner M, Fille M, Hausdorfer J, Dierich M, Rieder J (2005):** Diagnosis of bacteria *in vitro* by mass spectrometric fingerprinting: A pilot study. *Curr Microbiol* 51: 267-269.
- Lepper AW, Wilks CR, Kotiw M, Whitehead JT, Swart KS (1989):** Sequential bacteriological observations in relation to cell-mediated and humoral antibody responses of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* and maintained on normal or high iron intake. *Aust Vet J* 66: 50-55.
- Libardoni M, Stevens PT, Waite JH, Sacks R (2006):** Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 842: 13-21.

- Lindinger C, Pollien P, Ali S, Yeretjian C, Blank I, Märk T (2005):** Unambiguous Identification of Volatile Organic Compounds by Proton-Transfer Reaction Mass Spectrometry Coupled with GC/MS. *Anal Chem* 77: 4117-4124.
- Lindinger W, Taucher J, Jordan A, Hansel A, Vogel W (1997):** Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 939-943.
- Lirk P, Bodrogi F, Raifer H, Greiner K, Ulmer H, Rieder J (2003):** Elective haemodialysis increases exhaled isoprene. *Nephrol Dial Transplant* 18: 937-941.
- Liu S, Weitzman I, Johnson GG (1980):** Canine tuberculosis. *J Am Vet Med Assoc* 177: 164-167.
- Lovell R, Levi M, Francis J (1944):** Studies on the survival of Johne's bacilli. *J Comp Pathol Ther* 54: 120-129.
- Lybeck KR, Lovoll M, Johansen TB, Olsen I, Storset AK, Valheim M (2013):** Intestinal strictures, fibrous adhesions and high local interleukin-10 levels in goats infected naturally with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Comp Pathol* 148: 157-172.
- M'Fadyean J, Sheather A, Edwards J (1916):** Johne's Disease: The Reactions of Animals to "Johnin.". *J Comp Pathol Ther* 29: 134-171.
- Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC (2005):** Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1286-1291.
- Mackie A, Wheatley R (1999):** Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biol Biochem* 31: 375-385.
- Mackintosh CG, de Lisle GW, Collins DM, Griffin JF (2004):** Mycobacterial diseases of deer. *N Z Vet J* 52: 163-174.
- Manning EJ, Collins MT (2001):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech* 20: 133-150.
- Manolis A (1983):** The diagnostic potential of breath analysis. *Clin Chem* 29: 5-15.
- Mayr D, Margesin R, Klingsbichel E, Hartungen E, Jenewein D, Schinner F, Mark TD (2003):** Rapid detection of meat spoilage by measuring volatile organic compounds by using proton transfer reaction mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 69: 4697-4705.
- McDonald W, Ridge S, Hope A, Condron R (1999):** Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust Vet J* 77: 113-119.
- McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J (1987):** Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 25: 796-801.
- McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC (2005):** Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol* 110: 105-111.

- McNeil MR, Brennan PJ (1991):** Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol* 142: 451-463.
- McNerney R, Mallard K, Okolo PI, Turner C (2012):** Production of volatile organic compounds by mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 328: 150-156.
- Mellors TR, Rees CA, Wieland-Alter WF, von Reyn CF, Hill JE (2017):** The volatile molecule signature of four mycobacteria species. *J Breath Res* 11: e031002.
- Mercier P, Beaudeau F, Laroucau K, Bertin C, Boschioli M-L, Baudry C, Seegers H, Malher X (2009):** Comparative age-related responses to serological and faecal tests directed to *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) in French dairy goats. *Small Rumin Res* 87: 50-56.
- Merkal RS, Larsen AB, Kopecky KE (1968):** Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am J Vet Res* 29: 1533-1538.
- Merkal RS (1973):** Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc* 163: 1100-1102.
- Merkal RS, Curran BJ (1974):** Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol* 28: 276-279.
- Michalak K, Austin C, Diesel S, Bacon MJ, Zimmerman P, Maslow JN (1998):** *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerg Infect Dis* 4: 283-287.
- Michel AL, Bastianello SS (2000):** Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. *Vet Microbiol* 77: 299-307.
- Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF (2004):** Diagnostic potential of breath analysis--focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 347: 25-39.
- Miekisch W, Schubert JK (2006):** From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis. *Trends Analyt Chem* 25: 665-673.
- Miekisch W, Trefz P, Bergmann A, Schubert JK (2014):** Microextraction techniques in breath biomarker analysis. *Bioanalysis* 6: 1275-1291.
- Mieth M, Kischkel S, Schubert JK, Hein D, Miekisch W (2009):** Multibed needle trap devices for on site sampling and preconcentration of volatile breath biomarkers. *Anal Chem* 81: 5851-5857.
- Min D, Boff J (2002):** Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 1: 58-72.
- Möbius P, Hotzel H, Rassbach A, Köhler H (2008):** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 126: 324-333.

- Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O (1996):** The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber Lung Dis* 77: 103-108.
- Mohamed EI, Bruno E, Linder R, Alessandrini M, Di Girolamo A, Poppl SJ, Puija A, De Lorenzo A (2003):** A novel method for diagnosing chronic rhinosinusitis based on an electronic nose. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 30: 447-457.
- Molina A, Morera L, Llanes D (1991):** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am J Vet Res* 52: 863-868.
- Montali RJ, Mikota SK, Cheng LI (2001):** *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech* 20: 291-303.
- Moreira AR, Paolicchi F, Morsella C, Zumarraga M, Cataldi A, Fabiana B, Alicia A, Piet O, van Soolingen D, Isabel RM (1999):** Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 70: 251-259.
- Morgan KL (1987):** Johne's and Crohn's. Chronic inflammatory bowel diseases of infectious aetiology? *Lancet* 1: 1017-1019.
- Moser B, Bodrogi F, Eibl G, Lechner M, Rieder J, Lirk P (2005):** Mass spectrometric profile of exhaled breath-field study by PTR-MS. *Respir Physiol Neurobiol* 145: 295-300.
- Mueller W, Schubert J, Benzing A, Geiger K (1998):** Method for analysis of exhaled air by microwave energy desorption coupled with gas chromatography-flame ionization detection-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 716: 27-38.
- Münster P, Volkel I, Wemheuer W, Schwarz D, Doring S, Czerny CP (2013):** A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound Emerg Dis* 60: 175-187.
- Naccarato WF, Gilbertson JR, Gelman RA (1974):** Effects of different culture media and oxygen upon lipids of *Escherichia coli* K-12. *Lipids* 9: 322-327.
- Nawrath T, Mgone GF, Weetjens B, Kaufmann SH, Schulz S (2012):** The volatiles of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and related bacteria. *Beilstein J Org Chem* 8: 290-299.
- Neelsen F (1892):** Grundriss der pathologisch-anatomischen Technik. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 18: 429-429.
- Ney P, Boland W (1987):** Biosynthesis of 1-alkenes in higher plants. A model study with the composite *Carthamus tinctorius* L. *Eur J Biochem* 162: 203-211.
- Nielsen SS, Toft N (2008):** *Ante mortem* diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microbiol* 129: 217-235.
- O'Hara M, Mayhew CA (2009):** A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res* 3: e027001.

- Oertel P, Küntzel A, Reinhold P, Köhler H, Schubert J, Kolb J, Miekisch W (2018a):** Continuous real-time breath analysis in ruminants: Effect of eructation on exhaled VOC profiles. *J Breath Res* 12: 036014.
- Oertel P, Bergmann A, Fischer S, Trefz P, Küntzel A, Reinhold P, Köhler H, Schubert JK, Miekisch W (2018b):** Evaluation of needle trap micro extraction and solid phase micro extraction: obtaining comprehensive information on volatile emissions from *in vitro* cultures. *Biomed Chromatogr* 14: e4285.
- OIE. (2017).** World Animal Health Information Database (WAHIS Interface) – Version 1. Disease distribution, from http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap: 22.03.2018.
- Palmer MV, Stoffregen WC, Carpenter JG, Stabel JR (2005):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J Wildl Dis* 41: 629-635.
- Park HT, Shin MK, Park HE, Cho YI, Yoo HS (2016):** PCR-based detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in South Korea using fecal samples. *J Vet Med Sci* 78: 1537-1540.
- Patterson DS, Allen WM (1972):** Chronic mycobacterial enteritis in ruminants as a model of Crohn's disease. *Proc R Soc Med* 65: 998-1001.
- Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P (1971):** Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2374-2376.
- Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machackova M, Yayo Ayele W, Horvathova A (2000):** Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol* 77: 231-251.
- Peled N, Ionescu R, Nol P, Barash O, McCollum M, VerCauteren K, Koslow M, Stahl R, Rhyan J, Haick H (2012):** Detection of volatile organic compounds in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Sens Actuators B Chem* 171: 588-594.
- Pereira J, Porto-Figueira P, Cavaco C, Taunk K, Rapole S, Dhakne R, Nagarajaram H, Camara JS (2015):** Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: an overview. *Metabolites* 5: 3-55.
- Perez V, Tellechea J, Corpa JM, Gutierrez M, Garcia Marin JF (1999):** Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res* 60: 123-127.
- Phillips M (1992):** Breath tests in medicine. *Scientific American* 267: 74-79.
- Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, McVay WP (1999):** Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet* 353: 1930-1933.
- Phillips M, Cataneo RN, Condos R, Ring Erickson GA, Greenberg J, La Bombardi V, Munawar MI, Tietje O (2007):** Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* 87: 44-52.

- Pickel D, Manucy GP, Walker DB, Hall SB, Walker JC (2004):** Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Appl Anim Behav Sci* 89: 107-116.
- Pithua P, Espejo LA, Godden SM, Wells SJ (2013):** Is an individual calving pen better than a group calving pen for preventing transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in calves? Results from a field trial. *Res Vet Sci* 95: 398-404.
- Poupart P, Coene M, Van Heuverswyn H, Cocito C (1993):** Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol* 31: 1601-1605.
- Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM (2004):** A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea. *Gut* 53: 58-61.
- Probert CS, Ahmed I, Khalid T, Johnson E, Smith S, Ratcliffe N (2009):** Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases. *J Gastrointest Liver Dis* 18: 337-343.
- Purkhart R, Köhler H, Liebler-Tenorio E, Meyer M, Becher G, Kikowatz A, Reinhold P (2011):** Chronic intestinal Mycobacteria infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *J Breath Res* 5: 027103.
- Purkhart R, Becher G, Reinhold P, Köhler HU (2017):** Detection of mycobacteria by volatile organic compound analysis of *in vitro* cultures using differential ion mobility spectrometry. *J Med Microbiol* 66: 276-285.
- Queralto N, Berliner AN, Goldsmith B, Martino R, Rhodes P, Lim SH (2014):** Detecting cancer by breath volatile organic compound analysis: a review of array-based sensors. *J Breath Res* 8: 027112.
- Rafidinarivo E, Laneelle MA, Montrozier H, Valero-Guillen P, Astola J, Luquin M, Prome JC, Daffe M (2009):** Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. *J Lipid Res* 50: 477-490.
- Raizman EA, Wells SJ, Jordan PA, DelGiudice GD, Bey RR (2005):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res* 69: 32-38.
- Raizman EA, Wells SJ, Godden SM, Fetrow J, Oakes JM (2007):** The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Prev Vet Med* 80: 166-178.
- Raizman EA, Fetrow JP, Wells SJ (2009):** Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci* 92: 4929-4936.
- Rajukumar K, Tripathi BN, Kurade NP, Parihar NS (2001):** An enzyme-linked immunosorbent assay using immonoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISAs. *Vet Res Commun* 25: 539-553.

- Raninen KJ, Lappi JE, Mukkala ML, Tuomainen TP, Mykkanen HM, Poutanen KS, Raatikainen OJ (2016):** Fiber content of diet affects exhaled breath volatiles in fasting and postprandial state in a pilot crossover study. *Nutr Res* 36: 612-619.
- Rankin JD (1961):** The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. III. Calves maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol* 71: 10-15.
- Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Al-Suod H, Kowalkowski T, Rafinska K, Buszewski B (2017):** The effect of growth medium on an *Escherichia coli* pathway mirrored into GC/MS profiles. *J Breath Res* 11: 036012.
- Rawther SS, Saseendranath MR, Nair GP, Tresamol PV, Pillai UN, Abraham J, Senthilkumar TM, Nagalakshmy S, Nimisha KK (2012):** Diagnosis of paratuberculosis in goats by cell mediated immune response, conventional and molecular diagnostic techniques. *Trop Anim Health Prod* 44: 911-914.
- Rees CA, Smolinska A, Hill JE (2016):** The volatile metabolome of *Klebsiella pneumoniae* in human blood. *J Breath Res* 10: 027101.
- Rees CA, Franchina FA, Nordick KV, Kim PJ, Hill JE (2017a):** Expanding the *Klebsiella pneumoniae* volatile metabolome using advanced analytical instrumentation for the detection of novel metabolites. *J Appl Microbiol* 122: 785-795.
- Rees CA, Stefanuto PH, Beattie SR, Bultman KM, Cramer RA, Hill JE (2017b):** Sniffing out the hypoxia volatile metabolic signature of *Aspergillus fumigatus*. *J Breath Res* 11: 036003.
- Richards WD, Thoen CO (1977):** Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Clin Microbiol* 6: 392-395.
- Richter E, Wessling J, Lugerling N, Domschke W, Rusch-Gerdes S (2002):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerg Infect Dis* 8: 729-731.
- Risby TH, Sehnert SS (1999):** Clinical application of breath biomarkers of oxidative stress status. *Free Radic Biol Med* 27: 1182-1192.
- Robacker DC, Bartelt RJ (1997):** Chemicals attractive to Mexican fruit fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Cultures sampled by solid-phase microextraction. *J Chem Ecol* 23: 2897-2915.
- Robacker DC, Lauzon CR, He X (2004):** Volatiles production and attractiveness to the Mexican fruit fly of *Enterobacter agglomerans* isolated from apple maggot and Mexican fruit flies. *J Chem Ecol* 30: 1329-1347.
- Robbe-Austerman S, Krull A, Stabel J (2006):** Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis. *Zoonoses Public Health* 53: 213-217.
- Romano A, Capozzi V, Spano G, Biasioli F (2015):** Proton transfer reaction-mass spectrometry: online and rapid determination of volatile organic compounds of microbial origin. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 3787-3795.
- Rosenberger G (1978):** Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates. Krankheiten des Rindes 2. Auflage. Parey Verlag, Cornell: 756-760.

- Runyon EH (1965):** Typical Mycobacteria: their classification. Am Rev Respir Dis 91: 288-289.
- Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim MJ, Homolka S, Niemann S, Rohde KH (2010):** *Mycobacterium tuberculosis* Wears What It Eats. Cell Host Microbe 8: 68-76.
- Ryu C-M, Farag MA, Hu C-H, Reddy MS, Kloepper JW, Paré PW (2004):** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. Plant physiology 134: 1017-1026.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Pare PW, Kloepper JW (2003):** Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4927-4932.
- Saba A, Raffaelli A, Pucci S, Salvadori P (1999):** A simple method for the extraction of volatile organic compounds contained in air samples from adsorbent materials by solid phase microextraction and their analysis by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 13: 1899-1902.
- Salgado M, Kruze J, Collins MT (2007):** Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. J Vet Diagn Invest 19: 99-102.
- Schöller C, Molin S, Wilkins K (1997):** Volatile metabolites from some gram-negative bacteria. Chemosphere 35: 1487-1495.
- Scholler CE, Gurtler H, Pedersen R, Molin S, Wilkins K (2002):** Volatile metabolites from actinomycetes. J Agric Food Chem 50: 2615-2621.
- Schubert J, Miekisch W, Nöldge-Schomburg G (2005).** VOC breath markers in critically ill patients: potential and limitations. Breath Analysis For Clinical Diagnosis And Therapeutic Monitoring: 267-292.
- Schulz S, Dickschat JS (2007):** Bacterial volatiles: the smell of small organisms. Natural Product Reports 24: 814-842.
- Scotter JM, Langford VS, Wilson PF, McEwan MJ, Chambers ST (2005):** Real-time detection of common microbial volatile organic compounds from medically important fungi by Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry (SIFT-MS). J Microbiol Methods 63: 127-134.
- Scotter JM, Allardyce RA, Langford VS, Hill A, Murdoch DR (2006):** The rapid evaluation of bacterial growth in blood cultures by selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS) and comparison with the BacT/ALERT automated blood culture system. J Microbiol Methods 65: 628-631.
- Seaman JT, Thompson DR (1984):** Johne's disease in sheep. Aust Vet J 61: 227-229.
- Sehnert SS, Jiang L, Burdick JF, Risby TH (2002):** Breath biomarkers for detection of human liver diseases: preliminary study. Biomarkers 7: 174-187.
- Sergeant ES, Marshall DJ, Eamens GJ, Kearns C, Whittington RJ (2003):** Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. Prev Vet Med 61: 235-248.

Sethi S, Nanda R, Chakraborty T (2013): Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 26: 462-475.

Shaw SL, Mitloehner FM, Jackson W, Depeters EJ, Fadel JG, Robinson PH, Holzinger R, Goldstein AH (2007): Volatile organic compound emissions from dairy cows and their waste as measured by proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 41: 1310-1316.

Sherman DM, Gay JM, Bouley DS, Nelson GH (1990): Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res* 51: 461-465.

Sikes D (1953): Sensitivity studies with repeated intradermal Johnin tests in cattle naturally infected with *Mycobacterium Paratuberculosis*; Johne's disease. *Am J Vet Res* 14: 12-15.

Singh AV, Singh SV, Sohal JS, Singh PK (2009): Comparative potential of modified indigenous, indigenous and commercial ELISA kits for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat and sheep. *Indian J Exp Biol* 47: 379-382.

Skilbeck NW (1982): Subclinical Johne's disease in Gippsland cattle. *Aust Vet J* 58: 76-77.

Smith D, Spanel P (2005): Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis. *Mass Spectrom Rev* 24: 661-700.

Smith RL, Strawderman RL, Schukken YH, Wells SJ, Pradhan AK, Espejo LA, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR, Grohn YT (2010): Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *J Dairy Sci* 93: 3513-3524.

Smith RM (2003): Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques. *J Chromatogr A* 1000: 3-27.

Smithwick RW, Bigbie MR, Jr., Ferguson RB, Karlix MA, Wallis CK (1995): Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. *J Clin Microbiol* 33: 2763-2764.

Socket DC, Carr DJ, Collins MT (1992a): Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can J Vet Res* 56: 148-153.

Socket DC, Conrad TA, Thomas CB, Collins MT (1992b): Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J Clin Microbiol* 30: 1134-1139.

Spanel P, Wang T, Smith D (2005): Coordinated FA-MS and SIFT-MS analyses of breath following ingestion of D₂O and ethanol: total body water, dispersal kinetics and ethanol metabolism. *Physiol Meas* 26: 447-457.

Spanel P, Dryahina K, Smith D (2007): Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4-83 years. *J Breath Res* 1: 011001.

Spinhirne JP, Koziel JA, Chirase NK (2004): Sampling and analysis of volatile organic compounds in bovine breath by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1025: 63-69.

St Angelo AJ, Legendre MG, Dupuy HP (1980): Identification of lipoxygenase-linoleate decomposition products by direct gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids* 15: 45-49.

- Stabel J, Bannantine J (2005):** Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. J Clin Microbiol 43: 4744-4750.
- Stabel JR (1996):** Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. J Vet Diagn Invest 8: 345-350.
- Stabel JR (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.
- Steinert M (2014):** Pathogen intelligence. Front Cell Infect Microbiol 4: 8.
- Stephan R (2007):** Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Verbrauch Lebensm 2: 222-227.
- Sternberg S, Viske D (2003):** Control strategies for paratuberculosis in Sweden. Acta Vet Scand 44: 247-249.
- Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM (2002):** Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J Clin Microbiol 40: 1798-1804.
- Stief B, Mobius P, Turk H, Horugel U, Arnold C, Pohle D (2012):** Paratuberculosis in a miniature donkey (*Equus asinus f. asinus*). Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125: 38-44.
- Streeter RN, Hoffsis GF, Bech-Nielsen S, Shulaw WP, Rings DM (1995):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am J Vet Res 56: 1322-1324.
- Strommenger B, Stevenson K, Gerlach G-F (2001):** Isolation and diagnostic potential of IS Mav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 196: 31-37.
- Studer SM, Orens JB, Rosas I, Krishnan JA, Cope KA, Yang S, Conte JV, Becker PB, Risby TH (2001):** Patterns and significance of exhaled-breath biomarkers in lung transplant recipients with acute allograft rejection. J Heart Lung Transplant 20: 1158-1166.
- Sukul P, Trefz P, Schubert JK, Miekisch W (2014):** Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath. J Breath Res 8: 037102.
- Sukul P, Trefz P, Kamysek S, Schubert JK, Miekisch W (2015):** Instant effects of changing body positions on compositions of exhaled breath. J Breath Res 9: 047105.
- Sukul P, Schubert JK, Oertel P, Kamysek S, Taunk K, Trefz P, Miekisch W (2016):** FEV manoeuvre induced changes in breath VOC compositions: an unconventional view on lung function tests. Sci Rep 6: 28029.
- Sukul P, Oertel P, Kamysek S, Trefz P (2017a):** Oral or nasal breathing? Real-time effects of switching sampling route onto exhaled VOC concentrations. J Breath Res 11: 027101.

- Sukul P, Schubert JK, Kamysek S, Trefz P, Miekisch W (2017b):** Applied upper-airway resistance instantly affects breath components: a unique insight into pulmonary medicine. *J Breath Res* 11: 047108.
- Suutari M, Laakso S (1993):** Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. *Arch Microbiol* 159: 119-123.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE (1992a):** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 30: 166-171.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE (1992b):** *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res* 53: 477-480.
- Sweeney RW (1996):** Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12: 305-312.
- Sweeney RW, Collins MT, Koets AP, McGuirk SM, Roussel AJ (2012):** Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *J Vet Intern Med* 26: 1239-1250.
- Szymczak W, Rozman J, Hollriegl V, Kistler M, Keller S, Peters D, Kneipp M, Schulz H, Hoeschen C, Klingenspor M, de Angelis MH (2014):** Online breath gas analysis in unrestrained mice by hs-PTR-MS. *Mamm Genome* 25: 129-140.
- Talatchian M (1965):** First report of Johne's disease in Iran. *Bull Off Int Epizoot* 64: 779-782.
- Tangerman A, Meuwese-Arends MT, van Tongeren JH (1983):** A new sensitive assay for measuring volatile sulphur compounds in human breath by Tenax trapping and gas chromatography and its application in liver cirrhosis. *Clin Chim Acta* 130: 103-110.
- Taucher J, Hansel A, Jordan A, Fall R, Futrell JH, Lindinger W (1997):** Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11: 1230-1234.
- Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS (1981):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet Rec* 109: 532-533.
- Teranishi R, Mon TR, Robinson AB, Cary P, Pauling L (1972):** Gas chromatography of volatiles from breath and urine. *Anal Chem* 44: 18-20.
- Thekedar B, Oeh U, Szymczak W, Hoeschen C, Paretzke HG (2011):** Influences of mixed expiratory sampling parameters on exhaled volatile organic compound concentrations. *J Breath Res* 5: 016001.
- Thompson BR, Clark RG, Mackintosh CG (2007):** Intra-uterine transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically affected red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* 55: 308-313.
- Thompson DE (1994):** The role of mycobacteria in Crohn's disease. *J Med Microbiol* 41: 74-94.

- Thorel MF, Krichevsky M, Levy-Frebault VV (1990):** Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 40: 254-260.
- Tonzetich J, Coil JM, Ng W (1991):** Gas chromatographic method for trapping and detection of volatile organic compounds from human mouth air. J Clin Dent 2: 79-82.
- Tosi L, Sola C (1993):** Role of geosmin, a typical inland water odour, in guiding glass eel *Anguilla anguilla* (L.) migration. Ethology 95: 177-185.
- Trefz P, Kischkel S, Hein D, James ES, Schubert JK, Miekisch W (2012):** Needle trap micro-extraction for VOC analysis: effects of packing materials and desorption parameters. J Chromatogr A 1219: 29-38.
- Trefz P, Köhler H, Klepik K, Möbius P, Reinhold P, Schubert JK, Miekisch W (2013a):** Volatile Emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mirror Bacterial Growth and Enable Distinction of Different Strains. Plos One 8: e76868.
- Trefz P, Rosner L, Hein D, Schubert JK, Miekisch W (2013b):** Evaluation of needle trap micro-extraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis. Anal Bioanal Chem 405: 3105-3115.
- Trefz P, Schmidt M, Oertel P, Obermeier J, Brock B, Kamysek S, Dunkl J, Zimmermann R, Schubert JK, Miekisch W (2013c):** Continuous real time breath gas monitoring in the clinical environment by proton-transfer-reaction-time-of-flight-mass spectrometry. Anal Chem 85: 10321-10329.
- Trujillo-Rojas RA (1967):** Pulmonary tuberculosis in dog diagnosed by a positive culture of *Mycobacterium tuberculosis* from laryngeal swab. Am Rev Respir Dis 95: 674-675.
- Turner C (2016):** Techniques and issues in breath and clinical sample headspace analysis for disease diagnosis. Bioanalysis 8: 677-690.
- Twort F, Ingram G (1912):** A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character 84: 517-542.
- van der Giessen JW, Haring RM, Vaclare E, Eger A, Haagsma J, van der Zeijst BA (1992):** Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. J Clin Microbiol 30: 1216-1219.
- Vary P, Andersen P, Green E, Hermon-Taylor J, McFadden J (1990):** Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J Clin Microbiol 28: 933-937.
- Vautz W, Nolte J, Bufe A, Baumbach JI, Peters M (2010):** Analyses of mouse breath with ion mobility spectrometry: a feasibility study. J Appl Physiol 108: 697-704.

Vogel O (1977): Paratuberkulose bei einem Hund. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 90, 419-421.

vom Schloß A (2000): Auswertung eines Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Nordrhein-Westfalen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Inaugural – Diss

Weber MF, Verhoeff J, van Schaik G, van Maanen C (2009): Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. Prev Vet Med 92: 256-266.

Weetjens B, Mgone G, Machang'u R, Kazwala R, Mfinanga G, Lwilla F, Cox C, Jubitana M, Kanyagha H, Mtandu R (2009): African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. Int J Tuberc Lung Dis 13: 737-743.

Weigoldt M, Meens J, Doll K, Fritsch I, Möbius P, Goethe R, Gerlach GF (2011): Differential proteome analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* grown *in vitro* and isolated from cases of clinical Johne's disease. Microbiology-Sgm 157: 557-565.

Weigoldt M, Meens J, Bange FC, Pich A, Gerlach GF, Goethe R (2013): Metabolic adaptation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to the gut environment. Microbiology-Sgm 159: 380-391.

Weiss CH, Glassroth J (2012): Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. Expert Rev Respir Med 6: 597-613.

Wells S, Kubat N, Espejo L, Godden S (2012). Effect of delaying exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* until adulthood on incidence of infection in adult dairy cows. 11th International Colloquium on Paratuberculosis; Sydney, Australia.

West JB (2011): History of respiratory gas exchange. Compr Physiol 1: 1509-1523.

Wheatley RE (2002): The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. Antonie Van Leeuwenhoek 81: 357-364.

Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J (2000): ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet Microbiol 77: 387-398.

Whittington R, Marsh I, Turner M, McAllister S, Choy E, Eamens G, Marshall D, Ottaway S (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 IS900 PCR. J Clin Microbiol 36: 701-707.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA (2004): Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. Appl Environ Microbiol 70: 2989-3004.

Wilkins K (1996): Volatile metabolites from *actinomycetes*. Chemosphere 32: 1427-1434.

Williams H, Pembroke A (1989): Sniffer dogs in the melanoma clinic? Lancet 1: 734.

- Willis CM, Church SM, Guest CM, Cook WA, McCarthy N, Bransbury AJ, Church MR, Church JC (2004):** Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study. *BMJ* 329: 712.
- Wolkoff P (2003):** Trends in Europe to reduce the indoor air pollution of VOC. *Indoor Air* 13 Suppl 6: 5-11.
- Wood WL, Higbee DJ, Gooldy M, Glogowski S, Fitzpatrick R, Karalus RJ, Wood TD, Mangino DJ (2006):** Analysis of volatile bacterial metabolites by GC-MS. *LC GC N Am* 21: 20-28.
- Xu Y, Cheung W, Winder CL, Goodacre R (2010):** VOC-based metabolic profiling for food spoilage detection with the application to detecting *Salmonella typhimurium*-contaminated pork. *Anal Bioanal Chem* 397: 2439-2449.
- Yokomizo Y, Merkal RS, Lyle PA (1983):** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* 44: 2205-2207.
- Yokomizo Y, Yugi H, Merkal RS (1985):** A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nihon Juigaku Zasshi* 47: 111-119.
- Yokomizo Y, Kishima M, Mori Y, Nishimori K (1991):** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J Vet Med Sci* 53: 577-584.
- Yuan Y, Mead D, Schroeder BG, Zhu YQ, Barry CE (1998):** The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* - Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid *in vitro*. *J Biol Chem* 273: 21282-21290.
- Zechman JM, Aldinger S, Labows JN, Jr. (1986):** Characterization of pathogenic bacteria by automated headspace concentration-gas chromatography. *J Chromatogr* 377: 49-57.
- Zhang MZ, Zhang S (2011):** An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest* 23: 41-48.
- Zhu J, Bean HD, Jimenez-Diaz J, Hill JE (2013):** Secondary electrospray ionization-mass spectrometry (SESI-MS) breathprinting of multiple bacterial lung pathogens, a mouse model study. *J Appl Physiol* (1985) 114: 1544-1549.
- Ziehl F (1882):** Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 8: 451.
- Zimmer K, Dräger KG, Klawonn W, Hess RG (1999):** Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 46: 137-140.
- Zscheppank C, Wiegand HL, Lenzen C, Wingender J, Telgheder U (2014):** Investigation of volatile metabolites during growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aruginosa* by needle trap-GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 406: 6617-6628.

8 Anhang

Abstracts weiterer projektbezogener Publikationen

Anlage 1

Trefz P, Köhler H, Klepik K, Möbius P, Reinhold P, Schubert JK, Miekisch W (2013a): Volatile Emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Mirror Bacterial Growth and Enable Distinction of Different Strains. Plos One 8: e76868.

Abstract: Control of paratuberculosis in livestock is hampered by the low sensitivity of established direct and indirect diagnostic methods. Like other bacteria, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) emits volatile organic compounds (VOCs). Differences of VOC patterns in breath and feces of infected and not infected animals were described in first pilot experiments but detailed information on potential marker substances is missing. This study was intended to look for characteristic volatile substances in the headspace of cultures of different MAP strains and to find out how the emission of VOCs was affected by density of bacterial growth. One laboratory adapted and four field strains, three of MAP C-type and one MAP S-type were cultivated on Herrold's egg yolk medium in dilutions of 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} and 10^{-6} . Volatile substances were pre-concentrated from the headspace over the MAP cultures by means of Solid Phase Micro Extraction (SPME), thermally desorbed from the SPME fibers and separated and identified by means of GC-MS. Out of the large number of compounds found in the headspace over MAP cultures, 34 volatile marker substances could be identified as potential biomarkers for growth and metabolic activity. All five MAP strains could clearly be distinguished from blank culture media by means of emission patterns based on these 34 substances. In addition, patterns of volatiles emitted by the reference strain were significantly different from the field strains. Headspace concentrations of 2-ethylfuran, 2-methylfuran, 3-methylfuran, 2-pentylfuran, ethyl acetate, 1-methyl-1-H-pyrrole and dimethyldisulfide varied with density of bacterial growth. Analysis of VOCs emitted from mycobacterial cultures can be used to identify bacterial growth and, in addition, to differentiate between different bacterial strains. VOC emission patterns may be used to approximate bacterial growth density. In a perspective volatile marker substances could be used to diagnose MAP infections in animals and to identify different bacterial strains and origins.

Anlage 2

Kasbohm E, Fischer S, Küntzel A, Oertel P, Bergmann A, Trefz P, Miekisch W, Schubert J, Reinhold P, Ziller M, Fröhlich A, Liebscher V, Köhler H (2017): Strategies for the identification of disease-related patterns of volatile organic compounds: prediction of paratuberculosis in an animal model using random forests. *J Breath Res* 11: 047105

Abstract: Modern statistical methods which were developed for pattern recognition are increasingly being used for data analysis in studies on emissions of volatile organic compounds (VOCs). With the detection of disease-related VOC profiles, novel non-invasive diagnostic tools could be developed for clinical applications. However, it is important to bear in mind that not all statistical methods are equally suitable for the investigation of VOC profiles. In particular, univariate methods are not able to discover VOC patterns as they consider each compound separately. The present study demonstrates this fact in practice. Using VOC samples from a controlled animal study on paratuberculosis, the random forest classification method was applied for pattern recognition and disease prediction. This strategy was compared with a prediction approach based on single compounds. Both methods were framed within a cross-validation procedure. A comparison of both strategies based on these VOC data reveals that random forests achieves higher sensitivities and specificities than predictions based on single compounds. Therefore, it will most likely be more fruitful to further investigate VOC patterns instead of single biomarkers for paratuberculosis. All methods used are thoroughly explained to aid the transfer to other data analyses.

Anlage 3

Oertel P, Küntzel A, Reinhold P, Köhler H, Schubert J, Kolb J, Miekisch W (2018a): Continuous real-time breath analysis in ruminants: Effect of eructation on exhaled VOC profiles. *J Breath Res* 12: 036014.

Abstract: The analysis of volatile organic compounds (VOCs) in breath allows non-invasive investigations of diseases. Animal studies are conducted as a model to perform research of VOCs and their relation to diseases. In large animal models ruminants were often used as experimental targets. The effect of their physiological eructation on VOC exhalation has not been examined yet and is the objective of this study. Continuous breath profiles of two young cattle, four adult goats and four adult sheep were measured through a mask, covering mouth and nose, in real-time (200 ms) by means of proton transfer reaction time of flight mass spectrometry. Each animal was analysed twelve times for 3 consecutive minutes. Real-time monitoring yielded a distinction of different episodes in the breath profiles of ruminants. An algorithm to separate eructation episodes and alveolar breath was established. In the first exhalation after eructation at least 19 VOC concentrations increased (up to 36-fold) and went back to initial levels in subsequent exhalations in all investigated ruminants. Decay of concentrations was substance specific. In goats, less VOCs were affected by the eructation compared to cattle and sheep. Breath profiles without exclusion of eructation episodes showed higher variations and median values than profiles where eructation episodes were excluded. Real-time breath analysis of ruminants enables the discrimination and characterisation of alveolar breath and eructation episodes. This leads to a better understanding of variation in breath data and possible origins of VOCs: breath or digestion related. To avoid impairment of breath gas results and to gain further information on bacterial products from the rumen, eructation and alveolar breath data should be analysed separately.

Anlage 4

Oertel P, Bergmann A, Fischer S, Trefz P, Küntzel A, Reinhold P, Köhler H, Schubert JK, Miekisch W (2018b): Evaluation of needle trap micro extraction and solid phase micro extraction: obtaining comprehensive information on volatile emissions from *in vitro* cultures. Biomed Chromatogr 14: e4285.

Abstract: Volatile organic compounds (VOCs) emitted from *in vitro* cultures may reveal information on species and metabolism. Owing to low nmol L^{-1} concentration ranges, pre-concentration techniques are required for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based analyses. This study was intended to compare the efficiency of established micro-extraction techniques - solid-phase micro-extraction (SPME) and needle-trap micro-extraction (NTME) - for the analysis of complex VOC patterns. For SPME, a 75 μm Carboxen®/polydimethylsiloxane fiber was used. The NTME needle was packed with divinylbenzene, Carbopack X and Carboxen 1000. The headspace was sampled bi-directionally. Seventy-two VOCs were calibrated by reference standard mixtures in the range of 0.041-62.24 nmol L^{-1} by means of GC-MS. Both pre-concentration methods were applied to profile VOCs from cultures of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Limits of detection ranged from 0.004 to 3.93 nmol L^{-1} (median = 0.030 nmol L^{-1}) for NTME and from 0.001 to 5.684 nmol L^{-1} (median = 0.043 nmol L^{-1}) for SPME. NTME showed advantages in assessing polar compounds such as alcohols. SPME showed advantages in reproducibility but disadvantages in sensitivity for N-containing compounds. Micro-extraction techniques such as SPME and NTME are well suited for trace VOC profiling over cultures if the limitations of each technique is taken into account.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

Literaturübersicht

Abb. 1:	Aufbau der Zellwand von Mykobakterien.....	4
Abb. 2:	weltweites Vorkommen von Paratuberkulose in Nutztier- und Wildtierpopulation im Jahr 2016 (OIE 2017).....	6

Eigene Untersuchungen

Abb. 3:	Aufbau einer Atemgasanalyse in Echtzeit bei adulten Rindern.....	17
---------	--	----

Publikationen

Studie 1:	Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	19
Figure 1:	Experimental designs of study I and study II.....	22
Figure 2:	Experimental set up for sampling of headspace above culture media	23
Figure 3:	Effects of different culture media on VOC profiles emitted from <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) cultures	24
Figure 4:	Effects of inter-strain variability on concentrations of emitted VOCs	29
Figure 5:	Effects of kinetics illustrated in a heatmap with normalized data of all selected VOCs from <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) cultures on Herrold's Egg Yolk Medium as well as from pure media slants pre-concentrated after two, four, and six weeks	30
Figure 6:	Effects of bacterial density (by original bacterial count and duration of incubation) on concentration of emitted VOCs	31
Figure S1:	Effects of different culture media illustrated in a heatmap with normalized data of all selected VOC from <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) cultures as well as from pure media slants pre-concentrated after five weeks.....	35
Studie 2:	Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species	39
Figure 1:	Differentiation of mycobacterial species by VOC profile	46
Figure 2:	Significant differences in VOC concentration above vials with poor bacterial growth at the time point of analysis and above noninoculated control vials.....	47
Figure 3:	VOC concentrations above different mycobacterial species and pure media control slants inoculated with MB-Bouillon, forming four groups of substances	48
Figure 4:	VOC emissions from different mycobacteria	52
Figure 5:	Suggested VOC profile consisting of the most influencing substances for each mycobacterial species	53
Figure A1:	Scatterplots einzelner Substanzen.....	67

Studie 3:	Core profile of volatile organic compounds related to growth of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> – a comparative extract of three independent <i>in vitro</i> studies.....	68
Figure 1:	Overlap of MAP-related VOCs identified in the three studies	72
Figure 2:	VOC concentration levels of all substances per study normalized to the median concentration of their respective pure medium.....	74
Figure 3:	Random forest classification results	76
Studie 4:	Animal science meets agricultural practice.....	84
Figure 1:	Technical setup for the collection and analysis of exhaled breath in cattle	87
Figure 2:	Consecutive measurement campaigns applied to one animal within one day.....	88
Figure 3:	Time course of acetone intensity measured by PTR-ToF-MS from three cows at different respiratory rates.....	89
Figure 4:	Acetone concentration in breath related to concentration of acetone in eructation gas (n= 153 data points from 83 individual cows).....	90
Figure 5:	Difference between the concentrations of volatile organic compounds (VOCs) of exhalation minus inhalation throughout the day, without phases of eructation (n = 2 calves).....	90
 Diskussion		
Abb. 4:	Synthese kettenförmiger VOC in Verbindung mit der Fettsäuresynthese	102

9.2 Tabellenverzeichnis

Literaturübersicht

Tab. 1:	Versuchsaufbau der Studien zur VOC-Analytik im Headspace von MAP.....	16
---------	---	----

Publikationen

Studie 1:	Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	19
Table 1:	Concentration ranges of selected VOC marker substances from all dilutions and all strains to each duration of incubation as well as concentration ranges of VOCs above pure media.....	26
Table 2:	Effects of inter-strain variability, original bacterial count, and duration of incubation on emitted VOC concentrations above MAP cultures (p-values; multifactorial ANOVA).....	28
Table S1:	Manufacturer of reference substances.....	36
Table S2:	Reference substances used for identification and quantification of selected VOC	37
Table S3:	Ingredients of culture media	38
Studie 2:	Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species	39
Table 1:	Study design and included species.....	44
Table 2:	VOC concentration above inoculated slants compared to control vials	49
Table 3:	Inter-strain variability of VOCs tested per species by means of Mann-Whitney-U-Test.....	51
Table S1:	Manufacturer of reference substances.....	59
Table S2:	Reference substances used for identification and quantification of selected VOC	60
Table S3:	Median and percentiles (0.25 and 0.75) of the concentration of volatile organic compounds in ppbV and Tukey-HSD-test.....	61
Studie 3:	Core profile of volatile organic compounds related to growth of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> – a comparative extract of three independent <i>in vitro</i> studies.....	68
Table 1:	Methodical factors influencing the VOC-profile during bacterial cultivation	71
Table 2:	Design of the three studies taken into account for comparative exploitation	71
Table 3:	Relative change of VOC concentration above MAP cultures compared to control vials.....	75
Table 4:	Meta-statistical analysis of MAP-related VOCs derived from the three studies	81
Table S1:	Substances that could be measured in at least two studies	82

Studie 4:	Animal science meets agricultural practice	84
Table 1:	Customized set-ups for exhaled breath analysis in conscious individuals in various animal species	86
Table 2:	Range of parameters from animals in field trials	87
 Diskussion		
Tab. 2:	In der Literatur dokumentierte Untersuchungen zu VOC-Profilen im Headspace zu verschiedenen Mykobakterien-Spezies.....	98

10 Publikationsverzeichnis

10.1 Publikationen mit Peer-Review-Verfahren

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2016):
„Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.“
 Journal of Breath Research 10 (3): e037103.
 DOI: 10.1088/1752-7155/10/3/037103.
Auswahl als Highlight 2016, der im Journal of Breath Research publizierten Artikel.

Elisa Kasbohm, Sina Fischer, **Anne Küntzel**, Peter Oertel, Andreas Bergmann, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Mario Ziller, Andreas Fröhlich, Volkmar Liebscher, Heike Köhler (2017):
„Strategies for the identification of disease-related patterns of volatile organic compounds: prediction of paratuberculosis in an animal model using random forests.“
 Journal of Breath Research 11 (4): e 047105
 DOI: 10.1088/1752-7163/aa83bb
Auswahl als Highlight 2017, der im Journal of Breath Research publizierten Artikel.

Anne Küntzel, Peter Oertel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Phillip Trefz, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch, Petra Reinhold, Heike Köhler (2018):
„Comparative analysis of volatile organic compounds for the classification and identification of mycobacterial species.“
 PLOS One 13 (3): e0194348
 DOI: 10.1371/journal.pone.0194348

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler, Petra Reinhold (2018):
„Animal science meets agricultural practice: Preliminary results of an innovative technical approach for exhaled breath analysis in cattle under field conditions.“
„Angewandte Versuchstierkunde unter den Bedingungen landwirtschaftlicher Praxis: Erste Ergebnisse einer unter Feldbedingungen anwendbaren technischen Lösung zur Analyse von Atemgas bei Rindern.“
 Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 2018 (7-8): 444-452
 DOI: 10.2376/0005-9366-17101

Peter Oertel, **Anne Küntzel**, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Johann Kolb, Wolfram Miekisch (2018):
„Continuous real-time breath analysis in ruminants: Effect of eructation on exhaled VOC profiles.“
 Journal of Breath Research 12(3): 036014
 DOI: 10.1088/1752-7163/aabdaf

Peter Oertel, Andreas Bergmann, Sina Fischer, Phillip Trefz, **Anne Küntzel**, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch (2018)
„Evaluation of needle trap micro extraction and solid phase micro extraction: obtaining comprehensive information on volatile emissions from *in vitro* cultures.“
 Biomedical Chromatography 14: e4285
 DOI: 10.1002/bmc.4285

Peter Gierschner, **Anne Küntzel**, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch (2019)
„Crowd monitoring in dairy cattle-real-time VOC profiling by direct mass spectrometry.“
 Journal of Breath Research 13(4):046006
 DOI: 10.1088/1752-7163/ab269f

Anne Küntzel, Michael Weber, Peter Gierschner, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2019)
„Core profile of volatile organic compounds related to growth of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* - A comparative extract of three independent studies.“
 PLOS One 14 (8): e0221031
 DOI: 10.1371/journal.pone.0221031

10.2 Publierte Abstracts

Sina Fischer, **Anne Küntzel**, Andreas Bergmann, Markus Steffens, Mario Ziller, Phillip Trefz, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch, Heike Köhler, Petra Reinhold (2015):
„Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath of healthy goats.“
 Proceedings of the International Association of Breath Research (IABR) Summit, 14. – 16. September 2015, Vienna (Austria), *Poster*.
Auszeichnung mit dem Preis für das beste wissenschaftliche Poster.

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhle¹, Petra Reinhold (2016):
„Flüchtige organische Substanzen als Biomarker bakterieller Infektionen im Tiermodell.“
 Abstracts zum 19. Workshop des DVG-Arbeitskreises „Respiratorisches System“ in Kooperation mit dem 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP)
 02. März 2016, Leipzig (Deutschland), *Vortrag*
 Pneumologie 70 (07): A7. DOI: 10.1055/s-0036-1584383

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhle, Petra Reinhold (2016):
„Importance of physiological variability when assessing Volatile organic compounds as candidate biomarkers.“
 Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung „Physiologie und Biochemie“,
 30. März – 01. April 2016, Berlin, *Poster*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2016):
“Volatile organic compounds from Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis indicate bacterial growth – A new accelerated diagnostic approach?”
Proceedings of the International Colloquium of Paratuberculosis (ICP),
20. – 24. Juni 2016, Nantes (Frankreich), *Poster*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2016):
“Kinetics of volatile organic compounds from Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis indicate bacterial growth.”
Proceedings of the International Association of Breath Research (IABR) Summit,
14. – 16. September 2016, Zürich (Schweiz), *Vortrag*

Peter Oertel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Anne Küntzel, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch (2017):
“Evaluation of SPME and NTME for VOC profiling in bacterial cultures.”
Proceedings of the Pittcon Conference,
05. – 09. März 2017, Atlanta (United States), *Vortrag*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Markus Steffens, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2016):
“Volatile organic compounds above cultures of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis as candidate biomarkers of bacterial growth.”
Proceedings of the Junior Scientist Symposium of the Friedrich-Loeffler-Institut,
21. – 23. September 2016, Jena (Deutschland), *Vortrag*

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler und Petra Reinhold (2017):
„Experimenteller Aufbau zur Atemgasanalyse bei adulten Rindern unter Feldbedingungen.“
Abstracts zum 20. Workshop des DVG-Arbeitskreises „Respiratorisches System“ in Kooperation mit dem 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP),
22. März 2017, Stuttgart (Deutschland), *Vortrag*
Pneumologie 71 (06): A8. DOI: 10.1055/s-0037-1602733

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler und Petra Reinhold (2017):
„Flüchtige organische Substanzen in der Ausatemluft – ein diagnostischer Baustein der Zukunft?“
Tagungsband der 42. Leipziger Fortbildungsveranstaltung „Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung“,
16. Juni 2017, Leipzig (Deutschland), *Vortrag*

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler, Petra Reinhold (2017):

“A technical solution for exhaled breath analysis in cattle under field conditions.”

Proceedings of the 6th Symposium of the Young Physiologists,

28. – 29. September 2017, Jena (Deutschland), *Vortrag*

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler, Petra Reinhold (2017):

“Volatile organic compounds in breath – a diagnostic element of the future?”

Proceedings of the Junior Scientist Symposium of the Friedrich-Loeffler-Institut,

20. – 22. September 2017, Braunschweig (Deutschland), *Vortrag*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2017):

“Volatile organic compounds above cultures of Mycobacterium species as candidate biomarkers of bacterial growth.”

Tagungsband der Gemeinsamen Tagung der Nationalen Referenzlabore Chlamydie, Q-Fieber, Paratuberkulose und Tuberkulose der Rinder,

18. – 20. Oktober 2017, Jena (Deutschland), *Vortrag*

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhle, Petra Reinhold (2018):

„Real-time breath analysis of volatile organic compounds in bovines.”

Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung „Physiologie und Biochemie“,

21. – 23. Februar 2018, Wien (Österreich), *Poster*

Anne Küntzel, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Heike Köhler und Petra Reinhold (2018):

„Biologische Einflussfaktoren auf die Analyse von Volatilen organischen Substanzen in der Atemluft bei Rindern.“

Abstracts zum 21. Workshop des DVG-Arbeitskreises „Respiratorisches System“ in Kooperation mit dem 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP),

14. März 2018, Dresden (Deutschland), *Vortrag*

Peter Oertel, Anne Küntzel, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch (2018);

“VOC-Profiling in Cattle via real-time Breath Analysis by Means of PTR-TOF-MS.”

Proceedings of the Pittcon Conference,

26. Februar – 01. März 2018, Orlando (United States), *Poster*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2018):

“MAP-specific volatile organic compound profile: a comparative analysis of three different *in vitro* studies.”

Proceedings of the International Colloquium of Paratuberculosis (ICP),

04. – 08. Juni 2018, Cancun (Mexiko), *Vortrag*

Heike Köhler, **Anne Küntzel**, Sina Fischer, Elisa Kasbohm, Wolfram Miekisch, Petra Reinhold (2018):

“The potential of volatile organic compounds as biomarkers for paratuberculosis.”

Proceedings of the International Colloquium of Paratuberculosis (ICP),

04. – 08. Juni 2018, Cancun (Mexiko), *Poster*

Anne Küntzel, Sina Fischer, Andreas Bergmann, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen K. Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler (2018):

“MAP-specific volatile organic compound profile: a comparative analysis of three different *in vitro* studies.”

Proceedings of the International Association of Breath Research (IABR) Summit,

17. – 20. Juni 2018, Maastricht (Niederlande), *Vortrag*

Elisa Kasbohm, Sina Fischer, **Anne Küntzel**, Peter Oertel, Phillip Trefz, Wolfram Miekisch, Jochen Schubert, Petra Reinhold, Heike Köhler, Andreas Fröhlich, Volkmar Liebscher (2018):

“Dynamics of volatile organic compounds in the process of a latent infection with mycobacteria in an animal model regarding exhaled breath and headspace over feces.”

Proceedings of the International Association of Breath Research (IABR) Summit,

17. – 20. Juni 2018, Maastricht (Niederlande), *Poster*

Peter Oertel, **Anne Küntzel**, Petra Reinhold, Heike Köhler, Jochen K. Schubert, Wolfram Miekisch (2018):

“VOC Profiling in Ruminants via real-time Breath Analysis by means of PTR-TOF-MS.”

Proceedings of the International Association of Breath Research (IABR) Summit,

17. – 20. Juni 2018, Maastricht (Niederlande), *Poster*

11 Danksagung

Meiner lieben Doktormutter, **Prof. Dr. Petra Reinhold, PhD**, bin ich für die allumfassende fachliche Unterstützung und Förderung zu allergrößtem Dank verpflichtet. Es war mir eine große Ehre unter ihrer hochqualifizierten Anleitung arbeiten und lernen zu dürfen. Für Ihren besonderen zwischenmenschlichen Blick der Dinge und ihre Integrität wird sie mir nicht nur beruflich ein Vorbild sein.

Ein ganz besonderer Dank gilt **Dr. Heike Köhler**, der Leiterin des Referenzlabors für Paratuberkulose. Sie begleitete das gesamte Projekt und stand mir mit fachlicher Unterstützung und Betreuung stets bei. Ich genoss vor allem die vielen Gespräche, die nicht nur fachlich, sondern auch privater Natur waren.

Meinen **Koautoren** und **ihren Mitarbeitern** danke ich für die stets hervorragende, unkomplizierte und produktive Zusammenarbeit und die sehr fruchtbaren Diskussionen. Ein besonderer Dank gilt dabei **Sina Fischer** für die exzellente Einarbeitung in das Projekt und die fortwährende Bereitschaft der Hilfestellung.

Darüber hinaus bin ich unendlich dankbar für die Zuarbeit und die Unterstützung durch **Sandy Werner, Ingolf Rücknagel, Annelie Langenberg** und **Ines Lemser** sowie durch das gesamte Team der **Tierpfleger**. Des Weiteren danke ich den Tierärzten des Rinder-, Schaf- und Ziegengesundheitsdienstes Thüringen für die Kontaktvermittlung zu den Betrieben und die fachlichen Diskussionen.

Abgesehen von ihrer tatkräftigen Unterstützung in allen Belangen des Projektes waren meine Mitdoktoranden des ROMBAT-Teams, **Peter Gierschner** (ehemals Oertel), **Ann-Christin Bischoff, Selina Traxler, Juliane Obermeier** sowie **Elisa Kasbohm** (Universität Greifswald), stets eine Bereicherung und haben meinen Arbeitsalltag, wenn auch aus der Entfernung heraus, stets mitgestaltet.

Zu guter Letzt danke ich **meiner Familie** von ganzem Herzen für den Rückhalt, die größtmögliche Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Zeit, die diese Arbeit in Anspruch genommen hat.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 04.07.2019

Anne Küntzel