

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

**Physiologische Einflussfaktoren auf die Variabilität  
flüchtiger organischer Substanzen im caprinen Tiermodell**

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

vorgelegt von  
**Sina Fischer**  
Tierärztin aus Ludwigshafen am Rhein

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4027







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

**Physiologische Einflussfaktoren auf die Variabilität  
flüchtiger organischer Substanzen im caprinen Tiermodell**

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

vorgelegt von  
**Sina Fischer**  
Tierärztin  
aus Ludwigshafen am Rhein

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4027

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Petra Reinhold
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

goats, animal models, volatile organic compounds (MeSH) biochemical markers,  
feeding, age differences, gases, faecal examination, respiration (MeSH)

Tag der Promotion: 15.05.2018

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Flüchtige organische Substanzen in der medizinischen Diagnostik.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Historischer Überblick.....	3
2.1.2	VOCs als Biomarker für pathophysiologische Prozesse.....	5
2.1.3	Physiologische Grundlagen.....	6
<b>2.2</b>	<b>Analytik von VOCs.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Aspekte bei der Nutzung von VOCs in der veterinärmedizinischen Diagnostik.....</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Aus dem Kenntnisstand der Literatur abgeleiteter Forschungsbedarf.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Aufgabenstellung und Rahmenbedingungen .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Tiere, Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Haltung, Fütterung und Gesundheitszustand der Tiere.....	18
3.2.2	Analytik der VOCs .....	18
3.2.3	Studiendesign.....	20
<b>4</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND DARLEGUNG DER PERSÖNLICHEN BEITRÄGE .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>STUDIE I: Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>STUDIE II: Impact of food intake on <i>in vivo</i> VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model .....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Validität und Relevanz der experimentellen Studien.....</b>	<b>53</b>
5.1.1	Beurteilung des Tiermodells.....	53
5.1.2	Beurteilung der Analytik der VOCs .....	54
5.1.3	Beurteilung des Studiendesigns .....	57
<b>5.2</b>	<b>Variabilität des VOC-Profiles infolge physiologischer Prozesse.....</b>	<b>59</b>
5.2.1	Einfluss der Fütterung und der Entwicklung .....	59

5.2.2	Einfluss der Futteraufnahme .....	61
5.2.3	Einfluss inhalierter VOCs .....	63
<b>5.3</b>	<b>Einordnung in das Gesamtprojekt.....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Erkenntnisgewinn und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNISSE.....</b>	<b>116</b>
<b>10.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>10.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis des Anhangs.....</b>	<b>117</b>
<b>10.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>10.4</b>	<b>Tabellenverzeichnis des Anhangs.....</b>	<b>118</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>11.1</b>	<b>Publikationen mit Peer-Review-Verfahren.....</b>	<b>119</b>
<b>11.2</b>	<b>Publizierte Abstracts .....</b>	<b>120</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>126</b>
<b>13</b>	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>127</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	<i>Aspergillus</i>
Abb.	Abbildung
ANOVA	engl.: analysis of variance
cfu	engl.: colony forming units
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	engl.: days
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMS	Differentielle Ionenmobilitätsspektrometrie (engl.: differential ion mobility spectrometry)
3DMSP	engl.: 3-dimethylsulfoniopropionate
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
DVB	Divinylbenzol (engl.: divinylbenzene)
EIC	engl.: extracted ion counts
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
e-nose	Elektronische Nase (engl.: electronic-nose systems)
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alli</i> )
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
GC	Gaschromatographie (engl.: gas chromatography)
h	engl.: hours
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie (engl.: ion mobility spectrometry)
JPPD	engl.: Johnin purified protein derivative
l	Liter
LCU	engl.: liquid calibration unit
LOD	engl.: limit of detection
LOQ	engl.: limit of quantification
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
min	engl.: minutes
MS	Massenspektrometrie (engl.: mass spectrometry)
MSD	engl.: mass selective detector
n	Anzahl
NIH	National Institute of Health
NIST	National Institute of Standardization and Technology
NTD	Needle Trap Device (engl.: needle trap device)
NTME	Needle Trap Mikroextraktion (engl.: needle trap microextraction)
P.	<i>Pseudomonas</i>
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cells
PC	engl.: principle component

PCA	engl.: principle component analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan (engl.: polydimethylsiloxane)
ppbV	engl.: parts per billion by volume
ppmV	engl.: parts per million by volume
pptV	engl.: parts per trillion by volume
PTR-MS	Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (engl.: proton-transfer-reaction mass spectrometry)
$R^2$	engl.: coefficient of determination
ROC	engl.: receiver-operating-characteristics
rpm	engl.: revolutions per minute
S/N	engl.: signal to noise ratio
S/P%	engl.: sample-to-positive ratio
SD	engl.: standard deviation
SIFT-MS	Selected-Ion-Flow-Tube Massenspektrometrie (engl.: selected ion flow tube mass spectrometry)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl.: solid phase microextraction)
Tab.	Tabelle
TLLV	Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz
TLV	Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz
VFA	engl.: volatile fatty acid
VOC	flüchtige organische Substanz (engl.: volatile organic compound)
VSC	engl.: volatile sulfur compound
wl	engl.: week of life
wpi	engl.: weeks after the end of inoculation

# 1 Einleitung

Der Einsatz flüchtiger organischer Substanzen (engl. volatile organic compounds, VOCs) zu diagnostischen Zwecken in der Medizin und Tiermedizin ist vielversprechend. VOCs entstehen während (patho-) physiologischer Prozesse im Organismus und können nach ihrer Verteilung in diverse biologische Substrate (z. B. Atemgas, Kot, Urin) gelangen und freigesetzt werden. Gelingt es, spezifische VOCs oder VOC-Profile mit pathologischen Prozessen zu assoziieren, so birgt die VOC-Analyse nicht nur ein erhebliches diagnostisches Potential, sondern zugleich die Chance der Integration eines nicht invasiven Diagnostikverfahrens im klinischen Alltag.

Obwohl in einigen Pilotstudien bereits potentiell krankheits-assoziierte VOCs identifiziert wurden (Amann *et al.*, 2014), scheiterte die Definition von zuverlässigen volatilen Biomarkern an der fehlenden Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Studien (Brodrick *et al.*, 2015). Insbesondere wird die Zuverlässigkeit bisheriger Daten wegen einer fehlenden Standardisierung bei der Probenahme und bei der Analyse der VOCs sowie wegen mangelhafter Kenntnisse über mögliche Einflussgrößen in Frage gestellt (Beauchamp, 2015).

Für Studien an Mensch und Tier gilt gleichermaßen, dass physiologisch ablaufende Vorgänge im Organismus einen Einfluss auf die im Körper stattfindenden biochemischen Reaktionen haben. Mit Blick auf die Freisetzung von VOCs liegen bislang kaum Daten zu Auswirkungen von physiologischen Prozessen auf das „Metabolom“ oder „Volatilom“ vor. Es ist jedoch davon auszugehen, dass insbesondere bei heranwachsenden Individuen Reifungsprozesse einen Effekt auf die Entstehung und die Freisetzung von VOCs haben und daher die Definition von volatilen Biomarkern erschwert wird. Studien an Menschen lieferten erste Hinweise darauf, dass sowohl das Alter (Taucher *et al.*, 1997; Spanel *et al.*, 2007) als auch die Ernährung (Lindinger *et al.*, 1997; Baranska *et al.*, 2013) als wichtige Einflussfaktoren bei der VOC-Analyse angesehen werden müssen. Vergleichbare Studien aus der Veterinärmedizin fehlten bislang.

Die im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens durchgeführten und in Form von Publikationen niedergelegten Untersuchungen ordnen sich in das noch junge Forschungsfeld zur Nutzung von VOCs als potentielle Biomarker bei Tieren ein. Ein diesbezüglich von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördertes Projekt hat das Ziel der Identifizierung von VOCs als Biomarker für Infektionen mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). In einer ersten *in vivo*-Studie mit experimentell mit MAP infizierten Ziegen wurden grundlegende Erkenntnisse zu infektions-assoziierten VOCs gewonnen. Innerhalb des Untersuchungszeitraums von einem Jahr zeigten jedoch die VOC-Profile des Atemgases und des Gasraums (Headspace) über Kotproben der infizierten, aber auch der nicht infizierten Ziegen, eine erhebliche Variabilität. Es galt nun, die durch physiologische Prozesse

verursachten Veränderungen der VOC-Profile zu evaluieren, um die physiologische Variabilität von infektionsspezifischen Reaktionsmustern abgrenzen zu können.

Das konkrete Ziel der in dieser Arbeit dargelegten eigenen Studien war es, den Einfluss physiologisch ablaufender, metabolischer Prozesse auf die Variabilität der von gesunden Ziegen ausgeatmeten bzw. von deren Kot freigesetzten VOCs zu charakterisieren. Hierfür wurden in einer ersten Studie die somatische und metabolische Entwicklung der gesunden Ziegen sowie der Übergang vom funktionell monogastrischen Milchlamm zum reifen Wiederkäuer während des ersten Lebensjahres betrachtet. Eine zweite Studie bei adulten Tieren widmete sich explizit den Auswirkungen der allmorgendlichen Kraftfutteraufnahme auf das VOC-Profil der Ausatemluft. Alle Untersuchungen fanden im Rahmen eines etablierten caprinen Großtiermodells statt, dessen umfangreiche Standardisierung die isolierte Betrachtung der untersuchten Einflussgrößen gewährleistete und den möglichen Einfluss weiterer Störgrößen minimieren sollte.

Die Ergebnisse dieser erstmals an Ziegen durchgeführten Untersuchungen stellen einen deutlichen Erkenntnisgewinn dar. Die Auswirkungen der betrachteten physiologischen Bedingungen und Faktoren auf die freigesetzten VOC-Profile konnten erfasst und evaluiert werden. Dieses Basiswissen ist eine der wesentlichen Voraussetzungen, um zukünftig die Definition zuverlässiger volatiler Biomarker zu ermöglichen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Flüchtige organische Substanzen in der medizinischen Diagnostik

Flüchtige organische Substanzen bezeichnen eine nicht einheitlich definierte Gruppe organischer Verbindungen, die aufgrund ihres niedrigen Siedepunktes bzw. hohen Dampfdruckes bereits bei Raumtemperaturen ganz oder teilweise im gasförmigen Zustand vorliegen.

Die Untersuchung volatiler organischer Verbindungen ist ein relativ junges Forschungsgebiet mit einem potentiell breiten Anwendungsbereich, u. a. in der Umwelt- (Katsoyiannis *et al.*, 2008; Moularat *et al.*, 2008; Hales *et al.*, 2012) und Lebensmittelanalytik (Holm *et al.*, 2013; Zhu and Hill, 2013). Im Bereich der medizinischen Applikation birgt die qualitative und quantitative Analyse von VOCs aus gasförmigen Proben, wie z. B. der Ausatemluft und dem Gasraum über festen oder flüssigen Proben (Headspace), ein großes Potential für die Entwicklung nicht invasiver Diagnostikverfahren. Zum Nachweis der häufig in einem Konzentrationsbereich von weniger als einem ppbV (parts per billion by volume) vorkommenden VOCs ist die Entwicklung sowie die Anwendung speziell adaptierter Probenvorbereitungstechniken und sensitiver Analysemethoden erforderlich.

#### 2.1.1 Historischer Überblick

Bereits in der Antike setzten griechische Gelehrte, darunter Hippokrates von Kos (um 460-370 v. Chr.), ihren Geruchssinn ein, um den für einige Krankheiten charakteristischen Geruch der Atemluft sowie verschiedener Se- und Exkrete ihrer Patienten zur Diagnosefindung zu nutzen (Hippokrates, 1994). Hayden (1980) katalogisierte mehr als zwanzig Gerüche der Atemluft und deren diagnostische Bedeutung. Dort genannt sind u. a. der nach Fisch riechende Atem urämischer Patienten und der süßlich-fruchtige Geruch der Atemluft eines Diabetikers mit bevorstehender Ketoazidose.

Ende des 18. Jahrhunderts konnten Antoine Laurent Lavoisier und Pierre-Simon Laplace die bis dahin geltende Phlogiston-Theorie widerlegen und wiesen die Bildung und Exhalation von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) während der Atmung nach (Underwood, 1944; Karamanou *et al.*, 2013). Heute ist die Kapnometrie zur quantitativen Bestimmung des Kohlenstoffdioxidgehalts in der Expirationsluft zum Monitoring beatmeter Patienten ein fester Bestandteil im klinischen Alltag.

Die Analyse von Metaboliten in der Expirationsluft wird seit dem 20. Jahrhundert für klinische und nicht klinische Fragestellungen routinemäßig eingesetzt. Beim Atemalkoholtest kann mit Hilfe eines Handmessgerätes direkt vor Ort und innerhalb weniger Sekunden die Konzentration von zuvor konsumiertem Alkohol in der Atemluft bestimmt werden (Harger *et al.*, 1938; Emerson *et al.*, 1980). Der Wasserstoff-Atemtest dient der Diagnostik von

Störungen der Kohlenhydratverdauung (z. B. Laktoseintoleranz, Fruktosemalabsorption) (Bond and Levitt, 1972). Zum Nachweis einer Besiedlung mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* im Magen wird der <sup>13</sup>C-Harnstoff-Atemtest angewendet (Logan *et al.*, 1991). Bei den beiden letztgenannten Tests werden Metabolite eines zuvor verabreichten Vorläufer-Moleküls detektiert.

Linus Pauling und Kollegen legten durch ihre Studien in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts den Grundstein für die moderne VOC-Analytik in der medizinischen Diagnostik. Bei Untersuchungen zur Zusammensetzung der menschlichen Atemluft und den vom Urin freigesetzten Substanzen mittels Gaschromatographie (GC) gelang ihnen die Auftrennung von über 200 verschiedenen flüchtigen Molekülen (Pauling *et al.*, 1971; Teranishi *et al.*, 1972). Während Pauling die Identifizierung dieser Substanzen aufgrund fehlender technischer Möglichkeiten noch nicht gelang, konnte mit Fortschreiten der Entwicklung chemischer Analyseverfahren – vornehmlich der Kombination von GC und Massenspektrometrie (MS) – bis ins Jahr 2014 bereits über 1800 VOCs verschiedener Probenmatrizes gesunder Menschen identifiziert werden (de Lacy Costello *et al.*, 2014).

Zunehmend trat das Interesse an einem potentiellen Zusammenhang zwischen freigesetzten flüchtigen Substanzen und pathophysiologischen Prozessen in den Vordergrund. Nach Einzelfallberichten von Hunden, die durch Änderung ihres Verhaltens ihre Besitzer auf ein Krebsleiden aufmerksam machten (Williams and Pembroke, 1989; Church and Williams, 2001), erfolgten Untersuchungen zur Prüfung der Hypothese, dass trainierte Hunde mit Hilfe ihres leistungsstarken Geruchssinns Krebserkrankungen an charakteristischen Geruchsmustern erschnüffeln können (Moser and McCulloch, 2010; Lippi and Cervellin, 2012). In Studien zur Identifizierung von Patienten mit Hautkrebs (Pickel *et al.*, 2004), Blasenkrebs (Willis *et al.*, 2004; Willis *et al.*, 2010), Lungen- und Brustkrebs (McCulloch *et al.*, 2006), Eierstockkrebs (Horvath *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2013), Dickdarmkrebs (Sonoda *et al.*, 2011) und Prostatakrebs (Gordon *et al.*, 2008; Cornu *et al.*, 2011) durch Hunde wurden diverse Probenmatrizes (z. B. Tumorgewebe, Atem und Urin) getestet. Die meisten dieser Studien bestätigen eine höhere als zufällige Detektionsrate durch Hunde, wobei die volatilen Substanzen oder Kombinationen von solchen, auf die die Hunde reagierten, noch unbekannt blieben (Jeziarski *et al.*, 2015). In der Infektionsmedizin werden Afrikanische Riesenhamsterratten (*Crycetomys gambianus*) aufgrund ihres leistungsstarken Geruchssinns erfolgreich in peripheren Regionen Afrikas zum Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* in Sputumproben eingesetzt (Weetjens *et al.*, 2009; Mgode *et al.*, 2012).

In Pilotstudien konnten Geruchsmuster, die mit verschiedenen chemischen Analyseverfahren detektiert wurden, mit diversen Erkrankungen, u. a. Diabetes mellitus, Leberversagen und chronischen Erkrankungen der Niere und des Darms, assoziiert werden (Buszewski *et al.*, 2007; Spanel and Smith, 2011; Calenic and Amann, 2014). Eine fehlende Validierung und

Standardisierung der angewendeten Methoden verhindert jedoch die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit verschiedener Studien (Beauchamp, 2015; Brodrick *et al.*, 2015). Die VOC-Analyse als zuverlässiges medizinisches Diagnostikverfahren in den Klinikalltag zu integrieren, wird das Ziel in der Zukunft sein.

### **2.1.2 VOCs als Biomarker für pathophysiologische Prozesse**

Eine mögliche Assoziation volatiler organischer Substanzen mit bestimmten physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Organismus ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Die Identifizierung von krankheits-assoziierten volatilen Biomarkern birgt ein großes Potential zur nicht invasiven Diagnostik im Klinikalltag. Schwerpunkte sind u. a. die Suche nach volatilen Biomarkern für Tumorerkrankungen, v. a. Lungenkrebs (Amann *et al.*, 2011; Hanai *et al.*, 2012), metabolische Störungen, v. a. Diabetes mellitus (Turner, 2011; Wang and Wang, 2013), und Infektionskrankheiten, v. a. Tuberkulose (Phillips *et al.*, 2007; Banday *et al.*, 2011). Andere mögliche Anwendungsbereiche der VOC-Analyse sind das Monitoring von intravenösen Arzneimittelkonzentrationen (Harrison *et al.*, 2003; Miekisch *et al.*, 2008; Berchtold *et al.*, 2014) oder der Nachweis von gesundheitsgefährdenden Expositionen mit toxischen Substanzen (Barkley *et al.*, 1980; Pleil, 2008).

Störungen des Stoffwechsels, aber auch Tumorerkrankungen und Infektionskrankheiten, beeinflussen biochemische Reaktionen im Organismus, wodurch es zu einer Abweichung der freigesetzten VOCs gegenüber denen von gesunden Probanden kommen kann. Das amerikanische National Institute of Health (NIH) definiert Biomarker als messbare Parameter, die als Indikator für Gesundheit und Krankheit herangezogen werden können (Biomarkers, 2001). Als krankheits-assoziierte volatile Biomarker können Substanzen demnach nur dann klassifiziert werden, wenn durch deren spezifisches Reaktionsmuster der krankhafte Zustand vom gesunden Zustand unterschieden werden kann. Das krankheits-assoziierte Reaktionsmuster von diskriminierenden Substanzen kann entsprechend des zugrundeliegenden pathologischen Prozesses im resultierenden VOC-Profil zu einem Auftreten neuer Substanzen, zu einer Zu- oder Abnahme der Konzentration bereits im VOC-Profil gesunder Probanden vorhandener VOCs, oder zum Fehlen von zuvor detektierten volatilen Substanzen führen. Es hat sich gezeigt, dass meist nicht eine einzelne Substanz als diskriminierender Marker zur Unterscheidung zwischen „krank“ und „gesund“ ausreichend ist, sondern dass durch die Kombination mehrerer VOCs in Form von VOC-Markersets oder VOC-Profilen die Unterscheidungskraft verbessert wird (Garner *et al.*, 2007; Dallinga *et al.*, 2010; Boots *et al.*, 2012).

In vielen Studien überragt die Anzahl der gemessenen Variablen (VOCs) die Anzahl der durchgeführten Messungen. Die Wahrscheinlichkeit zufällige Korrelationen, sogenannte „Voodoo“-Korrelationen, zwischen volatilen Substanzen und dem betroffenen pathologischen

Zustand zu finden und diese irrtümlich als krankheits-assoziierte Marker zu identifizieren steigt dabei verhältnismäßig an (Miekisch *et al.*, 2012). Bei der Auswahl von krankheits-assoziierten Markersets ist laut Miekisch *et al.* (2012) weiterhin zu beachten, dass diverse Einflussgrößen (z. B. Umwelteinflüsse, Phänotyp des Probanden) zu echten Korrelationen zwischen dem Reaktionsmuster volatiler Substanzen und der Krankheit führen können, dabei jedoch kein kausaler Zusammenhang bestehen muss.

Filipiak *et al.* (2012) betonten, dass die Verwendung von krankheits-assoziierten volatilen Biomarkern zu diagnostischen Zwecken nur dann Bestand haben kann, wenn das krankheitsspezifische Reaktionsmuster dieser Markersubstanz als phänotypische Veränderung aus einem metabolischen Prozess infolge dieses krankhaften Zustands hervorgeht. Rückschlüsse auf die biochemischen Prozesse, die zu einem bestimmten Reaktionsmuster einer Markersubstanz führen, sind bisher nur für wenige volatile Substanzen aufgeklärt (Buszewski *et al.*, 2007). Pentan konnte in bisherigen Untersuchungen mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht werden (Miekisch *et al.*, 2004). Die Pentankonzentration im Atemgas steigt bei verschiedenen Krankheitsbildern, u. a. bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (Holt *et al.*, 1994) und bei Morbus Crohn (Aghdassi and Allard, 2000) an. Durch die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt es durch Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu einer erhöhten Freisetzung im Atemgas (Wade and Vanrij, 1985; Kneepkens *et al.*, 1994; Miekisch *et al.*, 2004).

Wichtige Erkenntnisse für die *in vivo*-Diagnostik können aus *in vitro*-Studien mit Headspace-Untersuchungen von Zellkulturen, z. B. von Krebszellen (Chen *et al.*, 2007; Sponring *et al.*, 2010; Amal *et al.*, 2012), und Bakterienkulturen abgeleitet werden. Seit 2-Aminoacetophenon sowohl im Headspace über Kulturen von *Pseudomonas (P.) aeruginosa* als auch im Atem von mit *P. aeruginosa* kolonisierten an Mukoviszidose leidenden Patienten nachgewiesen wurde, gilt diese Substanz als spezifischer Atembiomarker für den Nachweis einer Infektion mit *P. aeruginosa* (Scott-Thomas *et al.*, 2010). Nachdem 2-Pentylfuran im Headspace über Kulturen von *Aspergillus (A.) fumigatus* nachgewiesen wurde (Gao *et al.*, 2002), konnte gezeigt werden, dass auch der Nachweis von 2-Pentylfuran im Atemgas von Patienten mit einer Kolonisation mit *A. fumigatus* im Atmungstrakt assoziiert war (Chambers *et al.*, 2009).

### **2.1.3 Physiologische Grundlagen**

#### ***Herkunft freigesetzter VOCs***

Klassifiziert man die vom Körper freigesetzten VOCs nach ihrem Ursprungsort, kann man endogene und exogene Substanzen unterscheiden. VOCs endogenen Ursprungs entstehen während physiologisch oder pathologisch ablaufender, biochemischer Reaktionen im Inneren des Organismus. Nur für wenige Substanzen endogenen Ursprungs konnten bislang die ihnen zugrunde liegenden Syntheseprozesse aufgeklärt werden. Die Bildungsprozesse sind u. a.

bekannt für Isopren (2-Methylbuta-1, 3-dien), das während der Biosynthese von Cholesterin gebildet wird (Deneris *et al.*, 1985; Stone *et al.*, 1993), und Aceton (Propanon, Dimethylketon), das ein Produkt des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels ist (Miekisch *et al.*, 2004). Beide gehören zu den am häufigsten im Atemgas nachgewiesenen Substanzen (Phillips *et al.*, 1999; Filipiak *et al.*, 2012). Weitere bestätigt endogen gebildete VOCs gehören den Kohlenwasserstoffen bzw. den sauerstoff-, schwefel-, oder stickstoffhaltigen organischen Verbindungen an (Miekisch *et al.*, 2004).

Bei bestehender Exposition können VOCs exogenen Ursprungs durch Resorption über Haut oder Schleimhäute (z. B. Inhalation, Ingestion) aus der Umwelt in den Körper aufgenommen werden (Beauchamp, 2011; Filipiak *et al.*, 2012). Mögliche Eintragsquellen exogener VOCs in den Organismus sind u. a. Nahrungsbestandteile (Taucher *et al.*, 1996; Lindinger *et al.*, 1997), Arzneimittel (Harrison *et al.*, 2003; Beauchamp *et al.*, 2010) oder Bestandteile der eingeatmeten Umgebungsluft (Mochalski *et al.*, 2013; Pleil *et al.*, 2013).

Eine eindeutige Unterscheidung von Substanzen endogenen und exogenen Ursprungs ist nach dem aktuellen Kenntnisstand oft nicht möglich, da Entstehungs- oder Herkunftsprozesse der meisten freigesetzten VOCs bisher nicht aufgeklärt sind. Werden VOCs exogenen Ursprungs nicht als solche erkannt, können sie zu falschen Schlussfolgerungen bei der Assoziation von VOCs mit krankhaften Zuständen führen und sind somit als potentielle Störgrößen bei der Definition volatiler Biomarker anzusehen (Filipiak *et al.*, 2012; Pleil *et al.*, 2013).

Mikroorganismen, die den Makroorganismus kolonisiert oder infiziert haben, können durch Synthese-, Um- und Abbauprozesse chemischer Verbindungen die Gesamtheit der im Organismus vorhandenen VOCs beeinflussen (Thorn and Greenman, 2012). So hat die intestinale Mikrobiota nicht nur das Potential das VOC-Profil von Stuhlproben zu beeinflussen, sondern kann auch durch einen möglichen Übertritt von volatilen Substanzen über die Darmwand in den Blutkreislauf des Makroorganismus (Kirsch *et al.*, 2012; Baranska *et al.*, 2013) die Zusammensetzung freigesetzter VOCs anderer biologischer Proben verändern.

### ***Freisetzung von VOCs***

Die Freisetzungskinetik von VOCs aus dem Körper ist neben den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen selbst vom jeweiligen Ausscheidungsorgan und der Konstitution (z. B. Körperfettgehalt, Gesundheitszustand) des Makroorganismus abhängig. VOCs endogenen und exogenen Ursprungs werden entsprechend ihrer physikochemischen und biologischen Eigenschaften (z. B. Molekülgröße, Hydro- und Lipophilie, Polarität, Bindung an Plasmaproteine) im Körper umgebaut, verteilt oder gespeichert (Haick *et al.*, 2014). Stark lipophile Substanzen können zunächst im Fettgewebe gespeichert und anschließend mit zeitlicher Verzögerung freigesetzt werden (Haick *et al.*, 2014). Durch eine intravasale Verteilung der volatilen Substanzen im Organismus können VOCs unabhängig

vom Bildungs- oder Eintragungsort biologische Grenzflächen der verschiedenen Ausscheidungsorgane erreichen und dort freigesetzt werden. Zum Beispiel gelangen VOCs aus den Alveolarkapillaren über die alveolo-kapilläre Barriere in den Alveolarraum und somit aus dem Blutkreislauf in die Ausatemungsluft (Schubert *et al.*, 2001).

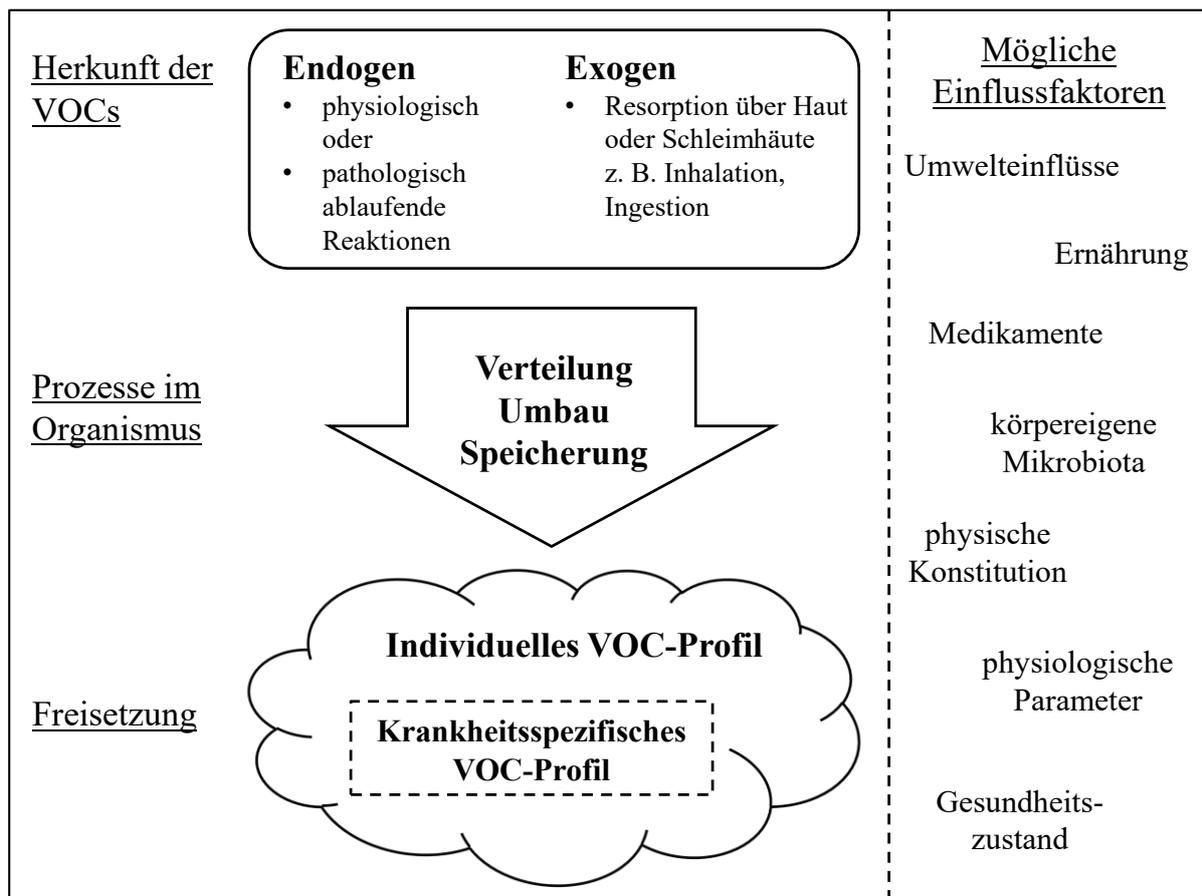
### ***Zusammensetzung freigesetzter VOCs und Einflussfaktoren***

Die Zusammensetzung der von den verschiedenen Probenmatrizes freigesetzten VOC-Profile ist meist komplex. Sie kann aus zahlreichen, chemisch heterogenen Substanzen in sehr unterschiedlichen Konzentrationen bestehen. Kürzlich wurden alle bisher detektierten, von augenscheinlich gesunden Menschen freigesetzten VOCs von de Lacy Costello *et al.* (2014) in einer Übersichtsarbeit zusammengestellt. Insgesamt wurden bisher 1840 verschiedene VOCs ermittelt, wobei die höchste Anzahl unterschiedlicher Substanzen im ausgeatmeten Gasmisch (872 VOCs) detektiert wurde. Des Weiteren konnten 532 von der Haut freigesetzte VOCs identifiziert werden. Jeweils im Headspace fanden sich 381 VOCs über Stuhlproben, 359 VOCs über Speichelproben, 279 VOCs über Urinproben, 256 VOCs über Milchproben und 154 VOCs über Blutproben. Die qualitative Zusammensetzung verschiedener Probenmatrizes ist sehr unterschiedlich. Nur 12 der 1840 VOCs wurden überlappend in allen Körperflüssigkeiten und in der Atemluft nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um Acetaldehyd, Aceton, Benzaldehyd, 1-Butanol, 2-Butanon, Hexanal, Heptanal, Octanal, Pentanol, Benzol, Styrol und Toluol (de Lacy Costello *et al.*, 2014).

Die Hauptkomponenten der expiratorischen Fraktion des Atemgases sind Stickstoff (ca. 78 %), Sauerstoff (ca. 17 %), Kohlenstoffdioxid (ca. 4 %), Edelgase (ca. 1 %) und Wasserdampf. Einen geringen Anteil machen die endogen gebildeten, anorganischen Gase Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid und nicht volatile Substanzen wie Isoprostane, Cytokine, Lipoxine, Prostaglandine und Leukotriene, die im Atemkondensat gefunden werden, aus (Munoz *et al.*, 2015). Weiterhin sind bis zu mehreren hundert verschiedene VOCs in einem Konzentrationsbereich von nmol/l bis pmol/l (parts per million by volume–parts per trillion by volume; ppmV–pptV) enthalten (Schubert *et al.*, 2004). Die im Atemgas vorhandenen VOCs gehören überwiegend folgenden chemischen Gruppen an: gesättigte, ungesättigte und verzweigte Kohlenwasserstoffe, aromatische Verbindungen, Ketone, Aldehyde sowie stickstoff- und schwefelhaltige organische Verbindungen (Miekisch *et al.*, 2014).

Das von einem Individuum freigesetzte VOC-Profil einer biologischen Probe kann aus mehreren hundert Substanzen bestehen (Phillips *et al.*, 1999), wobei die qualitative und quantitative Zusammensetzung der freigesetzten VOCs oft eine große inter- und intraindividuelle Variabilität zeigt. Selbst in Studien mit gesunden Probanden und unter standardisierten Bedingungen bezüglich Probenahme und Probenanalytik variierten die detektierten VOC-Profile stark (Phillips *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2006; Garner *et al.*, 2007;

Ligor *et al.*, 2008; Al-Kateb *et al.*, 2013). Lebensstil und Phänotyp des Probanden sind hier wichtige Faktoren, die die qualitative und quantitative Zusammensetzung des VOC-Profiles beeinflussen. Die individuelle Expositionshistorie bezüglich exogenen Substanzen, z. B. aus der Umgebungsluft (Beauchamp, 2011), durch das Rauchen (Gordon *et al.*, 2002; Kischkel *et al.*, 2010) oder aus der Nahrung (Lindinger *et al.*, 1997; Baranska *et al.*, 2013), muss als wichtiger Einflussfaktor angesehen werden. Genetisch veranlagte oder erworbene morphologische und physiologische Eigenschaften des Probanden, wie das Alter (Taucher *et al.*, 1997; Spanel *et al.*, 2007) oder der Körperfettgehalt (Haick *et al.*, 2014), können das freigesetzte VOC-Profil durch Beeinflussung ablaufender physiologischer und pathophysiologischer Reaktionen sowie von Verteilungs-, Umbau- und Speicherungsprozessen verändern. Es konnte gezeigt werden, dass auch Variationen physiologischer Parameter während der Probenahme einen Einfluss auf das resultierende VOC-Profil haben, z. B. körperliche Betätigung (King *et al.*, 2009), Veränderung des Atmungsmusters (Sukul *et al.*, 2014) oder der Körperposition (Sukul *et al.*, 2015). Ein Modell zu Prozessen und Einflussfaktoren, die die Qualität und Quantität des VOC-Profiles eines Individuums beeinflussen, wird in Abbildung (Abb.) 1 gezeigt.



**Abb. 1: Modell beeinflussender Prozesse und Faktoren auf volatile organische Substanzen (volatile organic compounds, VOCs) im Makroorganismus**

Die Auswirkung von Faktoren, die unabhängig vom pathologischen Zustand des Organismus die Zusammensetzung der freigesetzten VOCs beeinflussen, sollten bei der Definition von krankheits-assoziierten Biomarkern beachtet werden (Dummer *et al.*, 2011). Um das krankheitsbezogene VOC-Profil als Bestandteil des individuellen VOC-Profiles definieren und von letzterem abgrenzen zu können, sind Kenntnisse über die physiologische Schwankungsbreite und mögliche Einflussfaktoren freigesetzter VOCs gesunder Probanden nötig. Hierzu fehlen allerdings bislang belastbare Daten im Schrifttum.

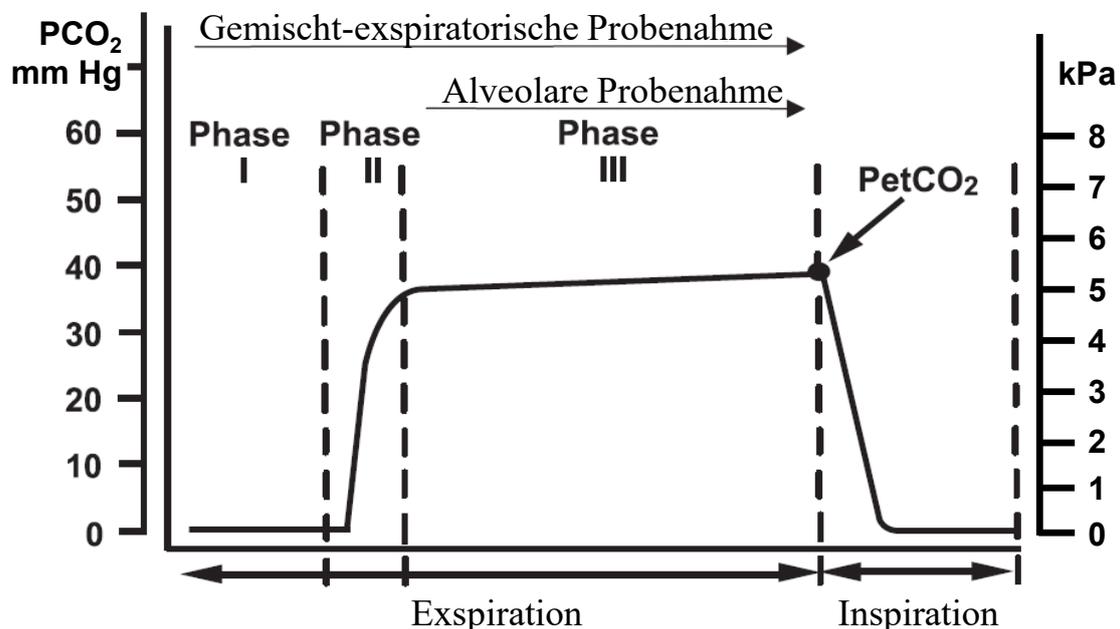
## 2.2 Analytik von VOCs

Die Detektion von VOCs stellt hohe Anforderungen an das angewendete Analyseverfahren. Die zu analysierenden volatilen Substanzen müssen häufig in extrem niedrigen Konzentrationen (pmol/l–nmol/l; pptV–ppbV) aus einer komplexen Probenmatrix detektiert werden, die oft neben einer hohen chemischen Heterogenität der vorhandenen Substanzen auch große Mengen an Wasserdampf aufweist. Um VOCs als Markersubstanzen mit (patho-)physiologischen Vorgängen in Zusammenhang zu bringen, ist eine eindeutige Identifizierung und besser noch Quantifizierung der Substanzen nötig. Durch die noch fehlende Etablierung standardisierter Methoden zur Probengewinnung, Analyse und Datenauswertung sind bisherige Studienergebnisse in ihrer Vergleichbarkeit limitiert (Miekisch *et al.*, 2004; Haick *et al.*, 2014; Beauchamp, 2015).

### ***Probenahme***

Als Probenmatrix zur Analyse von VOCs dienen gasförmige Proben, z. B. das Atemgas oder der Headspace über flüssigen oder festen Proben, wie verschiedene Se- und Exkrete (z. B. Urin, Kot, Speichel und Schweiß) (de Lacy Costello *et al.*, 2014). Die Gewinnung der Proben erfolgt mittels nicht invasiver Methoden, wodurch die VOC-Analyse eine hohe Akzeptanz bei Patienten erfährt. Ist durch die örtliche oder zeitliche Trennung von Probenahme und Analyse eine vorübergehende Aufbewahrung der gasförmigen Proben nötig, erfolgt dies überwiegend mittels Gaskanistern oder speziellen Beuteln aus inerten Materialien, v. a. Tedlar bags, Teflon bags und Nalophan bags (Beauchamp, 2015). Um geringe Mengen von VOCs nachweisen zu können, ist für einige Analyseverfahren eine vorherige Probenanreicherung nötig. Die Probenanreicherung kann physikalisch durch Kühlfallen (Kryofokussierung; Boyaci *et al.*, 2010) oder mittels adsorptiver Bindung (Grote and Pawliszyn, 1997; Lord *et al.*, 2010) erfolgen. Spezielle Mikroextraktionstechniken, wie die Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction; SPME) und die Needle Trap Mikroextraktion (NTME), ermöglichen die gleichzeitige Probensammlung und Probenanreicherung und lassen sich mit der GC-MS-Analytik kombinieren (Miekisch *et al.*, 2014). Vorteile der beiden Mikroextraktionstechniken sind u. a. ein geringes Probenvolumen und eine schnell durchführbare Probenahme (Miekisch *et al.*, 2014).

Die Durchführung der Atemgassammlung ist kaum belastend für den Patienten, schmerzfrei und beliebig oft wiederholbar. Außerdem lässt sie sich am nicht kooperativen Patienten, wie z. B. beatmeten Menschen auf der Intensivstation (Schubert *et al.*, 2004) und Tieren (Ellis *et al.*, 2014), anwenden. Die Sammlung der VOCs kann gemischt-expiratorisch oder ausschließlich aus dem Alveolargas (Abb. 2) sowie aus einzelnen oder wiederholten Atemzügen erfolgen (Beauchamp, 2015). Die exhaliierte  $\text{CO}_2$ -Konzentration stellt einen direkten Marker für die alveolare Be- und Entlüftung dar. Mit Hilfe einer kontinuierlichen  $\text{CO}_2$ -Messung kann zwischen den Atmungsphasen unterschieden werden, was eine kontrollierte Sammlung von VOCs ermöglicht. Eine Kontrolle der Probenahme kann auch durch Detektion von exhaliiertem Sauerstoff, Temperatur oder Gasfluss (Flow) erfolgen (Miekisch *et al.*, 2014).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung eines physiologischen Kapnogramms und der  $\text{CO}_2$ -kontrollierten Atemgasprobenahme (modifiziert nach Miekisch *et al.*, 2004)

- Phase I:  $\text{CO}_2$ -freie Expirationsphase (Gas aus dem anatomischen Totraum)  
 Phase II: Mischluft-Phase (Gas aus dem anatomischen Totraum und den Alveolen)  
 Phase III: Phase der alveolaren  $\text{CO}_2$ -Ausatmung (Alveolargasphase oder Plateauphase)  
 Pet $\text{CO}_2$ : endexpiratorischer oder endtidaler  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, maximale  $\text{CO}_2$ -Konzentration am Ende des Plateaus

### Analyse

Analytische Methoden der VOC-Analyse werden in spezifische Verfahren mit Identifizierung der chemischen Substanz und in unspezifische Verfahren mit Detektion volatiler Muster, aber ohne Identifizierung einzelner Substanzen eingeteilt.

Unter den spezifischen Verfahren gilt die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie als „Goldstandard“ für die qualitative und quantitative Analyse von komplexen Proben (Filipiak *et al.*, 2012; Beauchamp, 2015). Dieses Verfahren bedarf einer aufwendigen Probenahme und Probenanreicherung, ermöglicht aber eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung von VOCs (Boots *et al.*, 2012). Mittels GC werden die nachzuweisenden Substanzen nach ihren physikochemischen Eigenschaften aufgetrennt. Nach anschließender Analyse mittels MS ergibt sich für die detektierten Verbindungen eine charakteristische Kombination aus Massenspektrum (Masse-Ladungsverhältnis und Fragmentierungsmuster) und Retentionszeit. Mit Nachweisgrenzen im pptV-Bereich nach vorheriger Probenanreicherung (Miekisch and Schubert, 2006) stellt die GC-MS eine hoch sensitive Methode dar (Kim *et al.*, 2012). Die Analyse mittels GC-MS ist zwar sehr zeitaufwendig, jedoch für grundlegende Untersuchungen zur Identifizierung neuer volatiler Biomarker unverzichtbar (Miekisch *et al.*, 2014).

Zunehmend werden massenspektrometrische Verfahren wie die Protonen-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (engl. proton-transfer-reaction mass spectrometry; PTR-MS) (Herbig *et al.*, 2009; Zhan *et al.*, 2013), die Selected-Ion-Flow-Tube Massenspektrometrie (engl. selected ion flow tube mass spectrometry; SIFT-MS) (Smith and Spänel, 2005; Spänel and Smith, 2011), die Ionenmobilitätsspektrometrie (engl. ion mobility spectrometry; IMS) (Baumbach, 2009; Fink *et al.*, 2014) und die über einen optischen Nachweis detektierende Laserspektroskopie (McCurdy *et al.*, 2007; Wang and Sahay, 2009) zur VOC-Analyse eingesetzt. Für diese Verfahren ist eine zeitaufwendige Probenaufbereitung vor der Analyse nicht notwendig. Dank der schnellen Analysezeit ist eine Vor-Ort-Detektion zuvor identifizierter Markersubstanzen möglich. Diese Verfahren eignen sich jedoch nicht für die Identifizierung unbekannter Substanzen und die Suche nach neuen Biomarkern (Miekisch and Schubert, 2006; Kim *et al.*, 2012; Miekisch *et al.*, 2014).

Unspezifische Verfahren wie die Differentielle Ionenmobilitätsspektrometrie (engl. differential ion mobility spectrometry; DMS) (Purkhart *et al.*, 2011), die Elektronische Nase (e-nose) (Machado *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2010; Fens *et al.*, 2013) und andere Sensortechniken (Di Natale *et al.*, 2014; Kurada *et al.*, 2015; Munoz *et al.*, 2015) können spezifische volatile Muster wiedererkennen, sind aber nicht für die Analyse unbekannter, flexibler Substanzspektren geeignet. Die verwendeten Geräte sind handlich, transportabel, lassen sich einfach bedienen und haben kurze Analysezeiten. Perspektivisch können sie daher in der klinischen Anwendung für ein Point-of-care Testing (patientennahe Schnelltestung vor Ort) geeignet sein.

Der Einsatz unspezifischer Analyseverfahren mit reduzierten Analyse- und Auswertezeiten ist aber erst dann sinnvoll, wenn zuvor die Identifizierung zuverlässiger Biomarker und

möglicher Störgrößen durch ein zeitlich und technisch aufwendigeres Verfahren stattgefunden hat.

### **2.3 Aspekte bei der Nutzung von VOCs in der veterinärmedizinischen Diagnostik**

Auch in der Veterinärmedizin besteht ein großes Interesse an der Nutzung von VOCs zu diagnostischen Zwecken. Studien zur Anwendung der VOC-Analyse in der Veterinärmedizin wurden bereits bei diversen Tierarten durchgeführt, u. a. bei Ratten (Moorhead *et al.*, 2011; Guaman *et al.*, 2012; Bos *et al.*, 2013; Albrecht *et al.*, 2015), Hunden (de Oliveira *et al.*, 2008; Dissanayake *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014) und Dachsen (Fend *et al.*, 2005; Spooner *et al.*, 2009). Bislang bekannte Studien zur Diagnostik verschiedener Krankheitsbilder bei Wiederkäuern sind in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst.

Das Auftreten eines süßlich-fruchtigen Geruchs in der Ausatemluft, der Milch und dem Urin von an der Stoffwechselerkrankung Ketose leidenden Rindern ist ein lang bekanntes Phänomen in der Veterinärmedizin. Dobbelaar *et al.* konnten 1996 erstmals einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Konzentration von  $\beta$ -Hydroxybutyrat im Serum sowie von Acetoacetat und Aceton in der Milch und einem gesteigerten Gehalt an Aceton im Atemgas von Rindern belegen.

Ein Schwerpunkt der bisher im Schrifttum dokumentierten Untersuchungen liegt auf der Diagnostik von Infektionskrankheiten unterschiedlicher Wiederkäuerspezies. Mehrere Studien fokussierten sich dabei auf Infektionen mit *Mycobacterium bovis* (Tuberkulose) und MAP (Paratuberkulose). Dabei wurden unterschiedliche Analyseverfahren (GC-MS, e-nose und DMS) angewendet und die Eignung verschiedener Probenmatrizes, wie z. B. Atemgas, Blutserum und Kot, geprüft. Bei der Untersuchung von flüchtigen organischen Substanzen im Atemgas und im Headspace über Kotproben von experimentell mit MAP infizierten Ziegen mittels DMS zeigten sich Veränderungen in deren Signalmustern gegenüber denen von nicht infizierten Ziegen (Purkhart *et al.*, 2011). Eine Identifizierung der zugrunde liegenden diskriminierenden VOCs war in dieser Studie mittels der eingesetzten DMS jedoch nicht möglich. Die Identifizierung von krankheits-assoziierten Biomarkern befindet sich aktuell auf dem Niveau von Pilotstudien. Zwar können häufig potentielle Markersubstanzen identifiziert werden, die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit anderen Studien ist aber meist nicht möglich (Beauchamp, 2015; Brodrick *et al.*, 2015).

**Tab. 1: Übersicht über bereits durchgeführte Studien zur Nutzung von VOCs zur Diagnostik von Erkrankungen bei Wiederkäuern**

Erkrankung	Tierart	Probenmatrix	Analyseverfahren	Referenz
<u>Infektionskrankheit</u>				
Tuberkulose ( <i>M. bovis</i> )	Rind	Blutserum	Elektronische Nase	Fend <i>et al.</i> , 2005
	Rind	Atemgas	GC-MS, Sensor arrays	Peled <i>et al.</i> , 2012
	Rind	Atemgas	GC-MS	Ellis <i>et al.</i> , 2014
	Rind	Blutserum	Elektronische Nase	Cho <i>et al.</i> , 2015
Paratuberkulose (MAP)	Rind	Blutserum	Elektronische Nase	Knobloch <i>et al.</i> , 2009
	Ziege	Atemgas, Kot	DMS	Purkhart <i>et al.</i> , 2011
	Ziege	Atemgas, Kot	GC-MS	Bergmann <i>et al.</i> , 2015
Brucellose ( <i>Brucella</i> subspecies)	Rind	Blutserum	Elektronische Nase	Knobloch <i>et al.</i> , 2009
	Bison	Atemgas	GC-MS, Sensor arrays	Bayn <i>et al.</i> , 2013
Atemwegsinfektionen	Rind	Atemgas	GC-MS	Spinhirne <i>et al.</i> , 2004
	Rind	Blutserum	Elektronische Nase	Knobloch <i>et al.</i> , 2010
<u>Stoffwechselerkrankung</u>				
Ketose	Rind	Atemgas	GC-MS	Dobbelaar <i>et al.</i> , 1996
	Rind	Atemgas	Elektronische Nase, GC-MS, FTIR	Elliott-Martin <i>et al.</i> , 1997
	Rind	Atemgas	GC-MS	Mottram <i>et al.</i> , 1999

VOCs - volatile organic compounds; M. - *Mycobacterium*;

MAP - *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*; subsp. - subspecies;

DMS - Differentielle Ionenmobilitätsspektrometrie; FTIR - Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie; GC-MS - Gaschromatographie-Massenspektrometrie.

## 2.4 Aus dem Kenntnisstand der Literatur abgeleiteter Forschungsbedarf

Für die Verwendung von volatilen Biomarkern in diagnostischen Tests ist das zuverlässige Auftreten eines bestimmten Reaktionsmusters der diskriminierenden Substanzen infolge des zu testenden krankheits-assoziierten Zustands eine wichtige Voraussetzung. Selbst bei gesunden Probanden tritt eine hohe Variabilität in den freigesetzten VOC-Profilen auf. Zudem sind für die meisten bisher identifizierten, krankheits-assoziierten VOCs die zu deren Abbau oder Bildung führenden pathophysiologischen Hintergründe und biochemischen Prozesse noch nicht aufgeklärt.

Um die durch physiologische Prozesse verursachten Veränderungen im VOC-Profil von krankheits-assoziierten Reaktionsmustern abgrenzen zu können, ist ein generelles und grundlegendes Verständnis von nicht pathologischen Faktoren als mögliche Einflussgrößen und deren Auswirkung auf das resultierende VOC-Profil nötig. Unterschätzt man diese physiologisch auftretenden Einflussfaktoren, können sie bei der Suche nach krankheitsspezifischen VOC-Profilen oder Biomarkern zu falschen Schlussfolgerungen führen und die Zuverlässigkeit diagnostischer Tests reduzieren.

Bislang fehlen jedoch im Schrifttum gut dokumentierte, systematische Studien zur Evaluierung der biologischen Variabilität von VOC-Profilen sowie zum Einfluss definierter physiologischer Zustände bei Mensch und Tier. Letztere sind in der Humanmedizin nur sehr begrenzt durchführbar, da eine Standardisierung möglicher Einflussgrößen aus der Umgebung und des individuellen Lebensstils der Probanden kaum möglich ist. Im Gegensatz dazu ermöglichen Untersuchungen an definierten Tiermodellen einen weitaus höheren Grad der Standardisierung, da z. B. Haltungs- und Fütterungsbedingungen homogen gestaltet werden und evtl. Störgrößen aus der Umgebung der Tiere minimiert werden können. Das ist vorteilhaft bei der isolierten Betrachtung des Einflusses einzelner physiologisch auftretender Einflussfaktoren auf resultierende VOC-Profile, wofür – wie bereits erwähnt – noch erheblicher Forschungsbedarf besteht.

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Aufgabenstellung und Rahmenbedingungen

Das langfristige Ziel eines von der DFG geförderten Kooperationsprojektes des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) und der Universität Rostock besteht darin, VOCs als Biomarker für eine Infektion mit dem Bakterium *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) zu identifizieren und einer Schnelldiagnostik zugänglich zu machen (Förderkennzeichen: RE 1098/4-1, RE 1098/4-2, SCHU 1960/4-1, SCHU 1960/4-2).

Die Paratuberkulose ist eine durch MAP hervorgerufene Infektionskrankheit bei Haus- und Wildwiederkäuern, die weltweit zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führt (Hasonova and Pavlik, 2006; McKenna *et al.*, 2006). Die Ansteckung der Tiere erfolgt bereits während der ersten Lebenswochen, wogegen sich ein unspezifisches klinisches Erscheinungsbild infolge der chronisch granulomatösen Darmentzündung erst nach bis zu fünf Jahren manifestiert (Doyle and Spears, 1951; Whitlock and Buergelt, 1996). Die Diagnostik in der frühen Phase der Infektion ist mittels aktuell verfügbarer Untersuchungsmethoden (direkter Erregernachweis mittels kultureller Untersuchung oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von Kot- oder Milchproben; indirekter Erregernachweis mittels Gamma-Interferon-Test oder dem Nachweis spezifischer Antikörper) gegenwärtig noch nicht sicher möglich (Köhler *et al.*, 2008; Nielsen and Toft, 2008). Eine Früherkennung infizierter Tiere bereits in der initialen Phase der Infektion ist jedoch eine Grundvoraussetzung für eine bessere Kontrolle der Paratuberkulose in den Beständen (Bundesministerium für Verbraucherschutz, 2005).

Innerhalb dieses Projektes gelang die Identifizierung von VOCs, die während Vermehrungs- und Stoffwechselprozessen von MAP *in vitro* freigesetzt werden (Trefz *et al.*, 2013; Küntzel *et al.*, 2016). Des Weiteren wurden im Rahmen eines bereits etablierten Tiermodells (Köhler *et al.*, 2015) VOCs identifiziert, die sich potentiell als Biomarker für MAP-Infektionen eignen könnten (Bergmann *et al.*, 2015) (Anlage A1). Für die Diagnostik interessante, flüchtige Verbindungen wurden zum einen im Atemgas von experimentell mit MAP infizierten Ziegen und zum anderen im Headspace über deren Kotproben detektiert. Für beide Probenmatrizes fiel allerdings auf, dass die Variabilität der VOC-Profile innerhalb des Untersuchungszeitraums von einem Jahr, welcher zugleich das erste Lebensjahr der Tiere umfasste, erheblich war. Besonders die VOC-Profile der noch milchsaugenden Ziegen aus der frühen Phase des Untersuchungszeitraums schienen variabler zu sein als die späteren VOC-Profile der verdauungsphysiologisch gereiften Tiere. Es galt, die physiologische Variabilität und deren Einflussfaktoren im o. g. Ziegenmodell detailliert zu untersuchen, so dass zukünftig flüchtige Biomarker physiologischer Prozesse bekannt und von denen, die eine MAP-Infektion widerspiegeln, abgrenzbar sind.

Die beiden dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Studien ordnen sich in das beschriebene Gesamtprojekt ein und widmen sich folgender Arbeitshypothese:

*Potentielle, volatile Biomarker im Atemgas und im Headspace über Kotproben gesunder Ziegen werden durch physiologische Prozesse beeinflusst.*

Die Überprüfung dieser Hypothese wurde in standardisierten Großtiermodellen an klinisch gesunden Ziegen in den folgenden Längsschnittstudien durchgeführt.

#### STUDIE I

Während des ersten Lebensjahres entwickeln sich Ziegen von milchsaugenden Ziegenlämmern zu sich rein pflanzlich ernährenden Wiederkäuern. Mit Umstellung des Fütterungsregimes und zunehmendem Alter kommt es zu signifikanten Veränderungen in der körperlichen Entwicklung, den Verdauungsvorgängen und dem Metabolismus der Ziegen.

Hieraus ergab sich die folgende Fragestellung:

*Welchen Einfluss haben die Anpassung der Futterration sowie die somatische und metabolische Reifung auf die VOC-Profile im Atemgas und im Headspace über Kotproben bei gesunden Ziegen während des ersten Lebensjahres?*

#### STUDIE II

Infolge der morgendlichen Futteraufnahme und den nachfolgend im Organismus ablaufenden Verdauungsvorgängen kommt es bei gesunden Ziegen zu Veränderungen der im Blutkreislauf vorhandenen Metaboliten.

Hieraus ergab sich die folgende Fragestellung:

*Wie und in welchem Zeitfenster beeinflusst die Futteraufnahme das emittierte VOC-Profil im Atemgas gesunder Ziegen?*

Beide Studien wurden im Rahmen genehmigter Tierversuche durchgeführt. Zulassende Behörde war das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV); ehemals Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (TLLV). Die zugehörigen Registrierungsnummern waren 04-001/11 (STUDIE I) und 04-002/12 (STUDIE II). Die Haltung der Tiere während der Versuchsdurchführung erfolgte unter fachlicher Aufsicht des zuständigen Amtstierarztes innerhalb der genehmigten Versuchstierhaltung des FLI am Standort Jena. Die zuständige Tierschutzbeauftragte konnte uneingeschränkt tätig sein.

## **3.2 Tiere, Material und Methoden**

### **3.2.1 Haltung, Fütterung und Gesundheitszustand der Tiere**

Alle in die Untersuchungen einbezogenen Ziegen (STUDIE I: Anzahl (n)=15, STUDIE II: n=9) gehörten der Rasse „Thüringer Wald Ziege“ an und entstammten demselben Herkunftsbestand. Die Einstallung in das FLI erfolgte im Alter von 8 bis 16 Tagen (STUDIE I) bzw. im Alter von 9 bis 17 Tagen (STUDIE II). Das Geschlecht der Tiere war vorwiegend männlich, da weibliche Tiere im Herkunftsbestand zur Remontierung verblieben. Alle männlichen Ziegen wurden im Alter von 8 Wochen kastriert. Innerhalb jeder Studie wurden die Ziegen als Gruppe gemeinsam und ohne Kontakt zu anderen Tieren in einem geschlossenen Raum unter denselben klimatischen Bedingungen gehalten. Als Einstreu diente Stroh, das alle zwei Wochen komplett erneuert wurde.

Die Fütterung wurde dem Entwicklungsstand der Tiere angepasst und von einer Ernährung mit Milchaustauscher-Tränke (Denkamilk Capritop, Denkavit Futtermittel GmbH, Warendorf, Deutschland) auf ein Alleinfuttermittel für Lämmer (Alleinfuttermittel für Ziegenmastlämmer, Landhandelsgesellschaft eG, Schmölln, Deutschland) und schließlich auf ein Alleinfuttermittel für erwachsene Ziegen (Milchleistungsfutter, Landhandelsgesellschaft eG, Schmölln, Deutschland) umgestellt. Trinkwasser, Heu und Mineralfutter in Form von Salzlecksteinen (Blattimin, Höveler Spezialfutterwerke GmbH und Co. KG, Dormagen, Deutschland) standen den Tieren jederzeit zur freien Verfügung.

Ein mikrobiologisches Screening zum Zeitpunkt der Einstallung sowie die regelmäßige metaphylaktische Behandlung gegen Endo- und Ektoparasiten konnte die Abwesenheit relevanter Infektionen sicherstellen. Der Gesundheitszustand aller Tiere wurde durch eine tägliche, klinische Untersuchung und die im Anschluss an die Studien durchgeführte Sektion mit pathologisch-anatomischer Untersuchung erfasst.

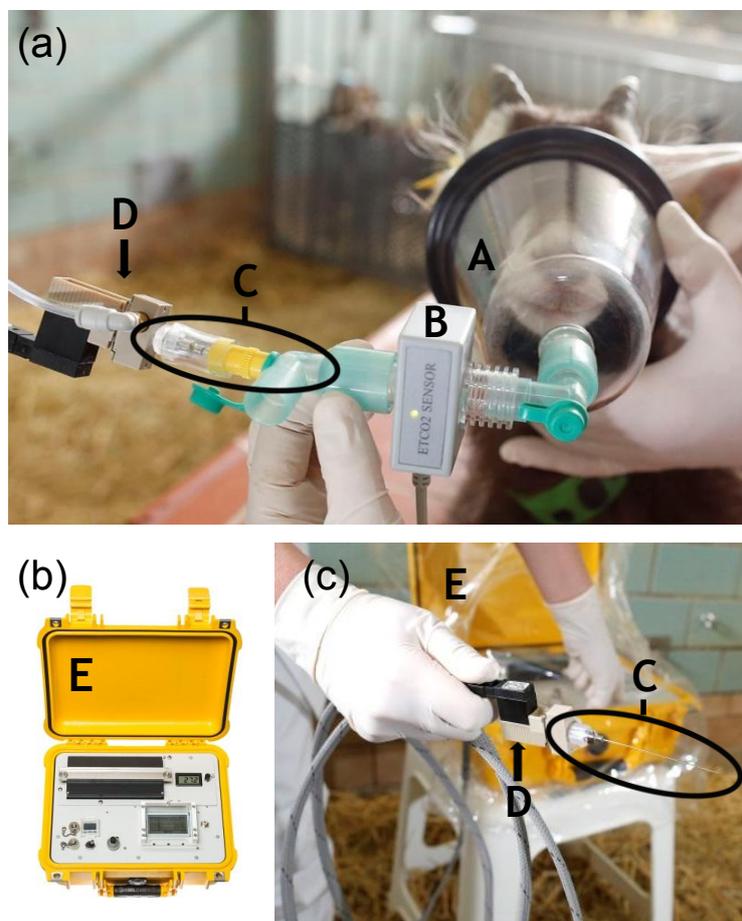
Weitere Details zur Charakterisierung der Tiere finden sich in den jeweiligen Publikationen (STUDIE I und II).

### **3.2.2 Analytik der VOCs**

In STUDIE I wurden flüchtige organische Substanzen im exhalieren Atemgas sowie im Headspace über Kotproben der Ziegen analysiert. Zusätzlich erfolgte zu Vergleichszwecken die Analyse der in der inhalierten Luft der Ziegen vorhandenen VOCs durch Probenahme der umgebenden Raumluft auf Kopfhöhe der Ziegen. In STUDIE II erfolgte die Analyse der volatilen organischen Verbindungen im Atemgas der Ziegen und ebenfalls vergleichsweise der VOCs in der umgebenden Raumluft.

In beiden Studien kam eine automatisierte, CO<sub>2</sub>-gesteuerte Probenahmetechnik zur Sammlung der VOCs aus dem Atemgas zum Einsatz (Abb. 3 a, b). Mit Hilfe eines in das

Probenahmesystem integrierten Kapnometers wurde der  $\text{CO}_2$ -Gehalt des exhalieren Gasmisches kontinuierlich überwacht. Bei Erreichen der Alveolargasphase öffnete sich automatisch ein  $\text{CO}_2$ -getriggertes Ventil. Durch den vom Probenahmegerät erzeugten Unterdruck wurde das exhalierete Gas durch das Needle Trap Device (NTD) geleitet. Somit konnte gewährleistet werden, dass das aus dem anatomischen Totraum stammende Exhalat verworfen und volatile Substanzen aus dem alveolaren Gasmisch am Ende der Ausatemungsphase gesammelt wurden. Für eine automatisierte, standardisierte und kontrollierte Sammlung der in der Raumluft vorhandenen VOCs wurde das gleiche Probenahmesystem eingesetzt, jedoch unter Ausschluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration als Steuerparameter (Abb. 3 c).



**Abb. 3: Das automatisierte Needle Trap Mikroextraktions (NTME)-Probenahmesystem**

Automatisierte,  $\text{CO}_2$ -gesteuerte Probenahme von VOCs aus dem alveolaren Atemgas bei spontan atmenden Ziegen mittels NTME-Probenahmesystem (a, b; entnommen aus Fischer *et al.*, 2015). Automatisierte, kontrollierte Probenahme von VOCs aus der umgebenden Raumluft auf Kopfhöhe der Ziegen mittels NTME-Probenahmesystem (c).

A - Atemmaske; B -  $\text{CO}_2$ -Sensor; C - Needle Trap Device (NTD), umhüllt von einem Schutzschlauch zur mechanischen Stabilisierung; D -  $\text{CO}_2$ -gesteuertes Ventil; E - Automatisiertes NTME-Probenahmesystem mit integrierter Kapnometrie und Pumpensystem, verbunden mit B und D.

Die Kotproben wurden von jedem Tier einzeln gesammelt und in spezielle, luftdicht verschlossene und mit einem Septum versehene Headspace-Gläser überführt.

Eine Probenanreicherung erfolgte im Atemgas und der Raumluft mit Hilfe der NTME und im Headspace über Kotproben mittels SPME. Die adsorbierten VOCs wurden im Injektor des Gaschromatographen mittels thermischer Desorption freigesetzt, gaschromatographisch aufgetrennt und mittels MS detektiert. Die Analyse der Proben wurde in weniger als 48 Stunden nach Probenahme durchgeführt. Die Identifizierung erfolgte durch Abgleich der Massenspektren einzelner Peaks des Chromatogramms mit einer massenspektrometrischen Datenbank (National Institute of Standardization and Technology; NIST 2005, Gatesburg, PA, USA). Um eine eindeutige Identifizierung sicher zu stellen, wurden zusätzlich Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster der Massenspektren von reinen Referenzsubstanzen bestimmt und abgeglichen. Die Quantifizierung basierte auf einer Kalibration mit reinen Referenzsubstanzen.

Weitere Details bezüglich der Analytik der VOCs sind in der jeweiligen Publikation dargelegt (STUDIE I und II).

### 3.2.3 Studiendesign

#### STUDIE I

Die Untersuchungen erfolgten an klinisch gesunden Ziegen (n=15) während des ersten Lebensjahres (3.–57. Lebenswoche) (Abb. 4). Die Futtermittellieferung wurde während der ersten drei Lebensmonate von einer Tränke mit Milchaustauscher auf eine rein pflanzliche Ernährung umgestellt.

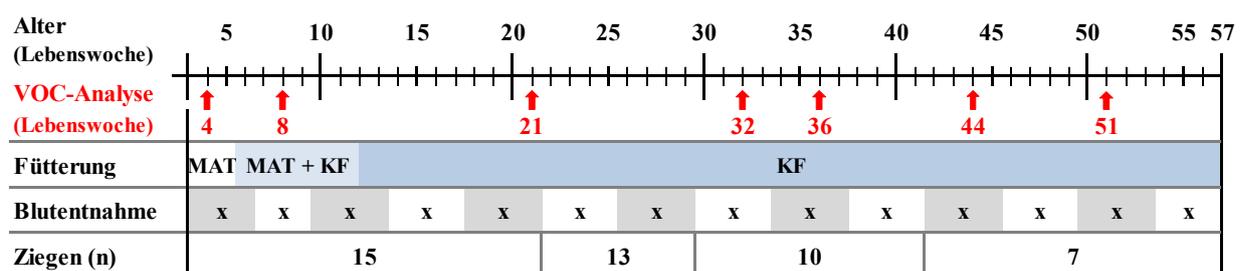


Abb. 4: Schematische Übersicht über den Versuchsablauf (STUDIE I)

VOC - volatile organic compound; MAT - Milchaustauscher-Tränke; KF - Kraftfutter; n - Anzahl der Tiere.

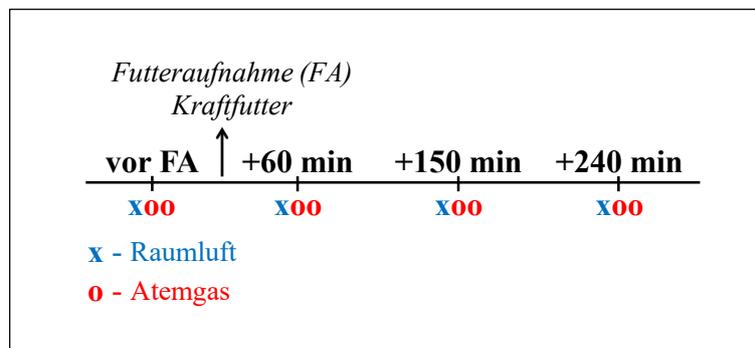
Um die Einflüsse der Umstellung des Fütterungsregimes und des zunehmenden Alters der Tiere auf die freigesetzten VOC-Profile zu erfassen, wurden – wie in Abb. 4 illustriert – zu sieben Zeitpunkten die detektierbaren VOCs zeitgleich im Atemgas, der Raumluft und im

Headspace über Kotproben analysiert. Für das zeitgleiche Monitoring der körperlichen und metabolischen Entwicklung wurden die Verläufe der Körpertemperatur, der Atmungsfrequenz und der Körpermasse sowie die Konzentrationen von Glucose, Totalprotein und Albumin im venösen Blut der Tiere erfasst.

Eine kontinuierliche Überwachung des Gesundheitszustands der Tiere erfolgte im Rahmen einer täglich stattgefundenen klinischen Untersuchung eines jeden Einzeltiers. Die Versuchstiere dienten zusätzlich als gesunde Kontrolltiere in einer weiteren Studie (Krüger *et al.*, 2015), in deren Ablauf regelmäßig durchzuführende Sektionen mit pathologischer Untersuchung unumgänglich waren. Dadurch kam es zu einer Reduzierung der Anzahl der in den Versuch eingeschlossenen Ziegen im Versuchszeitraum (Abb. 4).

## STUDIE II

Die Untersuchungen wurden ebenfalls an klinisch gesunden Ziegen (n=9) und im Rahmen eines standardisierten Großtiermodells durchgeführt. Da das Ziel dieser Studie darin bestand, den unmittelbaren Einfluss der allmorgendlichen Futteraufnahme zu evaluieren, erfolgte die Sammlung von VOCs aus dem Atemgas unmittelbar vor der Aufnahme von Kraftfutter am Morgen (7:30 Uhr), sowie 60 Minuten, 150 Minuten und 240 Minuten nach der Fütterung. Zu jedem dieser vier Messzeitpunkte wurden zwei Atemgasproben je Tier gewonnen. Zu Vergleichszwecken erfolgte die Beprobung der Raumluft zu jedem Messzeitpunkt, und zwar jeweils unmittelbar vor der Sammlung der Atemgasproben (Abb. 5). Die Studie umfasste zwei identische Messkampagnen in einem Abstand von 4 Wochen.



**Abb. 5: Design der Probenahme für eine Messkampagne (STUDIE II)**

Die Probenahme des Atemgases wird exemplarisch für ein Versuchstier dargestellt. min - Minuten.

Die Wiederholungen der Probenahmen des Atemgases bei jeder Ziege zu jedem Zeitpunkt und in einer zweiten Messkampagne nach 4 Wochen erfolgten, um die inter- und intraindividuelle Variationsbreite sowie die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen abschätzen zu können. Zum Zeitpunkt der ersten Messkampagne waren die Tiere 10 Monate

alt, zum Zeitpunkt der zweiten 11 Monate. Eine jede Messkampagne umschloss drei aufeinanderfolgende Versuchstage, wobei an einem Versuchstag jeweils von drei Ziegen Proben gesammelt und die Reihenfolge der Tiere zwischen den Messkampagnen randomisiert wurde.

Weitere Details der Studiendesigns sind in der entsprechenden Publikation dargelegt.

## 4 Publikationen und Darlegung der persönlichen Beiträge

### STUDIE I

**Fischer, S.;** Trefz, P.; Bergmann, A.; Steffens, M.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):

Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model.

Journal of Breath Research 9 (2): 027108

DOI: 10.1088/1752-7155/9/2/027108

### STUDIE II

**Fischer, S.;** Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, P.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):

Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model.

Journal of Breath Research 9 (4): 047113

DOI: 10.1088/1752-7155/9/4/047113

Der persönliche Beitrag zu den Publikationen wird zu Beginn der jeweiligen Publikation dargelegt.

#### **4.1 STUDIE I:**

### **Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model**

Persönlicher Beitrag:

- Beteiligung an der Erfassung der Daten aus den VOC-Analysen
- mathematisch-statistische Auswertung der klinischen Daten, der Blutparameter und der VOC-Daten
- Erstellung des Manuskriptentwurfs inklusive der Abbildungen und Tabellen

Dieses Journal können Sie online einsehen.

<https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/2/027108>

## **4.2 STUDIE II: Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model**

Persönlicher Beitrag:

- Entwicklung, Konzeption und Planung der experimentellen Studie
- Durchführung der experimentellen Studie
  - Klinische Untersuchung der Tiere
  - Probenahme und Probenaufbereitung folgender Proben: Atemgas, Raumluft
  - Beteiligung an der Analyse der VOCs
- Erfassung und mathematisch-statistische Auswertung der klinischen Daten und der VOC-Daten
- Erstellung des Manuskriptentwurfs inklusive der Abbildungen und Tabellen

Dieses Journal können Sie online einsehen.

<https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/4/047113>

## 5 Diskussion

Für einen verlässlichen Einsatz von volatilen Biomarkern zur Diagnostik von Krankheiten sind Kenntnisse über die biologische Variabilität und mögliche Einflussfaktoren nötig. In zwei Studien wurde erstmals der Einfluss der Ernährung und des Alters (STUDIE I) sowie der Futteraufnahme (STUDIE II) auf potentielle, volatile Biomarker bei gesunden Ziegen untersucht. Durch die Standardisierung möglicher Störgrößen (Fütterungsregime, physische Konstitution, Umwelteinflüsse, u. a.) bot das bereits etablierte Großtiermodell gute Voraussetzungen für eine valide Untersuchung physiologisch auftretender Einflussfaktoren. Die automatisierte, standardisierte und kontrollierte Probenahme und Probenanreicherung mit Hilfe spezieller Mikroextraktionsverfahren in Kombination mit der GC-MS-Analyse ermöglichte eine verlässliche Identifizierung und Quantifizierung der volatilen Substanzen. Die Ergebnisse der beiden Studien bestätigten einen signifikanten Einfluss der untersuchten physiologischen Prozesse auf freigesetzte VOCs. Die Erkenntnisse beider Studien sind von großer Relevanz bei der zukünftigen Definition von Biomarkern für pathophysiologische Prozesse bei Ziegen.

### 5.1 Validität und Relevanz der experimentellen Studien

#### 5.1.1 Beurteilung des Tiermodells

In den beiden tierexperimentellen Studien mit Ziegen wurden homogene Tiergruppen bezüglich Tierart, Rasse und Alter eingesetzt. Die Ziegen entstammten nicht infizierten Kontrollgruppen aus einem definierten und gut dokumentierten Infektionsmodell, das sich an dem bereits etablierten Modell von Köhler *et al.* (2015) orientierte. Alle Tiere stammten aus demselben Herkunftsbetrieb. Die Tiere jeweils einer Studie lebten unter einheitlichen Haltungsbedingungen, insbesondere bezüglich des Fütterungsregimes (Menge und Art des Futters, Fütterungszeiten), und waren allzeit den gleichen, von außen einwirkenden Umwelteinflüssen (klimatische Einflüsse, Aufnahme exogener Substanzen) ausgesetzt.

Durch den Umfang der Standardisierung bot das eingesetzte Tiermodell beste Voraussetzungen für eine isolierte Betrachtung der in beiden Studien untersuchten, physiologisch auftretenden Einflussfaktoren ohne Ausschluss der natürlich vorkommenden biologischen Vielfalt und Variabilität. Der Einsatz eines standardisierten Großtiermodells für die Untersuchung von physiologisch auftretenden Einflussfaktoren wurde als vorteilhaft gegenüber Studien mit menschlichen Probanden angesehen. Bei letzteren wäre eine Standardisierung der Probandengruppe und anderer Rahmenbedingungen in einem vergleichbaren Umfang nicht möglich. In Studien an Menschen wurde die Zusammensetzung der freigesetzten volatilen Substanzen durch individuelle Unterschiede in der Ernährungsweise (Lindinger *et al.*, 1997; Baranska *et al.*, 2013), der physischen Konstitution (Spanel *et al.*, 2007; Haick *et al.*, 2014), des Gesundheitszustands (Spanel and Smith, 2011),

der Arzneimitteleinnahme (Miekisch *et al.*, 2008; Berchtold *et al.*, 2014), des Zigaretten- und Drogenkonsums (Kischkel *et al.*, 2010; Filipiak *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2016) sowie der einwirkenden Expositionen aus der Umwelt (Pleil *et al.*, 2011; Filipiak *et al.*, 2012) beeinflusst. Ein nicht abschätzbarer Einfluss durch nicht standardisierte Faktoren kann jedoch zu einer Verfälschung bei der gezielt isolierten Untersuchung des Einflusses einzelner physiologisch auftretender Prozesse führen.

Die Auswahl der Versuchstierart Ziege erfolgte aus zwei Gründen. Zum einen liegt ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung auf der Nutzung von volatilen Biomarkern in der Infektionsdiagnostik bei Wiederkäuern (Tab.1, Kapitel 2.3). Zum anderen bietet der Einsatz von Ziegen in tierexperimentellen Studien Vorteile gegenüber den ebenfalls wiederkäuenden Rindern. Aufgrund der geringeren Körpergröße von Ziegen ist die Handhabung dieser Tierart einfacher und bedarf weniger personellen Aufwands. Anschaffung und Haltung von Ziegen sind weniger kostenintensiv. Sie haben einen geringeren Platzbedarf als Rinder und die entstehenden Futterkosten sind niedriger.

Die klinische Gesundheit der in beiden Studien eingesetzten Tiere konnte durch ein mikrobiologisches Screening vor Beginn der jeweiligen Studie, prophylaktische Behandlungen gegen Endo- und Ektoparasiten und tägliche, klinische Untersuchungen im Verlauf der Studien sowie zum Abschluss durch eine pathologisch-anatomische Untersuchung bestätigt werden.

*Fazit:* Das in den tierexperimentellen Studien eingesetzte caprine Großtiermodell erwies sich durch den Umfang der Standardisierung als geeignet zur isolierten Untersuchung physiologischer Einflussgrößen auf freigesetzte VOCs und kann für weitere Studien empfohlen werden.

### **5.1.2 Beurteilung der Analytik der VOCs**

Für eine zuverlässige Analyse der VOCs erfolgte die Probenahme aus den Probenmatrizes Atemgas, Raumluft und Kot automatisiert, kontrolliert und standardisiert. Um den hohen Anforderungen an eine eindeutige Identifizierung und verlässliche Quantifizierung der volatilen Substanzen zu entsprechen, kamen speziell adaptierte Mikroextraktionsverfahren (SPME, NTME) in Kombination mit der GC-MS-Analyse zum Einsatz.

Mittels SPME erfolgte die Extraktion und Adsorption der im Headspace über den Kotproben vorhandenen VOCs (STUDIE I). Die SPME hatte sich zuvor bereits für das Headspace-Sampling verschiedener biologischer Proben (Mills and Walker, 2000; Trefz *et al.*, 2013) und insbesondere Headspace-Untersuchungen von Kotproben (Mills and Walker, 2000; Garner *et al.*, 2007; De Lacy Costello *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2011; Couch *et al.*, 2013) bewährt. Bei der SPME handelt es sich um ein Extraktionsverfahren, das auf einem Verteilungsgleichgewicht der Analyten zwischen der Probenmatrix und der SPME-Faser

beruht. Die SPME-Faser besteht aus Quarz und einem Überzug aus adsorbierendem Material. Die Kombination verschiedenartiger Adsorbentien auf einer SPME-Faser erhöht die globale Erfassung der Analyten mit einer großen chemischen Diversität, wie sie typischerweise von biologischen Proben, wie Kotproben, freigesetzt werden (Dixon *et al.*, 2011). Die in STUDIE I verwendete Kombination von Polydimethylsiloxan (PDMS) und Carboxen eignet sich besonders zur Spurenanalyse leicht flüchtiger Verbindungen und wurde bereits erfolgreich in vorherigen Studien eingesetzt, die VOCs aus dem Headspace über Kotproben extrahierten (Garner *et al.*, 2007; De Lacy Costello *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 2008). Aufgrund der örtlichen Gegebenheiten wurden die Kotproben in verschlossenen Headspace-Gläsern zum Ort der Analyse überführt. Eine lagerungsbedingte Veränderung der im Headspace vorhandenen VOCs ist nicht auszuschließen. Um diesen Einfluss möglichst gering zu halten, wurden die Proben gekühlt und möglichst schnell der Analyse zugeführt. So konnte gewährleistet werden, dass die zeitliche Differenz zwischen Probengewinnung und Probenanalyse nicht mehr als 72 Stunden betrug.

Die Mikroextraktion der im Atemgas und der Raumluft vorhandenen VOCs wurde mittels NTME durchgeführt (STUDIE I und II). Die NTME ist ein volumenbasiertes Mikroextraktionsverfahren (Lord *et al.*, 2010), bei der die Menge extrahierter Analyte durch Erhöhung des Probevolumens gesteigert wird (Mieth *et al.*, 2009; Filipiak *et al.*, 2012; Trefz *et al.*, 2012; Trefz *et al.*, 2013). Bei der für die NTME verwendeten NTDs handelt es sich um Nadeln aus Edelstahl, die mit einem festen, adsorbierenden Material gefüllt sind. Gasförmige Proben werden durch die Nadeln hindurch geleitet und kommen so mit den Adsorbentien in Kontakt. Eine geeignete Auswahl bzw. Kombination von Füllmaterialien ermöglicht die Adsorption von VOCs verschiedener Substanzgruppen gemäß deren physikochemischen Eigenschaften (Miekisch and Schubert, 2006; Trefz *et al.*, 2013; Miekisch *et al.*, 2014).

In STUDIE I wurden mit Polymeren gefüllte NTDs verwendet. Diese zeigten bei Trefz *et al.* (2012) sehr gute Eigenschaften bezüglich Reproduzierbarkeit und Sensitivität für die getesteten VOCs. Durch die von Trefz *et al.* (2013) neu gewonnenen Erkenntnisse entschied man sich bei STUDIE II für die Verwendung von NTDs, die mit drei verschiedenen adsorbierenden Materialien (Divinylbenzol, Carboxen X, Carboxen 1000) gefüllt waren. Während die Mikroextraktion bei den dreifach gefüllten NTDs durch den hohen Feuchtigkeitsgehalt der Atemgasproben nicht negativ beeinflusst wurde, fiel die Effizienz der Extraktion bei den mit Polymeren gefüllten NTDs geringer aus. Die dreifach gefüllten NTDs zeigten außerdem einen geringeren Durchbruch nicht adsorbierter VOCs im Vergleich zu den einfach gefüllten NTDs. Trefz und Kollegen zeigten außerdem, dass die extrahierte Menge einiger VOCs bei den mit Polymeren gefüllten NTDs mit steigendem Probevolumen nicht linear anstieg (Trefz *et al.*, 2013).

Durch die räumliche Trennung der Probenahme (Atemgas und Raumluft) im Tierraum und der Analyse mittels GC-MS im Labor war ein Transport der NTDs nötig. Es konnte sicher gestellt werden, dass die Analyse bei allen Proben innerhalb von 48 Stunden nach Probenahme erfolgte. Mieth *et al.* (2009) und Trefz *et al.* (2012) stellten für einen Zeitraum von zwei Tagen eine gute Lagerfähigkeit für mit Teflon-Kappen verschlossene NTDs fest. So konnte sicher gestellt werden, dass bei der Detektion volatiler Substanzen Artefakte infolge der Lagerung in Form von Kontamination oder Substanzverlust möglichst gering waren.

Für physiologische und metabolische Fragestellungen, bei denen die aus dem Blut stammenden VOCs von Interesse sind, ist die alveolare Probenahme die Methode der Wahl. Im Alveolargas sind die Konzentrationen von aus dem Blut stammenden VOCs bis zu zweimal höher als in gemischt-expiratorisch gesammelten Proben (Miekisch *et al.*, 2004). Verdünnung und Verunreinigung durch inhaliertes Gas oder Totraumgas werden bei der alveolaren Probenahme minimiert. Das in beiden Studien verwendete Probenahmesystem, bestehend aus einem mobilen Probenahmegerät in Kombination mit einem schnellen Hauptstrom-Kapnometer, ermöglichte eine automatisierte, standardisierte und kontrollierte (exhalierete CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, Probevolumina, Flussraten) alveolare Probenahme (Trefz *et al.*, 2013). Im Vergleich zur manuell gesteuerten Probenahme unter visueller Kontrolle der exhaliereten CO<sub>2</sub>-Konzentration (Miekisch *et al.*, 2008; Mieth *et al.*, 2009; Mieth *et al.*, 2010) konnte auf diese Weise auch bei den spontan atmenden, wachen Tieren mit hohen Atmungsfrequenzen und kleinen Atemzugvolumina eine reproduzierbare, kontrollierte Sammlung von Alveolargas erfolgen. Eine Standardisierung der Probenahme ist besonders für die quantitative Atemgasanalyse wichtig und für weiterführende Untersuchungen unbedingt zu empfehlen.

Mittels der Kombination von SPME (Kot), bzw. NTME (Atemgas, Raumluft) und GC-MS wurden in STUDIE I und II mehr als 100 Substanzen detektiert. Davon wurden 25 VOCs im Headspace über Kotproben und elf VOCs im Atemgas (STUDIE I) bzw. 7 Substanzen im Atemgas (STUDIE II) identifiziert. Mit Nachweisgrenzen bis in den hohen Ultraspurenbereich (pptV-ppbV) erwies sich das angewendete Analyseverfahren als sehr sensitiv und ist vergleichbar mit Studien an Menschen (Filipiak *et al.*, 2012; Trefz *et al.*, 2012; Trefz *et al.*, 2013).

Ein alleiniger Abgleich detektierter Massenspektren mit massenspektrometrischen Datenbanken (z. B. des NIST) erlaubt in einigen Fällen keine eindeutige Identifizierung der nachgewiesenen Substanzen (u. a. durch das Vorkommen von Isomeren) (Filipiak *et al.*, 2012; Amann *et al.*, 2014; de Lacy Costello *et al.*, 2014). Die Erfassung und der anschließende Abgleich der Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster von reinen Referenzsubstanzen war in unseren Studien zwar sehr zeitaufwendig, für eine eindeutige Identifizierung von bisher unbekanntem Substanzen jedoch unabdingbar. Die Aussagekraft der

Arbeiten wurde durch die quantitative Auswertung im Vergleich zu rein qualitativ ausgewerteten Studien gesteigert, da viele potentielle volatile Marker bloße Veränderungen in ihren Konzentrationen aufwiesen.

*Fazit:* Die speziell adaptierten Mikroextraktionsverfahren (SPME, NTME) in Kombination mit der Analyse mittels GC-MS ermöglichten die eindeutige Identifizierung und zuverlässige Quantifizierung der VOCs bis in den Ultrapurenbereich (pptV-ppbV). Das automatisierte NTME-Probenahmesystem stellte eine standardisierte, automatisierte und kontrollierte Probenahme von alveolaren Atemgasproben und Raumluftproben sicher. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die verwendeten Methoden für die Probengewinnung und Probenanalyse in dem caprinen Tiermodell bewährt haben und für weitere Studien zu empfehlen sind.

### 5.1.3 Beurteilung des Studiendesigns

In STUDIE I wurden die im Verlauf des ersten Lebensjahres (3. bis 57. Lebenswoche) der Ziegen auftretenden Veränderungen im VOC-Profil untersucht. Die Zusammensetzung der im Atemgas und von Kotproben freigesetzten VOCs wurde an sieben Zeitpunkten bestimmt und verglichen. Durch die Auswahl der Zeitpunkte wurde das VOC-Profil in verschiedenen Ernährungs- und Entwicklungsphasen der Jungtiere erfasst. Die lange Studiendauer von einem Jahr konnte zudem Hinweise liefern, wann entwicklungsbedingte Einflüsse auf freigesetzte VOCs abgeschlossen sind. Die Beschaffenheit und Menge des dargereichten Futters wurde während des Studienverlaufs angepasst, um den ernährungsphysiologischen Anforderungen der Jungtiere bei der Entwicklung zu funktionellen Wiederkäuern zu entsprechen.

Bei Studienbeginn ähnelte die Verdauungsphysiologie der anfangs ausschließlich mit Milchaustauscher ernährten Zicklein der von monogastrischen Säugetieren (Van Soest, 1994). Mit zunehmendem Alter und ernährungsabhängigen Reizen (Angebot von strukturiertem, rohfaserreicherem Futter) kam es im Verdauungstrakt zu einer zunehmenden Besiedlung mit Mikroorganismen und einer morphologischen und funktionellen Entwicklung der Verdauungsorgane (Lyford and Huber, 1988). Durch eine engmaschige Erfassung messbarer Parameter (Körpertemperatur, Atmungsfrequenz, Körpermasse, Konzentrationen von Glucose, Gesamteiweiß und Albumin im venösen Blut) konnte die somatische und metabolische Entwicklung der heranwachsenden Ziegen während des ersten Lebensjahres in STUDIE I sehr gut charakterisiert werden. Die physiologische Entwicklung der Jungtiere zeichnete sich u. a. durch die kontinuierliche Zunahme der Körpermasse sowie durch ein Absinken der Körpertemperatur und Atmungsfrequenz ab.

Der bei den jungen Ziegen in den ersten Lebenswochen aufgetretene Abfall der Glucose-Konzentration im Blut war physiologisch für junge Wiederkäuer und korrelierte mit hoher

Wahrscheinlichkeit mit ansteigenden Blutkonzentrationen kurzkettiger Fettsäuren (McCarthy and Kesler, 1956). Das vermehrte Anfallen von kurzkettigen Fettsäuren innerhalb der ersten Lebenswochen ist ein Zeichen für die zunehmende Reife der Verdauungsfunktion bei Wiederkäuern (McCarthy and Kesler, 1956). Der bei den jungen, gesunden Ziegen aufgetretene Anstieg in den Blutkonzentrationen des Gesamteiweißes und Albumins innerhalb der ersten Lebenswochen ging mit der Reifung der Leberfunktion einher, wie physiologischerweise bei jungen Wiederkäuern beschrieben (Piccione *et al.*, 2011).

In STUDIE II wurde das VOC-Profil des Atemgases von Ziegen durch wiederholte Messungen beginnend vor der morgendlichen Fütterung von kohlenhydratreichen Pellets bis vier Stunden nach der Futteraufnahme erfasst und verglichen. Die zum Zeitpunkt der Untersuchungen zehn und elf Monate alten Ziegen waren bereits an eine rohfaserreiche Fütterung adaptiert und konnten als funktionell reife Wiederkäuer angesehen werden. Da für die Untersuchungen möglichst physiologische Rahmenbedingungen gelten sollten, erhielten die Tiere Heu *ad libitum*.

Bisher gab es in der Literatur keine Daten, in welchem Zeitrahmen sich die Futteraufnahme auf das Vorkommen von VOCs im Atemgas von Ziegen auswirkt. Die Auswahl des Zeitfensters für die Erfassung der VOCs wurde orientierend an den zeitlichen Rahmen der Verdauungsvorgänge von Wiederkäuern getroffen (Ghorban *et al.*, 1966; Coggins and Field, 1976; Doize *et al.*, 1979; Van Soest, 1994). In dem zeitlichen Fenster von vier Stunden nach Aufnahme der kohlenhydratreichen Pellets erreichten einige Substanzen (Pentan und Isopren) ähnliche Konzentrationen wie vor der Futteraufnahme. Die detektierten Konzentrationen anderer VOCs waren weiterhin signifikant höher (3-Methylpentan, Hexan und cis-1, 3-Pentadien) oder niedriger (2-Ethyl-1-Hexanol) im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen. Kommt ein VOC als Biomarker in Betracht, sollte das Zeitfenster individuell für diese Substanzen evaluiert werden. Um einen circadianen Einfluss auf die Freisetzung der VOCs auszuschließen, sind weitere Untersuchungen nötig.

*Fazit:* In STUDIE I konnte die somatische und metabolische Entwicklung der gesunden Ziegen innerhalb ihres ersten Lebensjahres durch die engmaschige Erfassung messbarer Parameter sehr gut charakterisiert und für physiologisch befunden werden. Der Aufbau von STUDIE I ist somit geeignet, einen möglichen Zusammenhang zwischen den über einen längeren Zeitraum stattfindenden, physiologischen Vorgängen und einer daraus resultierenden Variabilität der VOC-Profile zu untersuchen. Der für die STUDIE II gewählte Studienaufbau mit wiederholten Messungen in einem Zeitfenster von vier Stunden brachte einen guten Überblick über den Einfluss der Aufnahme von Kraftfutter auf die Detektion flüchtiger Substanzen. Das für einzelne Substanzen geltende Zeitfenster, in dem mit einem Einfluss gerechnet werden muss, sollte individuell evaluiert werden.

## 5.2 Variabilität des VOC-Profiles infolge physiologischer Prozesse

### 5.2.1 Einfluss der Fütterung und der Entwicklung

Bei der Betrachtung der einschlägigen Literatur zum Einfluss physiologisch auftretender Prozesse auf die Freisetzung von VOCs fiel auf, dass es vor Beginn der eigenen Untersuchungen für Ziegen bzw. allgemein für Wiederkäuer gar keine und für Menschen nur sehr wenige Untersuchungen gab. Somit handelte es sich bei STUDIE I um die erste Langzeit-Studie, bei der die Variabilität der VOC-Profile von Atemgas und Kotproben über einen Zeitraum von einem Jahr untersucht wurden. In dem standardisierten Ziegenmodell traten signifikante und gut charakterisierte Veränderungen bezüglich der körperlichen und metabolischen Entwicklung auf, während sich die gesunden Tiere von funktionell monogastrischen Milchlämmern zu reifen Wiederkäuern entwickelten.

Im Headspace über Kotproben zeigten 18 VOCs signifikante Konzentrationsänderungen während des ersten Lebensjahres der Ziegen. VOCs aus den Gruppen der Ketone, aliphatischen Kohlenwasserstoffe, Furane und Schwefelverbindungen wiesen zu Beginn der Studie die höchsten Konzentrationen auf. Nach der Fütterungsumstellung wurden diese VOCs in bedeutend niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu stiegen die Konzentrationen von Isopren und Methylacetat mit zunehmendem Alter der Ziegen allmählich an.

Der ausgeschiedene Kot setzt sich u. a. aus Rückständen von Futterbestandteilen, Verdauungs- und Ausscheidungsprodukten, abgeschilferten Darmepithelzellen sowie Bruchstücken und Metaboliten der intestinalen Mikroorganismen zusammen (Piatkowski *et al.*, 1990). Die Veränderung einer dieser Bestandteile kann sich im resultierenden VOC-Profil widerspiegeln. Eine Besonderheit der Verdauung von Wiederkäuern ist die Symbiose zwischen Wirtstier und Mikroorganismen des Verdauungstrakts. Durch die Besiedlung der Vormägen (Haube, Pansen, Blättermagen) mit Mikroorganismen ist die Verdauung pflanzlicher Rohfaser durch mikrobielle Fermentationsleistung möglich. Für das Wirtstier ansonsten unverdauliche Zellwandbestandteile, wie Cellulose und andere komplexe Kohlenhydrate, werden dabei in kurzkettige Fettsäuren (v. a. Acetat, Propionat, Butyrat) zerlegt, die von den vegetarischen Wiederkäuern als primäre Energiequelle genutzt werden (Weimer, 1992; Russell *et al.*, 2009; Metzler-Zebeli *et al.*, 2013). Die Entstehung kurzkettiger Fettsäuren ist beim Wiederkäuer von der Umsetzung der Rohfaser durch die gastrointestinale Mikrobiota abhängig. Die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota passt sich dynamisch den aktuellen Umweltbedingungen, wie z. B. dem zur Verfügung stehenden Futtersubstrat, an (Callaway *et al.*, 2010; Metzler-Zebeli *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Im Verlauf der Studie kam es mit zunehmendem Alter der Ziegen zu einer Reifung ihrer Verdauungsphysiologie und dementsprechend zu einer Adaptation und Veränderung der gastrointestinalen Mikrobiota (Draksler *et al.*, 2002).

Für die meisten der 18 genannten Substanzen, die eine Konzentrationsänderung zeigten, wurde im Schrifttum zwar bereits die Bildung sowohl während des mikrobiellen als auch während des tierischen Stoffwechsels belegt (siehe STUDIE I), eine exakte Dokumentation unter *in vivo*-Bedingungen im Langzeitverlauf fehlte jedoch bislang. Für Ketone und aliphatische Kohlenwasserstoffe wurde neben der Entstehung im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel (Garner *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2012) auch die Bildung während der bakteriellen Umsetzung von Fettsäuren berichtet (Miekisch *et al.*, 2004; Schulz and Dickschat, 2007; Thorn and Greenman, 2012; de Lacy Costello *et al.*, 2014). Die Reifung der Verdauungsphysiologie der Ziegen sowie das damit einhergehende veränderte Angebot an kurzkettigen Fettsäuren könnten somit einen Einfluss auf die Entstehung dieser VOCs haben.

Isopren kann durch bakterielle Synthese (Kuzma *et al.*, 1995) sowie während der Cholesterinbiosynthese des Makroorganismus (Deneris *et al.*, 1985; Stone *et al.*, 1993) entstehen. Methylacetat kann mit Hilfe einer bakteriellen Esterase-Aktivität, aber auch durch vorhandene Esterase in der Darmwand gebildet werden (Garner *et al.*, 2007). Das während des Verlaufs der Studie ansteigende Konzentrationsniveau von Isopren und Methylacetat steht wahrscheinlich mit der metabolischen und somatischen Reifung der Ziegen im Zusammenhang. Detektierte Schwefelverbindungen scheinen direkt mit der Bakteriendichte der Darmflora in Zusammenhang zu stehen (Garner *et al.*, 2007; Hales *et al.*, 2012; Walton *et al.*, 2013).

Im Atemgas wurden elf VOCs detektiert, die signifikante Konzentrationsänderungen während des ersten Lebensjahres der Ziegen aufwiesen. Die Ketone Aceton und 2-Butanon zeigten einen signifikanten Anstieg der Konzentration nach der Umstellung des Futtersubstrats. Beide Substanzen wurden bereits im Atemgas von Rindern nachgewiesen, wobei deren Synthese u. a. dem Fettsäureabbau zugeordnet wurde (Elliott-Martin *et al.*, 1997). Durch die Entwöhnung von der Milch könnte ein vorübergehender Energiemangel bei den jungen Ziegen aufgetreten sein, was einen Anstieg der Lipolyse und Ketogenese zur Folge hätte (Schultz, 1968). Außerdem kommt es bei Wiederkäuern während der ersten Lebenswochen zu einem Abfall der Glucosekonzentration und einem Anstieg der Konzentration der freien Fettsäuren im Blut (McCarthy and Kesler, 1956). Beide Ereignisse könnten die Ursache für den signifikanten Anstieg von Aceton und 2-Butanon im Atemgas gewesen sein.

In der Studie wurden zu bestimmten Zeitpunkten signifikant höhere Konzentrationen von Aldehyden im Atemgas detektiert. Eine erhöhte Freisetzung von Aldehyden kann theoretisch aufgrund einer vermehrten endogenen Bildung durch Oxidation von Proteinen und Fettsäuren (Miekisch *et al.*, 2004) oder eines erhöhten Anfalls im mikrobiellen Stoffwechsels von Darmbakterien (Beck *et al.*, 2002; Aarhi *et al.*, 2014) bedingt sein. Beide Stoffwechselwege sind als Ursache für den Nachweis erhöhter Konzentrationen von Aldehyden bei den Ziegen denkbar.

Substanzen, die ursprünglich aus dem Gastrointestinaltrakt stammen, können über die Darmwand absorbiert und im Körper verteilt werden (Kirsch *et al.*, 2012; Baranska *et al.*, 2013). Deshalb gelten die bereits für das VOC-Profil der Kotproben in Betracht gezogenen Einflussfaktoren auch indirekt für das VOC-Profil im Atemgas.

Durch den möglichen Übertritt der VOCs aus dem Blutkreislauf in die Alveolen liegt die Stärke der Probenmatrix Atemgas darin, die aktuelle Situation des Organismus als Momentaufnahme widerzuspiegeln. Die VOC-Analyse aus dem Atemgas eignet sich daher womöglich besonders, um kurzfristige Veränderungen im Organismus abzubilden. Demgegenüber ist die Beschaffenheit des Kots das Ergebnis längerfristiger Prozesse im Darm und wird besonders durch die Fütterung und die Verdauungsphysiologie, jedoch wahrscheinlich kaum durch kurzfristige Schwankungen des Stoffwechsels, beeinflusst.

Interessanterweise wurde ein quantitativer Zusammenhang zwischen Blutparametern (Glucose, Gesamtprotein und Albumin) und flüchtigen Substanzen nicht nur für VOCs aus dem Atemgas, sondern auch für VOCs aus dem Headspace über Kotproben, festgestellt. Das unterstreicht eine potentielle endogene Beteiligung am vom Kot emittierten VOC-Profil. Ein quantitativer Zusammenhang mit Blutparametern ergab sich für flüchtige Substanzen verschiedener Substanzgruppen. Im Headspace über Kotproben waren das v. a. Ketone, Furane und Schwefelverbindungen und im Atemgas Aldehyde sowie aromatische Kohlenwasserstoffe. Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse stellen einen ersten Schritt auf dem Weg zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs von physiologischen Prozessen und resultierenden VOC-Profilen dar.

*Fazit:* Im ersten Lebensjahr der Ziegen traten signifikante Konzentrationsänderungen der VOCs im Atemgas und im Headspace über Kotproben auf. Die größten Veränderungen wurden während oder nach der Umstellung der Fütterung beobachtet. Das spricht dafür, dass die Ernährungsumstellung, die somatische und metabolische Reifung der Ziegen sowie die Anpassung der gastrointestinalen Flora die verursachenden Einflussfaktoren für die beobachteten Konzentrationsänderungen im VOC-Profil sind. Die genaue Herkunft der detektierten Substanzen, potentielle biochemische Prozesse und physiologische Zusammenhänge können jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig belegt werden und bleiben hypothetisch. Durch das hohe Maß an Standardisierung und die erreichte Homogenität innerhalb der Tiergruppe ist es wahrscheinlich, dass die in der Studie beobachtete interindividuelle Variabilität ein Minimum an biologischer Variabilität reflektiert.

### **5.2.2 Einfluss der Futteraufnahme**

In STUDIE II wurde der Einfluss der morgendlichen Kraftfutteraufnahme auf das freigesetzte VOC-Profil im Atemgas von Ziegen im standardisierten Großtiermodell überprüft. Im

Vergleich zu STUDIE I wurden in STUDIE II nicht die Auswirkungen der Adaptation der gastrointestinalen Mikrobiota und der Verdauungsphysiologie der jungen Ziegen untersucht, sondern die speziellen Effekte der ablaufenden Verdauungsprozesse nach Aufnahme von Kraftfutter erfasst. Heu war *ad libitum* vorhanden.

Es wurden fünf gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe und ein Alkohol identifiziert, die charakteristische Konzentrationsänderungen im Zusammenhang mit der Aufnahme von Kraftfutter zeigten. Alle Kohlenwasserstoffe zeigten einen postprandialen Konzentrationsanstieg. Die höchsten Konzentrationen wurden 60 Minuten nach erfolgter Futteraufnahme detektiert und fielen anschließend meist graduell ab. Die Konzentration des Alkohols 2-Ethyl-1-Hexanol hingegen fiel nach höchsten Konzentrationen vor der Nahrungsaufnahme prostrandial ab.

Der Konzentrationsverlauf der fünf Kohlenwasserstoffe bestärkt die Vorstellung, dass VOCs oder deren Vorläufer im Darm resorbiert, über den Blutkreislauf verteilt und über die Lunge abgeatmet werden können (Schubert *et al.*, 2001; Kirsch *et al.*, 2012; Baranska *et al.*, 2013). Als mögliche Erklärung für den Konzentrationsabfall von 2-Ethyl-1-Hexanol infolge der Kraftfutteraufnahme kommt eine Veränderung in der Verteilung zwischen den Körperkompartimenten oder ein Anstieg des Metabolismus infolge einer erhöhten Durchblutung des Splanchnicusgebiets als Folge der Verdauungsprozesse in Betracht. Eine endogene Synthese von Kohlenwasserstoffen durch Oxidation von Lipiden und Proteinen sowie durch Stoffwechselfvorgänge von Darmbakterien wurde in der Literatur beschrieben (Kneepkens *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 2000). Der Alkohol 2-Ethyl-1-Hexanol ist als Aromakomponente von Pflanzen, darunter Weizen (Li *et al.*, 2014), bekannt und wurde auch in einer früheren Studie im Atemgas von Rindern detektiert (Ellis *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu Studien beim Menschen (Gelmont *et al.*, 1981) führte die morgendliche Aufnahme von Kraftfutter zu einem initialen Anstieg der Isoprenkonzentration. Das zuvor in der Literatur als bedeutender metabolischer Marker im Atemgas bezeichnete Aceton (Smith *et al.*, 1999; Spanel *et al.*, 2011) zeigte hingegen in dieser Studie keinen Einfluss durch die Futteraufnahme. Die grundlegenden Unterschiede in der Verdauungsphysiologie von Wiederkäuern und monogastrischen Menschen sind eine mögliche Ursache für die beobachteten Speziesunterschiede.

Durch die im Großtiermodell durchgeführte Standardisierung konnte der Einfluss auf die Konzentrationen der VOCs durch die Faktoren Alter und Fütterungsregime (evaluiert in STUDIE I) für STUDIE II ausgeschlossen werden. Desweiteren wurde in STUDIE II der Einfluss weiterer methodischer und biologischer Faktoren untersucht. In einer Studie mit Menschen wurde die Zusammensetzung der Ausatemluft durch Variation des Atmungsmusters, z. B. Anhalten der Luft, bedeutend beeinflusst (Sukul *et al.*, 2014). Ein möglicher Effekt durch Variation des Atmungsmusters durch die spontan atmenden Ziegen konnte in dieser Studie

nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch konnte weder für den klinischen Parameter Atmungsfrequenz noch für evtl. auftretenden Ruktus ein signifikanter Effekt auf das VOC-Profil des Atemgases nachgewiesen werden. Unter Beibehaltung der Versuchsbedingungen gab es eine nicht unerhebliche intraindividuelle Variabilität sowie eine Variabilität zwischen den verschiedenen Versuchstagen. Die Tendenzen des Konzentrationsverlaufs der VOCs waren jedoch reproduzierbar. Die Ergebnisse der sofortigen intraindividuellen Messwiederholungen waren höchst reproduzierbar.

*Fazit:* Nach morgendlicher Kraftfutteraufnahme traten signifikante Veränderungen im VOC-Profil des Atemgases der Ziegen auf. Ein charakteristischer Konzentrationsverlauf der detektierten VOCs legt einen Zusammenhang mit der Futteraufnahme nahe. Sehr wahrscheinlich waren diese Effekte durch die Adsorption von Futterbestandteilen und eine veränderte endogene Produktion infolge ablaufender Verdauungs- und Stoffwechselprozesse bedingt. Die Futteraufnahme und der zeitliche Abstand zur Probenahme müssen zukünftig als wichtige Einflussfaktoren bei der Atemgasanalyse angesehen werden und bei der Studienplanung Beachtung finden.

### 5.2.3 Einfluss inhalierter VOCs

VOCs exogenen Ursprung, die nicht als solche erkannt werden, können zu falschen Schlussfolgerungen bei der Definition von Biomarkern führen (Schubert *et al.*, 2005). Folglich wurde sowohl in STUDIE I als auch in STUDIE II die Raumluf, die von den Ziegen inhaliert wurde, bezüglich ihres VOC-Profiles analysiert.

Die Konzentrationen der in STUDIE I berücksichtigten VOCs in der Raumluf und im Atemgas wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Für einige der betrachteten VOCs, wie die aromatischen Kohlenwasserstoffe (Filipiak *et al.*, 2012) und 1-Propanol, ist eine exogene Herkunft am wahrscheinlichsten. Bei den meisten dieser VOCs übertrafen die detektierten Konzentrationen in der Raumluf die Konzentrationen im Atemgas. Interessanterweise konnten für die aromatischen Kohlenwasserstoffe Styrol und 2, 5-Dimethylbenzaldehyd im Atemgas höhere Konzentrationen als in der Raumluf registriert werden. Eine vorausgegangene Exposition und Aufnahme in den Organismus ist wahrscheinlich.

In STUDIE I überstieg die Konzentration von Aceton im Atemgas die detektierte Menge in der Raumluf. Eine endogene Produktion von Aceton während des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels ist bekannt (Miekisch *et al.*, 2004) und war auch in dieser Studie der wahrscheinliche Ursprung des im Atemgas detektierten Acetons. Für das Keton 2-Butanon, das ebenfalls endogen entstehen kann (Garner *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2012), war hingegen die Konzentration in der Raumluf höher als in der Ausatemluft. Die gleiche Beobachtung machten Mochalski *et al.* (2013). Sie vermuten, dass das im Atemgas detektierte 2-Butanon durch Inhalation von exogenem 2-Butanon in den Körper gelangt. Dies zeigt, dass

auch bei VOCs, die potentiell im Körper entstehen können, eine Detektion im Atemgas nicht unweigerlich eine endogene Produktion widerspiegelt.

In STUDIE II wurde der Fokus auf potentiell endogen produzierte VOCs gelegt. Dementsprechend wurden die Selektionskriterien angepasst, indem zur weiteren Auswertung nur VOCs berücksichtigt wurden, deren detektierte Konzentrationen im Atemgas signifikant höher als in der Raumluft waren. Schubert *et al.* (2005) gaben die Empfehlung VOCs nur dann als Biomarker auszuwählen, wenn deren Konzentrationen in der Raumluft  $< 5\%$ , bzw.  $< 20\%$  (Miekisch and Schubert, 2006) der Konzentrationen im Atemgas ausmachen.

*Fazit:* Die Untersuchungen zur VOC-Analyse in der die Tiere umgebenden Raumluft belegen, dass bei einem erheblichen Anteil der exhalieren VOCs die in der Raumluft detektierten Konzentrationen diejenigen im Atemgas übersteigen. Folglich sollte die Analyse der Raumluft in zukünftigen Studien obligatorisch als Ergänzung für Atemgasanalysen sein, um wichtige Informationen über Hintergrundkonzentrationen inhaliertes VOCs zu erhalten und falsche Schlussfolgerungen bei der Definition von Biomarkern zu vermeiden. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien geben wichtige Hinweise auf die mögliche endogene oder exogene Herkunft der im Atemgas detektierten flüchtigen Substanzen. Nichtsdestotrotz bleibt die Raumluftanalyse nur eine Momentaufnahme und vorausgegangene Expositionen bleiben womöglich unerkannt. Des Weiteren birgt die Raumluft das Potential selbst als Probenmatrix zu dienen. Die vom Tier selbst oder seinen Exkretionen freigesetzten volatilen Biomarker können in der Raumluft akkumulieren und dort detektiert werden. Zur Bestätigung dieser Hypothese bedarf es jedoch weiterer Forschung.

### **5.3 Einordnung in das Gesamtprojekt**

Die Untersuchungen im Rahmen des von der DFG-geförderten Gesamtprojektes dienen dem langfristigen Ziel der Identifizierung von VOCs als Biomarker für eine Infektion mit MAP. Die im Rahmen der vorgelegten Dissertationsschrift durchgeführten STUDIEN I und II ordnen sich in das Gesamtprojekt ein, da sie speziell zur Aufklärung der Variabilität und Beeinflussung von VOCs durch das Fütterungsregime, die Kraftfutteraufnahme sowie die somatische und metabolische Entwicklung des Wirtstiers Ziege dienen.

Im *in vivo*-Teil des Projektes wurden VOCs im Headspace über Kotproben und im Atemgas von Ziegen im Rahmen eines etablierten Infektionsmodells für die Infektion mit MAP analysiert. Die von Trefz *et al.* (2013) etablierte, automatisierte und kontrollierte Sammlung von Alveolargas wurde erfolgreich an die Probenahme bei Ziegen adaptiert und sowohl in der von Bergmann *et al.* (2015) beschriebenen Infektionsstudie (Anlage A1), als auch in den beiden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten STUDIEN I und II verwendet.

Bergmann *et al.* (2015) stellten ein VOC-Markerset mit 28 VOCs zusammen, die sich als Biomarker für eine Infektion mit MAP eignen könnten. Dabei scheinen die VOC-Profile der

Kotproben das Vorhandensein von MAP-Bakterien abzubilden, während die Profile der Atemgasproben eher mit der Wirtsantwort assoziiert zu sein scheinen. Für viele der VOCs des Markersets aus der Infektionsstudie (Bergmann *et al.*, 2015) konnten in STUDIE I ein Einfluss durch Wachstum, metabolische Entwicklung und das Fütterungsregime belegt werden. Betroffen waren VOCs aus den Gruppen der Kohlenwasserstoffe, Ketone, Ester, Sulfide und Furane (Kot), bzw. Alkohole, Aldehyde, Ketone und aromatische Kohlenwasserstoffe (Atemgas). Die Ergebnisse aus STUDIE I weisen darauf hin, dass VOC-Analysen zur ersten Identifizierung von Biomarkern für die Infektion mit MAP zu einem Zeitpunkt stattfinden sollten, bei dem die Ziegen bereits verdauungsphysiologisch gereift sind. Im Anschluss sollte geprüft werden, ob sich die potentiellen Biomarker bereits in der für die Diagnostik der Paratuberkulose besonders interessanten, frühen Phase der Infektion, bei denen die physiologische Schwankungsbreite der VOC-Profile der noch jungen Tieren sehr viel größer ist, bewähren können.

Der in STUDIE II belegte Einfluss der Aufnahme von Kraftfutter auf das VOC-Profil des Atemgases sollte unbedingt bei der Planung des Studiendesigns zukünftiger VOC-Analysen bei Ziegen beachtet werden.

In *in vitro*-Versuchen wurde gezeigt, dass volatile Muster kulturelles Wachstum von MAP anzeigen können (Trefz *et al.*, 2013). Die darauf aufbauenden umfangreichen Studien zum Einfluss biologischer und methodischer Faktoren (Küntzel *et al.*, 2016) belegten, dass verschiedene Kulturbedingungen zu unterschiedlichen Stadien des Bakterienwachstums und des bakteriellen Metabolismus führten, was sich in Variationen der VOC-Profile abbildete. Teilweise war die Detektion wachstumsanzeigender VOCs möglich, bevor bakterielles Wachstum visuell erkennbar war. In den *in vitro*-Studien von Trefz *et al.* (2013) und Küntzel *et al.* (2016) wurden zwischen 30 und 40 VOCs als MAP-abhängiges VOC-Profil identifiziert, wovon sich circa die Hälfte der Substanzen überschneiden. Interessanterweise zeigten einige dieser *in vitro* detektierten VOCs auch *in vivo* das Potential eine Infektion mit MAP anzuzeigen (Bergmann *et al.*, 2015). Die volatilen Muster einiger als potentielle Biomarker für das Wachstum von MAP *in vitro* identifizierten VOCs zeigten in STUDIE I interessanterweise *in vivo* einen Effekt durch die Fütterung und die Entwicklung der Tiere. Dazu zählten folgende VOCs: Pentan, Heptan, Aceton, 3-Oktanon, Methylisobutylketon, Isopren, Methylacetat, Furan und 3-Methylfuran. Sollte sich in zukünftigen Studien zeigen, dass sich einige dieser VOCs auch *in vivo* als Biomarker für die Infektion mit MAP eignen, so muss ein möglicher Einfluss auf die Freisetzung dieser VOCs infolge physiologischer Prozesse unbedingt beachtet werden.

*Fazit:* Die in STUDIE I und II untersuchten Effekte physiologischer Prozesse bilden eine wichtige Grundlage für die Evaluierung potentieller Biomarker für die *in vivo*-Diagnostik von MAP-Infektionen.

## 5.4 Erkenntnisgewinn und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten

In den beiden dieser Arbeit zugrundeliegenden STUDIEN I und II wurde ein signifikanter Einfluss auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der VOC-Profile von Kot und Atemgas von jungen Ziegen durch die körperliche und metabolische Entwicklung im ersten Lebensjahr, einer altersgemäßen Anpassung des Fütterungsregimes sowie der infolge der Futteraufnahme ablaufenden Verdauungsprozesse nachgewiesen. Damit bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen erheblichen Beitrag physiologischer Prozesse zur biologischen Variabilität freigesetzter VOC-Profile.

Das gut charakterisierte Tiermodell mit gesunden Ziegen erwies sich als geeignet, um den Einfluss physiologischer Prozesse zu untersuchen. Für die Evaluierung weiterer Einflussfaktoren ist zu empfehlen, die Haltungsbedingungen der Tiere möglichst einheitlich zu gestalten, insbesondere bezüglich des Fütterungsregimes (Menge und Art des Futters, Fütterungszeiten) und den von außen einwirkenden Umwelteinflüssen. Die in den beiden Studien durchgeführten Methoden zur Probenahme, Präkonzentration und Analyse der VOCs mittels adaptierter Mikroextraktionsverfahren in Kombination mit GC-MS erlaubten die Identifizierung und Quantifizierung von VOCs bis in den Ultraspurenbereich. Damit haben sich die Methoden für die Untersuchung von physiologischen Prozessen als Einflussfaktoren auf das VOC-Profil von Ziegen bewährt und sind für folgende Arbeiten zu empfehlen.

Die zu Vergleichszwecken durchgeführten VOC-Analysen der Raumluft haben bestätigt, dass ein erheblicher Anteil der VOCs, die im Atemgas detektiert werden, ebenfalls und in zum Teil sehr viel höheren Konzentrationen in der die Tiere umgebenden Raumluft nachgewiesen werden. Für diese exhalieren VOCs gilt, dass eine Herkunft aus exogener Quelle und die Aufnahme in den Organismus durch Inhalation wahrscheinlich sind. Die Analyse der Raumluft parallel zur Sammlung von VOCs im Atemgas sollte obligatorisch sein, um wichtige Informationen über Hintergrundkonzentrationen inhalierter VOCs zu erhalten.

Um die Aufklärung von (patho-) physiologischen Entstehungsprozessen bedeutender VOCs und zugrundeliegenden biochemischen Reaktionen voranzutreiben, sind weiterführende Untersuchungen zu möglichen Zusammenhängen von VOCs und messbaren systemischen Parametern sinnvoll.

Aufgrund von Speziesunterschieden, insbesondere die Verdauungsphysiologie betreffend, lassen sich die Erkenntnisse aus den Studien mit Wiederkäuern nicht ohne weiteres auf andere Spezies übertragen. Nichtsdestotrotz liefert die Arbeit wichtige speziesübergreifende Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung von physiologischen Einflussfaktoren auf die Freisetzung von VOCs. Es ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren allgemein einen entscheidenden Einfluss auf die VOC-Profile von Tier und Mensch haben, weshalb sie bei jeglicher Versuchsplanung berücksichtigt werden sollten.

Physiologische Prozesse sollten als potentielle Einflussgrößen bei der Evaluation von volatilen Biomarkern Beachtung finden. Bei Nichtbeachtung besteht die Gefahr einer Fehlinterpretation bei der Definition von volatilen Biomarkern und letztlich eine Reduktion der Zuverlässigkeit diagnostischer Tests. Weiterführende Untersuchungen zur physiologischen Variabilität von VOC-Profilen sind angezeigt, bzw. unumgänglich, um die diagnostische Sensitivität und Spezifität von potentiellen volatilen Biomarkern evaluieren zu können.

## 6 Zusammenfassung

### Physiologische Einflussfaktoren auf die Variabilität flüchtiger organischer Substanzen im caprinen Tiermodell

#### *Einleitung und Aufgabenstellung*

Die Analyse flüchtiger organischer Substanzen (volatile organic compounds, VOCs) zu diagnostischen Zwecken ist ein vielversprechender Ansatz. VOCs entstehen während biochemischer Prozesse im Körper und können über den Blutkreislauf in biologische Substrate (Atemgas, Kot, Urin) gelangen. Bislang wurden die Auswirkungen physiologischer Prozesse auf die biologische Variabilität der aus dem Organismus freigesetzten VOCs nur unzureichend erfasst. Bei Nichtbeachtung können sie als Einflussgrößen die Definition krankheits-assoziiertes Biomarker erschweren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Wachstum, Ernährung und Futteraufnahme auf die Freisetzung potentieller volatiler Biomarker in einem caprinen Großtiermodell zu charakterisieren. Die durchgeführten Studien sind Teil eines Projektes mit dem langfristigen Ziel der Identifizierung volatiler Biomarker für die Infektion mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

#### *Tiere, Material und Methoden*

Die Untersuchungen fanden im Rahmen eines etablierten und standardisierten Großtiermodells mit klinisch gesunden Ziegen statt. In zwei Studien wurden die Einflüsse von Wachstum und Ernährung innerhalb des ersten Lebensjahres der Tiere (STUDIE I) und der allmorgendlichen Kraftfutteraufnahme (STUDIE II) überprüft. VOCs wurden wiederholt (i) im Gasraum (Headspace) über Kotproben, (ii) im exhalieren Atemgas sowie zu Vergleichszwecken (iii) in der umgebenden Raumluft analysiert.

Eine automatisierte, CO<sub>2</sub>-gesteuerte Probenahmetechnik gewährleistete die standardisierte und kontrollierte Sammlung von Atemgasproben bei den spontan atmenden Ziegen. VOCs wurden mittels adaptierter Mikroextraktionstechniken (Needle Trap Mikroextraktion; NTME, Festphasenmikroextraktion; SPME) und sensitiver Analysemethoden (Gaschromatographie-Massenspektrometrie; GC-MS) identifiziert und quantifiziert. Parallel wurden im peripheren Blut die Konzentrationen von Glucose, Gesamtprotein und Albumin bestimmt (STUDIE I).

#### *Ergebnisse*

##### STUDIE I

In dem standardisierten Großtiermodell traten im Verlauf des ersten Lebensjahres der Ziegen gut charakterisierte Veränderungen bezüglich der körperlichen und metabolischen Entwicklung auf. Sowohl die Konzentrationen der VOCs im Atemgas der Ziegen (n=11; Alkohole, Aldehyde, Ketone und Kohlenwasserstoffe) als auch die im Headspace über deren

Kotproben gemessenen VOCs (n=18; Ketone, Kohlenwasserstoffe, Ester, Schwefelverbindungen und Furane) veränderten sich signifikant während der Studiendauer von einem Jahr. Die bedeutendsten Veränderungen traten im zeitlichen Zusammenhang mit der altersgerechten Anpassung der Fütterung und der Entwicklung der Ziegen von Milchlämmern zu rein pflanzlich ernährten Wiederkäuern auf.

## STUDIE II

Sechs VOCs aus den Gruppen der Kohlenwasserstoffe und Alkohole wiesen signifikante Konzentrationsänderungen im Atemgas beim Vergleich der Probenahmen vor und nach der morgendlichen Kraftfutteraufnahme auf. Die Konzentrationen der VOCs aus der Gruppe der gesättigten und ungesättigten Kohlenwasserstoffe (n=5; Pentan, 3-Methylpentan, Hexan, Isopren und cis-1, 3-Pentadien) zeigten ein charakteristisches Muster. Postprandial kam es bei diesen VOCs zunächst zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg, gefolgt von einem graduellen Konzentrationsabfall.

### ***Schlussfolgerungen***

Die beiden STUDIEN I und II leisten einen wertvollen Beitrag zu grundlegenden Kenntnissen des Einflusses physiologischer Prozesse auf die Freisetzung von VOCs im caprinen Tiermodell.

Bedeutende Veränderungen in den VOC-Profilen von Atemgas und Kotproben konnten mit alters- und ernährungsbedingten metabolischen Veränderungen im Verlauf des ersten Lebensjahres von Ziegen assoziiert werden. Charakteristische Veränderungen im VOC-Profil des Atemgases traten mit direktem Bezug zur morgendlichen Kraftfutteraufnahme und nachfolgend ablaufenden Verdauungsprozessen auf.

Die körperliche und metabolische Entwicklung im ersten Lebensjahr, die altersgemäße Anpassung des Fütterungsregimes sowie die infolge einer Futteraufnahme ablaufenden Verdauungsprozesse müssen als bedeutende Einflussfaktoren und potentielle Störgrößen bei der Planung und Auswertung von VOC-Analysen Beachtung finden. Die Ergebnisse betonen die Wichtigkeit von grundlegenden Kenntnissen über physiologische Einflussfaktoren, bevor zuverlässige volatile Biomarker zu diagnostischen Zwecken definiert werden können.

## 7 Summary

### **Physiological influencing factors on the variability of volatile organic compounds in a caprine animal model**

#### *Introduction and Objective*

The analysis of volatile organic compounds (VOCs) is a promising diagnostic method. VOCs are generated during biochemical processes in the body and can get into various biological specimen (breath gas, faeces, urine) via the blood stream. The effects of physiological processes on the biological variability of VOCs emitted from the organism have so far remained elusive. If neglected, physiological processes can act as confounding factors which can impede the definition of disease-associated biomarkers.

The objective of this investigation was to characterize the influence of growth, feeding and food intake on the emission of potential volatile biomarker in a caprine animal model. The studies conducted are part of an ongoing project with the long-term aim to identify volatile biomarker for the infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

#### *Animals, material and methods*

The investigations were conducted in an established and standardized animal model with clinically healthy goats. In two studies the influences of growth and nutrition within the first year of life of the animals (STUDY I) and of the intake of concentrated feed in the morning (STUDY II) were examined. VOCs were repeatedly analyzed in (i) the gas space (headspace) above faeces, (ii) in the exhaled breath gas and (iii) in the ambient room air for the purpose of comparison.

An automated, CO<sub>2</sub>-triggered sampling technique ensured a standardized and controlled collection of breath gas samples in spontaneously breathing goats. VOCs were identified and quantified by means of adapted microextraction techniques (needle trap microextraction; NTME, solid phase microextraction; SPME) and sensitive analytical methods (gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS). In parallel, the concentrations of glucose, total protein and albumin in the peripheral blood were determined (STUDY I).

#### *Results*

##### Study I

Well characterized changes occurred in the standardized animal model with respect to somatic and metabolic development within the first year of the goats' lives. Both the concentrations of VOCs in the breath gas (n=11; alcohols, aldehydes, ketones and hydrocarbons) and in the headspace above faecal samples (n=18; ketones, hydrocarbons, esters, sulfur containing compounds and furans) of the goats changed significantly throughout the duration of the study of one year. The most significant changes coincided with the age-related adaptation of

the feeding and the development of the goats from milk suckling goat kids to ruminating goats fed exclusively with plant products.

#### STUDY II

Six VOCs belonging to the groups of hydrocarbons and alcohols showed significant differences in their concentrations in breath gas when comparing the collections before and after the food intake of concentrated feed in the morning. Concentrations of VOCs belonging to the group of saturated and unsaturated hydrocarbons (n=5; pentane, 3-methylpentane, hexane, isoprene and cis-1, 3-pentadiene) demonstrated a characteristic pattern. Postprandial, there was a significant increase in the concentrations of these VOCs, followed by a gradual decrease.

#### *Conclusions*

Both STUDIES I and II provide a valuable contribution to the fundamental knowledge of the influence of physiological processes on the emission of VOCs in a caprine animal model.

Significant changes in the VOC-profiles of breath gas and faecal samples can be associated with age- and nutrition-related metabolic changes within the first year of the goats' life. Characteristic changes in the VOC-profiles of breath gas samples occurred directly related to the food intake of concentrated feed in the morning and subsequent digestion processes.

The somatic and metabolic development within the first year of life, the age-related adaptation of the feeding regime and digestion processes due to food intake, have to be considered as significant influencing factors and potential disturbance variables for the design and interpretation of VOC-analyses.

Results emphasize the importance of a profound knowledge about physiological influencing factors, before reliable volatile biomarker can be defined for diagnostic purposes.

## 8 Literaturverzeichnis

Aarathi, R.; Saranya, R. and Sankaran, K. (2014):

2-methylbutanal, a volatile biomarker, for non-invasive surveillance of *Proteus*.  
Appl Microbiol Biotechnol 98 (1), 445-454.

Aghdassi, E. and Allard, J. P. (2000):

Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions.  
Free Radic Biol Med 28 (6), 880-886.

Al-Kateb, H.; Costello, B. D. and Ratcliffe, N. (2013):

An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap/GC-MS.  
J Breath Res 7 (3), 036004.

Albrecht, F. W.; Huppe, T.; Fink, T.; Maurer, F.; Wolf, A.; Wolf, B.; Volk, T.; Baumbach, J. I. and Kreuer, S. (2015):

Influence of the respirator on volatile organic compounds: an animal study in rats over 24 hours.  
J Breath Res 9 (1), 016007.

Amal, H.; Ding, L.; Liu, B. B.; Tisch, U.; Xu, Z. Q.; Shi, D. Y.; Zhao, Y.; Chen, J.; Sun, R. X.; Liu, H.; Ye, S. L.; Tang, Z. Y. and Haick, H. (2012):

The scent fingerprint of hepatocarcinoma: *in-vitro* metastasis prediction with volatile organic compounds (VOCs).  
Int J Nanomedicine 7, 4135-4146.

Amann, A.; Corradi, M.; Mazzone, P. and Mutti, A. (2011):

Lung cancer biomarkers in exhaled breath.  
Expert Rev Mol Diagn 11 (2), 207-217.

Amann, A.; Costello, B. D.; Miekisch, W.; Schubert, J.; Buszewski, B.; Pleil, J.; Ratcliffe, N. and Risby, T. (2014):

The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva.  
J Breath Res 8 (3), 034001.

Amann, A.; Miekisch, W.; Schubert, J.; Buszewski, B.; Ligor, T.; Jezierski, T.; Pleil, J. and Risby, T. (2014):

Analysis of exhaled breath for disease detection.  
Annu Rev Anal Chem 7, 455-482.

Banday, K. M.; Pasikanti, K. K.; Chan, E. C. Y.; Singla, R.; Rao, K. V. S.; Chauhan, V. S. and Nanda, R. K. (2011):

Use of urine volatile organic compounds to discriminate tuberculosis patients from healthy subjects.

Anal Chem 83 (14), 5526-5534.

Baranska, A.; Tigchelaar, E.; Smolinska, A.; Dallinga, J. W.; Moonen, E. J.; Dekens, J. A.; Wijmenga, C.; Zhernakova, A. and van Schooten, F. J. (2013):

Profile of volatile organic compounds in exhaled breath changes as a result of gluten-free diet. J Breath Res 7 (3), 037104.

Barkley, J.; Bunch, J.; Bursey, J. T.; Castillo, N.; Cooper, S. D.; Davis, J. M.; Erickson, M. D.; Harris, B. S., 3rd; Kirkpatrick, M.; Michael, L. C.; Parks, S. P.; Pellizzari, E. D.; Ray, M.; Smith, D.; Tomer, K. B.; Wagner, R. and Zweidinger, R. A. (1980):

Gas chromatography mass spectrometry computer analysis of volatile halogenated hydrocarbons in man and his environment - A multimedia environmental study.

Biomed Mass Spectrom 7 (4), 139-147.

Baumbach, J. I. (2009):

Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath.

J Breath Res 3 (3).

Bayn, A.; Nol, P.; Tisch, U.; Rhyan, J.; Elis, C. K. and Haick, H. (2013):

Detection of volatile organic compounds in *Brucella abortus*-seropositive bison.

Anal Chem 85 (22), 11146-11152.

Beauchamp, J. (2011):

Inhaled today, not gone tomorrow: pharmacokinetics and environmental exposure of volatiles in exhaled breath.

J Breath Res 5 (3), 037103.

Beauchamp, J. (2015):

Current sampling and analysis techniques in breath research – results of a task force poll.

J Breath Res 9 (4), 047107.

Beauchamp, J.; Kirsch, F. and Buettner, A. (2010):

Real-time breath gas analysis for pharmacokinetics: monitoring exhaled breath by on-line proton-transfer-reaction mass spectrometry after ingestion of eucalyptol-containing capsules.

J Breath Res 4 (2).

- Beck, H. C.; Hansen, A. M. and Lauritsen, F. R. (2002):  
Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*.  
Enzyme Microb Technol 31 (1-2), 94-101.
- Berchtold, C.; Bosilkovska, M.; Daali, Y.; Walder, B. and Zenobi, R. (2014):  
Real-time monitoring of exhaled drugs by mass spectrometry.  
Mass Spectrom Rev 33 (5), 394-413.
- Bergmann, A.; Trefz, P.; Fischer, S.; Klepik, K.; Walter, G.; Steffens, M.; Ziller, M.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. and Miekisch, W. (2015):  
*In vivo* volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
PLoS One 10 (4), e0123980.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001):  
Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework.  
Clin Pharmacol Ther 69 (3), 89-95.
- Bond, J. H., Jr. and Levitt, M. D. (1972):  
Use of pulmonary hydrogen (H<sub>2</sub>) measurements to quantitate carbohydrate absorption. Study of partially gastrectomized patients.  
J Clin Invest 51 (5), 1219-1225.
- Boots, A. W.; van Berkel, J.; Dallinga, J. W.; Smolinska, A.; Wouters, E. F. and van Schooten, F. J. (2012):  
The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease.  
J Breath Res 6 (2).
- Bos, L. D. J.; van Walree, I. C.; Kolk, A. H. J.; Janssen, H. G.; Sterk, P. J. and Schultz, M. J. (2013):  
Alterations in exhaled breath metabolite-mixtures in two rat models of lipopolysaccharide-induced lung injury.  
J Appl Physiol 115 (10), 1487-1495.
- Boyaci, E.; Rodriguez-Lafuente, A.; Gorynski, K.; Mirnaghi, F.; Souza-Silva, E. A.; Hein, D. and Pawliszyn, J. (2015):  
Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases.  
Anal Chim Acta 873, 14-30.

- Brodrick, E.; Davies, A.; Neill, P.; Hanna, L. and Williams, E. M. (2015):  
Breath analysis: translation into clinical practice.  
J Breath Res 9 (2), 027109.
- Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, BMVEL (2005):  
Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen  
(Paratuberkuloseleitlinien) vom 17. Januar 2005.  
BAnz. v. 10.02.2005, 2165.
- Buszewski, B.; Keszy, M.; Ligor, T. and Amann, A. (2007):  
Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases.  
Biomed Chromatogr 21 (6), 553-566.
- Calenic, B. and Amann, A. (2014):  
Detection of volatile malodorous compounds in breath: current analytical techniques and  
implications in human disease.  
Bioanalysis 6 (3), 357-376.
- Callaway, T. R.; Dowd, S. E.; Edrington, T. S.; Anderson, R. C.; Krueger, N.; Bauer, N.;  
Kononoff, P. J. and Nisbet, D. J. (2010):  
Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried  
distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing.  
J Anim Sci 88 (12), 3977-3983.
- Chambers, S. T.; Syhre, M.; Murdoch, D. R.; McCartin, F. and Epton, M. J. (2009):  
Detection of 2-Pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*.  
Med Mycol 47 (5), 468-476.
- Chen, X.; Xu, F.; Wang, Y.; Pan, Y.; Lu, D.; Wang, P.; Ying, K.; Chen, E. and Zhang, W.  
(2007):  
A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells *in vitro* for breath  
diagnosis.  
Cancer 110 (4), 835-844.
- Cho, Y. S.; Jung, S. C. and Oh, S. (2015):  
Diagnosis of bovine tuberculosis using a metal oxide-based electronic nose.  
Lett Appl Microbiol 60 (6), 513-516.
- Church, J. and Williams, H. (2001):  
Another sniffer dog for the clinic?  
Lancet 358 (9285), 930.

Coggins, C. R. E. and Field, A. C. (1976):

Diurnal variation in the chemical composition of plasma from lactating beef cows on three dietary energy intakes.

J Agric Sci 86 (3), 595-602.

Cornu, J. N.; Cancel-Tassin, G.; Ondet, V.; Girardet, C. and Cussenot, O. (2011):

Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: A step forward in early diagnosis.

Eur Urol 59 (2), 197-201.

Couch, R. D.; Navarro, K.; Sikaroodi, M.; Gillevet, P.; Forsyth, C. B.; Mutlu, E.; Engen, P. A. and Keshavarzian, A. (2013):

The approach to sample acquisition and its impact on the derived human fecal microbiome and VOC metabolome.

PLoS One 8 (11).

Dallinga, J. W.; Robroeks, C. M.; van Berkel, J. J.; Moonen, E. J.; Godschalk, R. W.; Jobsis, Q.; Dompeling, E.; Wouters, E. F. and van Schooten, F. J. (2010):

Volatile organic compounds in exhaled breath as a diagnostic tool for asthma in children.

Clin Exp Allergy 40 (1), 68-76.

de Lacy Costello, B.; Amann, A.; Al-Kateb, H.; Flynn, C.; Filipiak, W.; Khalid, T.; Osborne, D. and Ratcliffe, N. M. (2014):

A review of the volatiles from the healthy human body.

J Breath Res 8 (1), 014001.

De Lacy Costello, B.; Ewen, R.; Ewer, A. K.; Garner, C. E.; Probert, C. S.; Ratcliffe, N. M. and Smith, S. (2008):

An analysis of volatiles in the headspace of the faeces of neonates.

J Breath Res 2 (3), 037023.

de Oliveira, L. S.; Rodrigues Fde, M.; de Oliveira, F. S.; Mesquita, P. R.; Leal, D. C.;

Alcantara, A. C.; Souza, B. M.; Franke, C. R.; Pereira, P. A. and de Andrade, J. B. (2008):

Headspace solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 875 (2), 392-398.

- Deneris, E. S.; Stein, R. A. and Mead, J. F. (1985):  
Acid-catalyzed formation of isoprene from a mevalonate-derived product using a rat-liver cytosolic fraction.  
*J Biol Chem* 260 (3), 1382-1385.
- Di Natale, C.; Paolesse, R.; Martinelli, E. and Capuano, R. (2014):  
Solid-state gas sensors for breath analysis: A review.  
*Anal Chim Acta* 824, 1-17.
- Dissanayake, S.; Lathan, P. and Mlsna, T. (2012):  
Novel extraction of volatile biomarkers from canine breath for gas chromatography-mass spectrometry.  
*J Breath Res* 6 (4), 041001.
- Dixon, E.; Clubb, C.; Pittman, S.; Ammann, L.; Rasheed, Z.; Kazmi, N.; Keshavarzian, A.; Gillevet, P.; Rangwala, H. and Couch, R. D. (2011):  
Solid-phase microextraction and the human fecal VOC metabolome.  
*PLoS One* 6 (4).
- Dobbelaar, P.; Mottram, T.; Nyabadza, C.; Hobbs, P.; Elliott-Martin, R. J. and Schukken, Y. H. (1996):  
Detection of ketosis in dairy cows by analysis of exhaled breath.  
*Veterinary Quarterly* 18 (4), 151-152.
- Doize, F.; Bouchat, J. C. and Paquay, R. (1979):  
Diurnal changes in blood ketone bodies, glucose and lipids according to energy intake in adult sheep.  
*Ann Biol Anim Biochim Biophys* 19 (2A), 393-404.
- Doyle, T. M. and Spears, H. N. (1951):  
A Johne's disease survey.  
*Vet Rec* 63 (20), 355-359.
- Draksler, D.; Locascio, M.; Gonzalez, S. and Oliver, G. (2002):  
The development of faecal flora in young Creole goats.  
*Small Rumin Res* 46 (1), 67-70.
- Dummer, J.; Storer, M.; Swanney, M.; McEwan, M.; Scott-Thomas, A.; Bhandari, S.; Chambers, S.; Dweik, R. and Epton, M. (2011):  
Analysis of biogenic volatile organic compounds in human health and disease.  
*Trends Analyt Chem* 30 (7), 960-967.

Elliott-Martin, R. J.; Mottram, T. T.; Gardner, J. W.; Hobbs, P. J. and Bartlett, P. N. (1997): Preliminary investigation of breath sampling as a monitor of health in dairy cattle. *J Agr Eng Res* 67 (4), 267-275.

Ellis, C. K.; Stahl, R. S.; Nol, P.; Waters, W. R.; Palmer, M. V.; Rhyan, J. C.; VerCauteren, K. C.; McCollum, M. and Salman, M. D. (2014): A pilot study exploring the use of breath analysis to differentiate healthy cattle from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *PLoS One* 9 (2), e89280.

Emerson, V. J.; Holleyhead, R.; Isaacs, M. D.; Fuller, N. A. and Hunt, D. J. (1980): The measurement of breath alcohol: The laboratory evaluation of substantive breath test equipment and the report of an operational police trial. *J Forensic Sci Soc* 20 (1), 3-70.

Fend, R.; Geddes, R.; Lesellier, S.; Vordermeier, H. M.; Corner, L. A. L.; Gormley, E.; Costello, E.; Hewinson, R. G.; Marlin, D. J.; Woodman, A. C. and Chambers, M. A. (2005): Use of an electronic nose to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in badgers and cattle. *J Clin Microbiol* 43 (4), 1745-1751.

Fens, N.; van der Schee, M. P.; Brinkman, P. and Sterk, P. J. (2013): Exhaled breath analysis by electronic nose in airways disease. Established issues and key questions. *Clin Exp Immunol* 43 (7), 705-715.

Filipiak, W.; Filipiak, A.; Ager, C.; Wiesenhofer, H. and Amann, A. (2012): Optimization of sampling parameters for collection and preconcentration of alveolar air by needle traps. *J Breath Res* 6 (2), 027107.

Filipiak, W.; Ruzsanyi, V.; Mochalski, P.; Filipiak, A.; Bajtarevic, A.; Ager, C.; Denz, H.; Hilbe, W.; Jamnig, H.; Hackl, M.; Dzien, A. and Amann, A. (2012): Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants. *J Breath Res* 6 (3), 036008.

Fink, T.; Baumbach, J. I. and Kreuer, S. (2014): Ion mobility spectrometry in breath research. *J Breath Res* 8 (2), 027104.

Fischer, S.; Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, P.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H. and Reinhold, P. (2015):

Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model.

J Breath Res 9 (4), 047113.

Fischer, S.; Trefz, P.; Bergmann, A.; Steffens, M.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H. and Reinhold, P. (2015):

Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model.

J Breath Res 9 (2), 027108.

Gao, P.; Korley, F.; Martin, J. and Chen, B. T. (2002):

Determination of unique microbial volatile organic compounds produced by five *Aspergillus* species commonly found in problem buildings.

AIHA J (Fairfax, Va) 63 (2), 135-140.

Garner, C. E.; Smith, S.; Costello, B. D.; White, P.; Spencer, R.; Probert, C. S. J. and Ratcliffe, N. M. (2007):

Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease.

FASEB J 21 (8), 1675-1688.

Garner, C. E.; Smith, S.; Elviss, N. C.; Humphrey, T. J.; White, P.; Ratcliffe, N. M. and Probert, C. S. (2008):

Identification of *Campylobacter* infection in chickens from volatile faecal emissions.

Biomarkers 13 (4), 413-421.

Gelmont, D.; Stein, R. A. and Mead, J. F. (1981):

Isoprene - the main hydrocarbon in human breath.

Biochem Biophys Res Commun 99 (4), 1456-1460.

Ghorban, K. Z.; Knox, K. L. and Ward, G. M. (1966):

Concentrations of volatile fatty acids and lactic acid in the rumen as influenced by diet and post-feeding time.

J Dairy Sci 49 (12), 1515-1518.

Gordon, R. T.; Schatz, C. B.; Myers, L. J.; Kosty, M.; Gonczy, C.; Kroener, J.; Tran, M.; Kurtzhals, P.; Heath, S.; Koziol, J. A.; Arthur, N.; Gabriel, M.; Hemping, J.; Hemping, G.; Nesbitt, S.; Tucker-Clark, L. and Zaayer, J. (2008):

The use of canines in the detection of human cancers.

*J Altern Complement Med* 14 (1), 61-67.

Gordon, S. M.; Wallace, L. A.; Brinkman, M. C.; Callahan, P. J. and Kenny, D. V. (2002):  
Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking.

*Environ Health Perspect* 110 (7), 689-698.

Grote, C. and Pawliszyn, J. (1997):

Solid-phase microextraction for the analysis of human breath.

*Anal Chem* 69 (4), 587-596.

Guaman, A. V.; Carreras, A.; Calvo, D.; Agudo, I.; Navajas, D.; Pardo, A.; Marco, S. and Farre, R. (2012):

Rapid detection of sepsis in rats through volatile organic compounds in breath.

*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 881-882, 76-82.

Haick, H.; Broza, Y. Y.; Mochalski, P.; Ruzsanyi, V. and Amann, A. (2014):

Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers.

*Chem Soc Rev* 43 (5), 1423-1449.

Hales, K. E.; Parker, D. B. and Cole, N. A. (2012):

Potential odorous volatile organic compound emissions from feces and urine from cattle fed corn-based diets with wet distillers grains and solubles.

*Atmos Environ* 60, 292-297.

Hanai, Y.; Shimono, K.; Matsumura, K.; Vachani, A.; Albelda, S.; Yamazaki, K.;

Beauchamp, G. K. and Oka, H. (2012):

Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer.

*Biosci Biotechnol Biochem* 76 (4), 679-684.

Harger, R. N.; Lamb, E. B. and Hulpieu, H. R. (1938):

A rapid chemical test for intoxication employing breath: A new reagent for alcohol and a procedure for estimating the concentration of alcohol in the body from the ratio of alcohol to carbon dioxide in the breath.

*JAMA* 110 (11), 779-785.

- Harrison, G. R.; Critchley, A. D.; Mayhew, C. A. and Thompson, J. M. (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 (6), 797-799.
- Hasonova, L. and Pavlik, I. (2006):  
Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review.  
Vet Med (Praha) 51 (5), 193-211.
- Hayden, G. F. (1980):  
Olfactory diagnosis in medicine.  
Postgrad Med 67 (4), 110-115, 118.
- Herbig, J.; Müller, M.; Schallhart, S.; Titzmann, T.; Graus, M. and Hansel, A. (2009):  
On-line breath analysis with PTR-TOF.  
J Breath Res 3 (2), 027004.
- Hippokrates (1994):  
Die ärztliche Kunst.  
In: Ausgewählte Schriften. H. Diller (Hrsg.). Stuttgart: Philipp Reclam, 239.
- Holm, E. S.; Adamsen, A. P.; Feilberg, A.; Schafer, A.; Lokke, M. M. and Petersen, M. A. (2013):  
Quality changes during storage of cooked and sliced meat products measured with PTR-MS and HS-GC-MS.  
Meat Sci 95 (2), 302-310.
- Holt, D. W.; Johnston, A. and Ramsey, J. D. (1994):  
Breath pentane and heart rejection.  
J Heart Lung Transplant 13 (6), 1147-1148.
- Horvath, G.; Andersson, H. and Nemes, S. (2013):  
Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward.  
BMC Cancer 13, 396.
- Horvath, G.; Jarverud, G. A.; Jarverud, S. and Horvath, I. (2008):  
Human ovarian carcinomas detected by specific odor.  
Integr Cancer Ther 7 (2), 76-80.

- Jeziński, T.; Walczak, M.; Ligor, T.; Rudnicka, J. and Buszewski, B. (2015):  
Study of the art: canine olfaction used for cancer detection on the basis of breath odour.  
Perspectives and limitations.  
*J Breath Res* 9 (2), 027001.
- Karamanou, M.; Tsoucalas, G. and Androutsos, G. (2013):  
Hallmarks in the study of respiratory physiology and the crucial role of Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794).  
*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 305 (9), L591-594.
- Katsoyiannis, A.; Leva, P. and Kotzias, D. (2008):  
VOC and carbonyl emissions from carpets: A comparative study using four types of environmental chambers.  
*J Hazard Mater* 152 (2), 669-676.
- Kim, K. H.; Jahan, S. A. and Kabir, E. (2012):  
A review of breath analysis for diagnosis of human health.  
*Trends Analyt Chem* 33, 1-8.
- Kim, M.; Kim, J.; Kuehn, L. A.; Bono, J. L.; Berry, E. D.; Kalchayanand, N.; Freetly, H. C.; Benson, A. K. and Wells, J. E. (2014):  
Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets.  
*J Anim Sci* 92 (2), 683-694.
- King, J.; Kupferthaler, A.; Unterkofler, K.; Koc, H.; Teschl, S.; Teschl, G.; Miekisch, W.; Schubert, J.; Hinterhuber, H. and Amann, A. (2009):  
Isoprene and acetone concentration profiles during exercise on an ergometer.  
*J Breath Res* 3 (2).
- Kirsch, F.; Beauchamp, J. and Buettner, A. (2012):  
Time-dependent aroma changes in breast milk after oral intake of a pharmacological preparation containing 1,8-cineole.  
*Clin Nutr* 31 (5), 682-692.
- Kischkel, S.; Miekisch, W.; Sawacki, A.; Straker, E. M.; Trefz, P.; Amann, A. and Schubert, J. K. (2010):  
Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects-confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms.  
*Clin Chim Acta* 411 (21-22), 1637-1644.

- Kneepkens, C. M.; Lepage, G. and Roy, C. C. (1994):  
The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation.  
*Free Radic Biol Med* 17 (2), 127-160.
- Knobloch, H.; Köhler, H.; Commander, N.; Reinhold, P.; Turner, C. and Chambers, M. (2009):  
Volatile organic compound (VOC) analysis for disease detection: Proof of principles for field studies detecting paratuberculosis and brucellosis.  
Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Symposium of Olfaction and Electronic Nose, AIP Conference Proceedings, American Institute of Physics, 1137 (1), 195-197.
- Knobloch, H.; Schroedl, W.; Turner, C.; Chambers, M. and Reinhold, P. (2010):  
Electronic nose responses and acute phase proteins correlate in blood using a bovine model of respiratory infection.  
*Sens Actuators B Chem* 144 (1), 81-87.
- Köhler, H.; Gierke, F. and Möbius, P. (2008):  
Paratuberculosis - current concepts and future of the diagnosis.  
*Magy Allatorvosok Lapja* 130 (Supplement 1), 67-69.
- Köhler, H.; Soschinka, A.; Meyer, M.; Kather, A.; Reinhold, P. and Liebler-Tenorio, E. (2015):  
Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection.  
*BMC Vet Res* 11, 74.
- Krüger, C.; Köhler, H. and Liebler-Tenorio, E. M. (2015):  
Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
*Vet Pathol* 52 (2), 276-290.
- Küntzel, A.; Fischer, S.; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P. and Köhler, H. (2016):  
Effects of biological and methodological factors on volatile organic compound patterns during cultural growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.  
*J Breath Res* 10 (3), 037103.
- Kurada, S.; Alkhouri, N.; Fiocchi, C.; Dweik, R. and Rieder, F. (2015):  
Review article: breath analysis in inflammatory bowel diseases.  
*Aliment Pharmacol Ther* 41 (4), 329-341.

- Kuzma, J.; Nemecekmarshall, M.; Pollock, W. H. and Fall, R. (1995):  
Bacteria produce the volatile hydrocarbon isoprene.  
Curr Microbiol 30 (2), 97-103.
- Li, X.; Duan, S.; Zhang, H.; Qin, Y.; Li, L.; Hu, Z. and Leng, P. (2014):  
Analysis of aroma components of four lamiaceae plants.  
Journal of Henan Agricultural Sciences 43 (7), 121-125.
- Ligor, T.; Ligor, M.; Amann, A.; Ager, C.; Bachler, M.; Dzien, A. and Buszewski, B. (2008):  
The analysis of healthy volunteers' exhaled breath by the use of solid-phase microextraction  
and GC-MS.  
J Breath Res 2 (4), 046006.
- Lindinger, W.; Taucher, J.; Jordan, A.; Hansel, A. and Vogel, W. (1997):  
Endogenous production of methanol after the consumption of fruit.  
Alcohol Clin Exp Res 21 (5), 939-943.
- Lippi, G. and Cervellin, G. (2012):  
Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: Myth or opportunity?  
Clin Chem Lab Med 50 (3), 435-439.
- Logan, R. P.; Polson, R. J.; Misiewicz, J. J.; Rao, G.; Karim, N. Q.; Newell, D.; Johnson, P.;  
Wadsworth, J.; Walker, M. M. and Baron, J. H. (1991):  
Simplified single sample <sup>13</sup>Carbon urea breath test for *Helicobacter pylori*: comparison with  
histology, culture, and ELISA serology.  
Gut 32 (12), 1461-1464.
- Lord, H. L.; Zhan, W. and Pawliszyn, J. (2010):  
Fundamentals and applications of needle trap devices: A critical review.  
Anal Chim Acta 677 (1), 3-18.
- Lyford, J. L. and Huber, J. T. (1988):  
Digestion, metabolism and nutrient needs in preruminants.  
In: The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. D. C. Church (Hrsg.).  
Englewood Cliffs: Prentice Hall, 401-420.
- Machado, R. F.; Laskowski, D.; Deffenderfer, O.; Burch, T.; Zheng, S.; Mazzone, P. J.;  
Mekhail, T.; Jennings, C.; Stoller, J. K.; Pyle, J.; Duncan, J.; Dweik, R. A. and Erzurum, S. C.  
(2005):  
Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath.  
Am J Respir Crit Care Med 171 (11), 1286-1291.

- McCarthy, R. D. and Kesler, E. M. (1956):  
Relation between age of calf, blood glucose, blood and rumen levels of volatile fatty acids,  
and *in vitro* cellulose digestion.  
J Dairy Sci 39 (9), 1280-1287.
- McCulloch, M.; Jeziarski, T.; Broffman, M.; Hubbard, A.; Turner, K. and Janecki, T. (2006):  
Diagnostic accuracy of canine scent detection in early- and late-stage lung and breast cancers.  
Integr Cancer Ther 5 (1), 30-39.
- McCurdy, M. R.; Bakhirkin, Y.; Wysocki, G.; Lewicki, R. and Tittel, F. K. (2007):  
Recent advances of laser-spectroscopy-based techniques for applications in breath analysis.  
J Breath Res 1 (1), 014001.
- McKenna, S. L.; Keefe, G. P.; Tiwari, A.; VanLeeuwen, J. and Barkema, H. W. (2006):  
John's disease in Canada part II: Disease impacts, risk factors, and control programs for dairy  
producers.  
Can Vet J 47 (11), 1089-1099.
- Metzler-Zebeli, B. U.; Schmitz-Esser, S.; Klevenhusen, F.; Podstatzky-Lichtenstein, L.;  
Wagner, M. and Zebeli, Q. (2013):  
Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and  
lipopolysaccharide in goats.  
Anaerobe 20, 65-73.
- Mgode, G. F.; Weetjens, B. J.; Nawrath, T.; Lazar, D.; Cox, C.; Jubitana, M.; Mahoney, A.;  
Kuipers, D.; Machang'u, R. S.; Weiner, J.; Schulz, S. and Kaufmann, S. H. (2012):  
*Mycobacterium tuberculosis* volatiles for diagnosis of tuberculosis by *Cricetomys* rats.  
Tuberculosis (Edinb) 92 (6), 535-542.
- Miekisch, W.; Fuchs, P.; Kamysek, S.; Neumann, C. and Schubert, J. K. (2008):  
Assessment of propofol concentrations in human breath and blood by means of HS-SPME-  
GC-MS.  
Clin Chim Acta 395 (1-2), 32-37.
- Miekisch, W.; Herbig, J. and Schubert, J. K. (2012):  
Data interpretation in breath biomarker research: pitfalls and directions.  
J Breath Res 6 (3), 036007.
- Miekisch, W.; Kischkel, S.; Sawacki, A.; Liebau, T.; Mieth, M. and Schubert, J. K. (2008):  
Impact of sampling procedures on the results of breath analysis.  
J Breath Res 2 (2), 026007.

Miekisch, W. and Schubert, J. K. (2006):

From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical developments in breath analysis.

Trends Analyt Chem 25 (7), 665-673.

Miekisch, W.; Schubert, J. K. and Noeldge-Schomburg, G. F. (2004):

Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds.

Clin Chim Acta 347 (1-2), 25-39.

Miekisch, W.; Trefz, P.; Bergmann, A. and Schubert, J. K. (2014):

Microextraction techniques in breath biomarker analysis.

Bioanalysis 6 (9), 1275-1291.

Mieth, M.; Kischkel, S.; Schubert, J. K.; Hein, D. and Miekisch, W. (2009):

Multibed needle trap devices for on site sampling and preconcentration of volatile breath biomarkers.

Anal Chem 81 (14), 5851-5857.

Mieth, M.; Schubert, J. K.; Groger, T.; Sabel, B.; Kischkel, S.; Fuchs, P.; Hein, D.;

Zimmermann, R. and Miekisch, W. (2010):

Automated needle trap heart-cut GC/MS and needle trap comprehensive two-dimensional GC/TOF-MS for breath gas analysis in the clinical environment.

Anal Chem 82 (6), 2541-2551.

Mills, G. A. and Walker, V. (2000):

Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials.

J Chromatogr A 902 (1), 267-287.

Mochalski, P.; King, J.; Klieber, M.; Unterkofler, K.; Hinterhuber, H.; Baumann, M. and Amann, A. (2013):

Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers.

Analyst 138 (7), 2134-2145.

Moorhead, K. T.; Hill, J. V.; Chase, J. G.; Hann, C. E.; Scotter, J. M.; Storer, M. K. and Endre, Z. H. (2011):

Modelling acute renal failure using blood and breath biomarkers in rats.

Comput Methods Programs Biomed 101 (2), 173-182.

- Moser, E. and McCulloch, M. (2010):  
Canine scent detection of human cancers: A review of methods and accuracy.  
J Vet Behav 5 (3), 145-152.
- Mottram, T. T.; Dobbelaar, P.; Schukken, Y. H.; Hobbs, P. J. and Bartlett, P. N. (1999):  
An experiment to determine the feasibility of automatically detecting hyperketonaemia in dairy cows.  
Livest Prod Sci 61 (1), 7-11.
- Moularat, S.; Robine, E.; Ramalho, O. and Oturan, M. A. (2008):  
Detection of fungal development in a closed environment through the identification of specific VOC: Demonstration of a specific VOC fingerprint for fungal development.  
Sci Total Environ 407 (1), 139-146.
- Munoz, X.; Bustamante, V.; Lopez-Campos, J. L.; Cruz, M. J. and Barreiro, E. (2015):  
Usefulness of noninvasive methods for the study of bronchial inflammation in the control of patients with asthma.  
Int Arch Allergy Immunol 166 (1), 1-12.
- Nielsen, S. S. and Toft, N. (2008):  
Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques.  
Vet Microbiol 129 (3-4), 217-235.
- Pauling, L.; Robinson, A. B.; Teranishi, R. and Cary, P. (1971):  
Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography.  
Proc Natl Acad Sci U S A 68 (10), 2374-2376.
- Peled, N.; Ionescu, R.; Nol, P.; Barash, O.; McCollum, M.; VerCauteren, K.; Koslow, M.; Stahl, R.; Rhyan, J. and Haick, H. (2012):  
Detection of volatile organic compounds in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*.  
Sens Actuators B Chem 171, 588-594.
- Phillips, M.; Cataneo, R. N.; Condos, R.; Ring Erickson, G. A.; Greenberg, J.; La Bombardi, V.; Munawar, M. I. and Tietje, O. (2007):  
Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath.  
Tuberculosis (Edinb) 87 (1), 44-52.

Phillips, M.; Cataneo, R. N.; Greenberg, J.; Gunawardena, R.; Naidu, A. and Rahbari-Oskoui, F. (2000):

Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress.

J Lab Clin Med 136 (3), 243-249.

Phillips, M.; Herrera, J.; Krishnan, S.; Zain, M.; Greenberg, J. and Cataneo, R. N. (1999):

Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans.

J Chromatogr B Biomed Sci Appl 729 (1-2), 75-88.

Piatkowski, B.; Gürtler, H. and Voigt, J. (1990):

Verdauung beim Wiederkäuer.

In: Grundzüge der Wiederkäuer-Ernährung. B. Piatkowski, H. Gürtler and J. Voigt (Hrsg.).

Jena: Gustav Fischer Verlag, 35-57.

Piccione, G.; Sciano, S.; Messina, V.; Casella, S. and Zumbo, A. (2011):

Changes in serum total proteins, protein fractions and albumin-globulin ratio during neonatal period in goat kids and their mothers after parturition.

Ann Anim Sci 11 (2), 251-260.

Pickel, D.; Manucy, G. P.; Walker, D. B.; Hall, S. B. and Walker, J. C. (2004):

Evidence for canine olfactory detection of melanoma.

Applied Animal Behaviour Science 89 (1-2), 107-116.

Pleil, J. D. (2008):

Role of exhaled breath biomarkers in environmental health science.

J Toxicol Environ Health B Crit Rev 11 (8), 613-629.

Pleil, J. D.; Stiegel, M. A. and Risby, T. H. (2013):

Clinical breath analysis: discriminating between human endogenous compounds and exogenous (environmental) chemical confounders.

J Breath Res 7 (1), 017107.

Pleil, J. D.; Stiegel, M. A. and Sobus, J. R. (2011):

Breath biomarkers in environmental health science: Exploring patterns in the human exposome.

J Breath Res 5 (4), 046005.

- Purkhart, R.; Köhler, H.; Liebler-Tenorio, E.; Meyer, M.; Becher, G.; Kikowatz, A. and 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 (2), 027103.
- Russell, J. B.; Muck, R. E. and Weimer, P. J. (2009):  
Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen.  
*FEMS Microbiol Ecol* 67 (2), 183-197.
- Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Birken, T.; Geiger, K. and Noldge-Schomburg, G. F. (2005):  
Impact of inspired substance concentrations on the results of breath analysis in mechanically ventilated patients.  
*Biomarkers* 10 (2-3), 138-152.
- Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Geiger, K. and Noldge-Schomburg, G. F. (2004):  
Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations.  
*Expert Rev Mol Diagn* 4 (5), 619-629.
- Schubert, J. K.; Spittler, K. H.; Braun, G.; Geiger, K. and Guttman, J. (2001):  
CO<sub>2</sub>-controlled sampling of alveolar gas in mechanically ventilated patients.  
*J. Appl. Physiol.* 90 (2), 486-492.
- Schubert, R.; Schwoebel, H.; Mau-Moeller, A.; Behrens, M.; Fuchs, P.; Sklorz, M.; Schubert, J. K.; Bruhn, S. and Miekisch, W. (2012):  
Metabolic monitoring and assessment of anaerobic threshold by means of breath biomarkers.  
*Metabolomics* 8 (6), 1069-1080.
- Schultz, L. H. (1968):  
Ketosis in dairy cattle.  
*J Dairy Sci* 51 (7), 1133-1140.
- Schulz, S. and Dickschat, J. S. (2007):  
Bacterial volatiles: the smell of small organisms.  
*Nat Prod Rep* 24 (4), 814-842.

Scott-Thomas, A. J.; Syhre, M.; Pattemore, P. K.; Epton, M.; Laing, R.; Pearson, J. and Chambers, S. T. (2010):

2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung.

BMC Pulm Med 10, 56.

Smith, D. and Spanel, P. (2005):

Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis.

Mass Spectrom Rev 24 (5), 661-700.

Smith, D.; Spanel, P. and Davies, S. (1999):

Trace gases in breath of healthy volunteers when fasting and after a protein-calorie meal: a preliminary study.

J Appl Physiol 87 (5), 1584-1588.

Sonoda, H.; Kohnoe, S.; Yamazato, T.; Satoh, Y.; Morizono, G.; Shikata, K.; Morita, M.;

Watanabe, A.; Morita, M.; Kakeji, Y.; Inoue, F. and Maehara, Y. (2011):

Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection.

Gut 60 (6), 814-819.

Spanel, P.; Dryahina, K.; Rejskova, A.; Chippendale, T. W. and Smith, D. (2011):

Breath acetone concentration; biological variability and the influence of diet.

Physiol Meas 32 (8), N23-31.

Spanel, P.; Dryahina, K. and Smith, D. (2007):

Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4-83 years.

J Breath Res 1 (1), 011001.

Spanel, P.; Dryahina, K. and Smith, D. (2007):

The concentration distributions of some metabolites in the exhaled breath of young adults.

J Breath Res 1 (2), 026001.

Spanel, P. and Smith, D. (2011):

Progress in SIFT-MS: Breath analysis and other applications.

Mass Spectrom Rev 30 (2), 236-267.

Spanel, P. and Smith, D. (2011):

Volatile compounds in health and disease.

Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14 (5), 455-460.

- Spinhirne, J. P.; Koziel, J. A. and Chirase, N. K. (2004):  
Sampling and analysis of volatile organic compounds in bovine breath by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.  
*J Chromatogr A* 1025 (1), 63-69.
- Sponring, A.; Filipiak, W.; Ager, C.; Schubert, J.; Miekisch, W.; Amann, A. and Troppmair, J. (2010):  
Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in the headspace of NCI-H1666 lung cancer cells.  
*Cancer Biomark* 7 (3), 153-161.
- Spooner, A. D.; Bessant, C.; Turner, C.; Knobloch, H. and Chambers, M. (2009):  
Evaluation of a combination of SIFT-MS and multivariate data analysis for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* in wild badgers.  
*Analyst* 134 (9), 1922-1927.
- Stone, B. G.; Besse, T. J.; Duane, W. C.; Evans, C. D. and Demaster, E. G. (1993):  
Effects of regulating cholesterol-biosynthesis on breath isoprene excretion in men.  
*Lipids* 28 (8), 705-708.
- Sukul, P.; Trefz, P.; Kamysek, S.; Schubert, J. K. and Miekisch, W. (2015):  
Instant effects of changing body positions on compositions of exhaled breath.  
*J Breath Res* 9 (4), 047105.
- Sukul, P.; Trefz, P.; Schubert, J. K. and Miekisch, W. (2014):  
Immediate effects of breath holding maneuvers onto composition of exhaled breath.  
*J Breath Res* 8 (3), 037102.
- Taucher, J.; Hansel, A.; Jordan, A.; Fall, R.; Futrell, J. H. and Lindinger, W. (1997):  
Detection of isoprene in expired air from human subjects using proton-transfer-reaction mass spectrometry.  
*Rapid Commun Mass Spectrom* 11 (11), 1230-1234.
- Taucher, J.; Hansel, A.; Jordan, A. and Lindinger, W. (1996):  
Analysis of compounds in human breath after ingestion of garlic using proton-transfer-reaction mass spectrometry.  
*J Agric Food Chem* 44 (12), 3778-3782.
- Teranishi, R.; Mon, T. R.; Robinson, A. B.; Cary, P. and Pauling, L. (1972):  
Gas chromatography of volatiles from breath and urine.  
*Anal Chem* 44 (1), 18-20.

Thorn, R. M. and Greenman, J. (2012):

Microbial volatile compounds in health and disease conditions.

J Breath Res 6 (2), 024001.

Tran, V. H.; Chan, H. P.; Thurston, M.; Jackson, P.; Lewis, C.; Yates, D.; Bell, G. and

Thomas, P. S. (2010):

Breath analysis of lung cancer patients using an electronic nose detection system.

IEEE Sens J 10 (9), 1514-1518.

Trefz, P.; Kischkel, S.; Hein, D.; James, E. S.; Schubert, J. K. and 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, J. K. and Miekisch, W.

(2013):

Volatile emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mirror bacterial growth and enable distinction of different strains.

PLoS One 8 (10), e76868.

Trefz, P.; Rösner, L.; Hein, D.; Schubert, J. K. and Miekisch, W. (2013):

Evaluation of needle trap micro-extraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis.

Anal Bioanal Chem 405 (10), 3105-3115.

Turner, C. (2011):

Potential of breath and skin analysis for monitoring blood glucose concentration in diabetes.

Expert Rev Mol Diagn 11 (5), 497-503.

Turner, C.; Spanel, P. and Smith, D. (2006):

A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS.

Physiol Meas 27 (4), 321-337.

Underwood, E. A. (1944):

Lavoisier and the history of respiration.

Proc R Soc Med 37 (6), 247-262.

Van Soest, P. J. (1994):

Function of the Ruminant Forestomach.

In: Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd Edition. Ithaca: Cornell University Press, 230-252.

Wade, C. R. and Vanrij, A. M. (1985):

*In vivo* lipid peroxidation in man as measured by the respiratory excretion of ethane, pentane, and other low-molecular-weight hydrocarbons.

Anal Biochem 150 (1), 1-7.

Walton, C.; Fowler, D. P.; Turner, C.; Jia, W. J.; Whitehead, R. N.; Griffiths, L.; Dawson, C.; Waring, R. H.; Ramsden, D. B.; Cole, J. A.; Cauchi, M.; Bessant, C. and Hunter, J. O. (2013): Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflamm Bowel Dis* 19 (10), 2069-2078.

Wang, C. and Sahay, P. (2009):

Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits.

Sensors (Basel) 9 (10), 8230-8262.

Wang, Z. and Wang, C. (2013):

Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements.

J Breath Res 7 (3), 037109.

Wang, Z.; Wang, C. and Lathan, P. (2014):

Breath acetone analysis of diabetic dogs using a cavity ringdown breath analyzer.

IEEE Sens J 14 (4), 1117-1123.

Weetjens, B. J.; Mgode, G. F.; Machang'u, R. S.; Kazwala, R.; Mfinanga, G.; Lwilla, F.; Cox, C.; Jubitana, M.; Kanyagha, H.; Mtandu, R.; Kahwa, A.; Mwessongo, J.; Makingi, G.; Mfaume, S.; Van Steenberge, J.; Beyene, N. W.; Billet, M. and Verhagen, R. (2009): African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 13 (6), 737-743.

Wei, B.; Alwis, K. U.; Li, Z.; Wang, L.; Valentin-Blasini, L.; Sosnoff, C. S.; Xia, Y.; Conway, K. P. and Blount, B. C. (2016):

Urinary concentrations of PAH and VOC metabolites in marijuana users.

Environ Int 88, 1-8.

Weimer, P. J. (1992):

Cellulose degradation by ruminal microorganisms.

Crit Rev Biotechnol 12 (3), 189-223.

Whitlock, R. H. and Buergelt, C. (1996):

Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology).

Vet Clin North Am Food Anim Pract 12 (2), 345-356.

Williams, H. and Pembroke, A. (1989):

Sniffer dogs in the melanoma clinic?

Lancet 1 (8640), 734.

Willis, C. M.; Britton, L. E.; Harris, R.; Wallace, J. and Guest, C. M. (2010):

Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs.

Cancer Biomark 8 (3), 145-153.

Willis, C. M.; Church, S. M.; Guest, C. M.; Cook, W. A.; McCarthy, N.; Bransbury, A. J.;

Church, M. R. and Church, J. C. (2004):

Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study.

BMJ 329 (7468), 712.

Zhan, X.; Duan, J. and Duan, Y. (2013):

Recent developments of proton-transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) and its applications in medical research.

Mass Spectrom Rev 32 (2), 143-165.

Zhu, J. and Hill, J. E. (2013):

Detection of *Escherichia coli* via VOC profiling using secondary electrospray ionization-mass spectrometry (SESI-MS).

Food Microbiol 34 (2), 412-417.

## 9 Anhang

### Anlage A1

Bergmann, A.; Trefz, P.; **Fischer, S.**; Klepik, K.; Walter, G.; Steffens, M.; Ziller, M.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H.; Miekisch, W. (2015):

*In vivo* volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Plos One 10 (4), e0123980

DOI: 10.1371/journal.pone.0123980

## RESEARCH ARTICLE

# *In Vivo* Volatile Organic Compound Signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Andreas Bergmann<sup>1</sup>, Phillip Trefz<sup>1</sup>, Sina Fischer<sup>2</sup>, Klaus Klepik<sup>1</sup>, Gudrun Walter<sup>2</sup>, Markus Steffens<sup>1</sup>, Mario Ziller<sup>3</sup>, Jochen K. Schubert<sup>1</sup>, Petra Reinhold<sup>2</sup>, Heike Köhler<sup>2</sup>, Wolfram Miekisch<sup>1\*</sup>

**1** Department of Anaesthesia and Intensive Care, University Medicine Rostock, Rostock, Germany, **2** Institute of Molecular Pathogenesis, Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany, **3** Friedrich-Loeffler-Institut (Federal Research Institute for Animal Health), Greifswald, Germany, and Biomathematics Working Group, Insel Riems, Germany

\* [wolfram.miekisch@uni-rostock.de](mailto:wolfram.miekisch@uni-rostock.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Bergmann A, Trefz P, Fischer S, Klepik K, Walter G, Steffens M, et al. (2015) *In Vivo* Volatile Organic Compound Signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. PLoS ONE 10(4): e0123980. doi:10.1371/journal.pone.0123980

**Received:** October 29, 2014

**Accepted:** February 24, 2015

**Published:** April 27, 2015

**Copyright:** © 2015 Bergmann et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors are very grateful to the German Research Foundation (DFG, [www.dfg.de](http://www.dfg.de), Grant number RE 1098/4-1, SCHU 1960/4-1) for their trust in work of the whole project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of a chronic enteric disease of ruminants. Available diagnostic tests are complex and slow. *In vitro*, volatile organic compound (VOC) patterns emitted from MAP cultures mirrored bacterial growth and enabled distinction of different strains. This study was intended to determine VOCs *in vivo* in the controlled setting of an animal model. VOCs were pre-concentrated from breath and feces of 42 goats (16 controls and 26 MAP-inoculated animals) by means of needle trap microextraction (breath) and solid phase microextraction (feces) and analyzed by gas chromatography/ mass spectrometry. Analyses were performed 18, 29, 33, 41 and 48 weeks after inoculation. MAP-specific antibodies and MAP-specific interferon- $\gamma$ -response were determined from blood. Identities of all marker-VOCs were confirmed through analysis of pure reference substances. Based on detection limits in the high pptV and linear ranges of two orders of magnitude more than 100 VOCs could be detected in breath and in headspace over feces. Twenty eight substances differed between inoculated and non-inoculated animals. Although patterns of most prominent substances such as furans, oxygenated substances and hydrocarbons changed in the course of infection, differences between inoculated and non-inoculated animals remained detectable at any time for 16 substances in feces and 3 VOCs in breath. Differences of VOC concentrations over feces reflected presence of MAP bacteria. Differences in VOC profiles from breath were linked to the host response in terms of interferon- $\gamma$ -response. In a perspective *in vivo* analysis of VOCs may help to overcome limitations of established tests.

## Introduction

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis, a chronic enteric disease of ruminants (also called Johne's disease). In the US, Johne's disease causes an estimated loss of more than two hundred million dollars per year due to reduced productivity of dairy cattle [1]. Being intestinal pathogens these bacteria are also suspected to contribute to the pathogenesis of Crohn's disease, a chronic bowel disease in humans [2–5].

The currently established diagnostic methods for paratuberculosis have limitations. Despite state-of-the-art technologies, *in vivo* diagnosis of paratuberculosis demands either fecal shedding of the organisms or sero-conversion, which both occur only irregularly during the clinically non-apparent phase of the disease [6–9]. Cultural detection of MAP in feces or in tissue samples after necropsy is labor intensive and time consuming, while the sensitivity of PCR methods can be affected by low and variable numbers of bacteria in feces and the co-purification of PCR inhibitors during DNA extraction [10]. Novel diagnostic methods, therefore, could gain considerable importance for animal and human health.

More than 300 different VOCs were found in headspace over bacterial cultures [9, 11], feces [12–15] or in breath. Fecal infections with pathogens like *Clostridium difficile* [12, 16, 17], *Campylobacter jejuni* [12, 17], rotavirus, enteric virus [17] and *Vibrio cholera* 01 [13] as well as chronic bowel diseases like Crohn's disease, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome [14, 15, 18] were investigated in the past decade. A general problem in analyses performed with samples from feces lies in the fact that the predominant part of gut microbiota are commensal bacteria such as *E. coli*. As a considerable fraction of VOCs found in feces will, therefore, be generated by these bacteria, a well matched control group has to be analyzed in order to identify VOC patterns of pathogenic bacteria.

VOC patterns in breath have been proposed for identification of tuberculosis, the most important mycobacterial infection in humans [19]. Seven substances were found in breath gas discriminating smear positive from smear negative patients *in vivo*. Two of these substances were also detected in headspace over sputum [20].

In animals, differential ion mobility spectroscopy (DMS) was applied *in vivo* for the identification of MAP infection. In this study, exhaled breath and headspace over feces of goats were analyzed. The composition of VOC patterns differed significantly between chronically infected and non-infected animals [8]. Similar attempts were made with electronic-nose systems (e-nose) analyzing headspace over serum samples of cattle [21].

As unequivocal substance identification is not possible by means of unspecific techniques such as e-nose or DMS, the impact of different substances onto those "VOC features" is still unclear. In addition, the role of potential contaminations from ambient air, previous exposure or medication has to be taken into account. To solve these problems, analytical methods being sensitive and specific enough to quantify and to identify VOCs in trace levels have to be applied. These requirements are optimally met by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) [6, 22, 23].

In recent studies we described VOC patterns consisting of 34 VOCs as potential marker sets for detecting *in vitro* growth of MAP. VOCs were collected in headspace over cultures and analyzed using solid phase microextraction (SPME) in combination with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) [9]. The VOC-patterns mirrored bacterial growth and also enabled distinction of different strains. Transfer of results from *in vitro* tests to *in vivo* may cause crucial misinterpretations if interactions with the host organism or methodological influences such as effects of sample storage or conversion of substances during analysis, are not addressed properly [24, 25]

Therefore, the present study was intended to apply VOC analyses *in vivo* in the controlled setting of an animal model for MAP infection. The following issues were addressed in detail:

- Are there differences between inoculated and non-inoculated animals in terms of VOC profiles in breath and feces?
- Do VOC patterns over feces and in breath correspond to each other?
- Do VOC signatures change during the course of infection?
- Can the previously described VOC markers emitted from MAP cultures be detected in the *in vivo* setting?

## Animals, Materials and Methods

### Animals

All 42 goats belonged to the same domestic race (Thüringer Wald Ziege) and were purchased from a local goat holding. Twenty six goats were inoculated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (strain JII-1961) essentially as described elsewhere [7]. In brief, they received doses of 10 mg bacterial wet mass of the MAP strain ten times every two to three days. Each individual dose was suspended in 50 mL of pre-warmed milk replacer and was administered orally prior to regular morning feeding. The overall bacterial inoculum amounted to  $2.6 \times 10^8$  cfu per animal. Additionally, 16 goats were not inoculated and were considered as healthy controls. Inoculated and non-inoculated goats were kept in separate stables. The 26 inoculated goats were divided into two groups and kept in different stables. Animal husbandry, preparation of inoculation batches as well as inoculation procedures were carried out as described recently [7]. Control animals were about four weeks younger than the inoculated group of animals.

Twelve, 24 and 36 weeks after the end of inoculation (wpi) seven and twice six inoculated animals and three controls each were dissected. The remaining inoculated ( $n = 7$ ) and control animals ( $n = 7$ ) were dissected at the end of the experiment at 52 wpi. Infection was confirmed in 25/26 of the MAP-inoculated goats by cultural isolation of MAP from tissue samples. MAP was not recovered from any of the control animals [7].

**Ethics statement.** This study was carried out in strict accordance with European and National Law for the Care and Use of Animals. The protocol was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments and Protection of Animals of the State of Thuringia, Germany (Permit Number: 04-001/11). All experiments were done in containment of biosafety level 2 under supervision of the authorized institutional Agent for Animal Protection. During the entire study, every effort was made to minimize suffering of the animals.

### Materials

**Equipment.** In order to identify and quantify volatile organic compounds we adapted microextraction techniques for pre-concentration and applied GC-MS for analysis. For VOC determination in the headspace above feces, solid phase microextraction (SPME) was applied. For the breath analyses, needle trap microextraction (NTME) was used.

SPME fiber assemblies (PDMS-Carboxen; 75 $\mu$ m) and SPME Injection sleeves (0.75mm ID, part. no.: 2-6375.05) were bought from Supelco (Bellefonte, USA). A SPME-auto-sampler (Combi-PAL, CTC-analytics, Zwingen, Switzerland) was used.

Needle trap devices (NTDs) packed with 2 cm of a copolymer of methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate were obtained from Shinwa Ltd., Japan (NeedleEx) [23]. A custom-made NTD-heating-station, NTD-auto-sampler, Teflon-caps and magnetic cap with a Teflon-

inlet for sealing of NTDs were bought from PAS Technology (Magdala, Germany). The 20-mL-headspace-vials and Teflon-coated rubber septa in combination with magnetic crimp caps were purchased from Gerstel GmbH & Co.KG (Muelheim/Ruhr, Germany).

Gas chromatographs (GC) (model-no.: 7890A) in combination with inert XL mass selective detectors (MS) (model-no.: 5975C), long life non-stick septa and non-stick Liner O-rings were bought from Agilent Technologies (Boeblingen, Germany).

A CP-Pora Bond Q Fused Silica Column (25 m, 0.32 mm, Varian) was applied for the analysis of the SPME samples. A RTX-624 (60 m; 0.32 mm; 1.8  $\mu$ m film thickness) Restek, Bad Soden, Germany) capillary column was used for NTME analysis.

**Reference substances.** Identities of all VOCs considered as potential marker substances were confirmed through analysis of pure reference substances.

Acetone, 2-butanone, hexanal, nonanal, isoprene and benzene were acquired from Ionimed Analytik GmbH (Innsbruck, Austria). Butane, pentane and hexane were bought from Supelco (Bellefonte, USA). Methyl-isobutyl-ketone, 1-propanol, styrene, 3-octanone, 2-heptanone, furan, heptane, methylacetate, 2-methylfuran, 2-ethylfuran, 2-pentylfuran, 2-pentanone, 2-hexanone, 3-hexanone, 3-methyl-2-butanone, 3-methyl-2-pentanone, 2-propanethiol and dimethylsulfide were purchased from Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). 2-Methylbutanal and dimethyldisulfide were bought from Abbott GmbH & Co.KG (Wiesbaden, Germany). Ethylbenzene was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). 3-methylfuran and 3-methylbutanal was purchased from TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium).

## Methods

**Sampling.** Five measuring campaigns in the infected animals and the control group were carried out during a period of 8 months. [Table 1](#) shows a detailed overview of breath gas and feces sampling. Sampling from inoculated goats and healthy animals was always done at the same day, irrespective of the individual age of the goats.

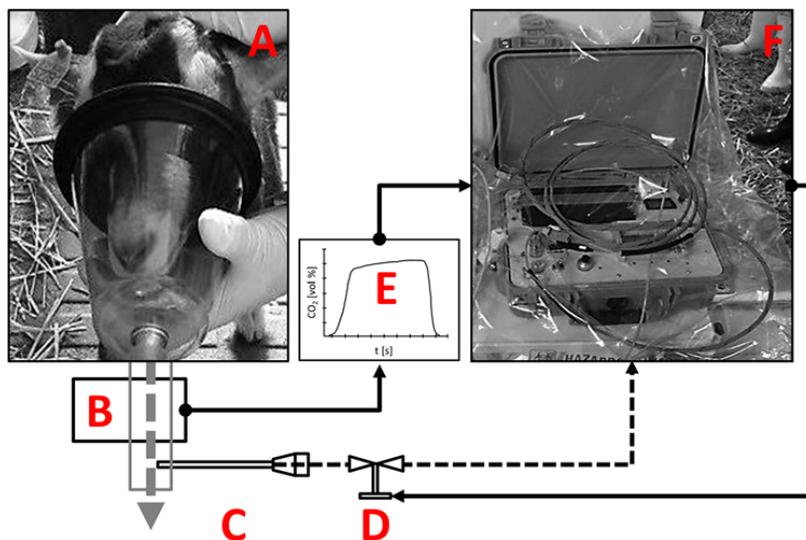
**Feces.** Samples from headspace over feces were pre-concentrated by means of SPME and analyzed by means of GC-MS. Feces were collected into 20 mL headspace vials and sealed with Teflon-coated rubber septa in combination with magnetic crimp caps. Carboxen/PDMS-containing SPME-fibers were used for all measurements. Before SPME-fibers were used for the first time, they were conditioned in a GC-injector at 300°C for 1h. Afterwards fibers were retracted and tips of the fibers were sealed until usage. Feces samples were conditioned at 42°C for 3 min. Fibers were pierced through the septum and exposed to the headspace of the feces for 7 min. The sample was agitated during equilibration with 500 rpm using the CTC-PAL system. Afterwards fibers were retracted and immediately injected into the hot injector for measurement. Before each reuse, SPME-fibers were reconditioned again at 290°C in the GC injector for 30min.

Blank runs of the fibers were performed on every day before the measurements to ensure that the SPME-coating was clean and that no uncontrolled bleeding of column, septa or fiber

**Table 1. Overview of breath gas samples (b) and feces samples (f) taken from goats.**

weeks after inoculation		18	29	33	41	48	$\Sigma$
		sampled animals					
inoculated animals	b	11	6	13	7	6	43
	f	19	13	13	7	5	57
non-inoculated animals	b	13	8	10	7	7	45
	f	16	10	10	7	7	50

doi:10.1371/journal.pone.0123980.t001



**Fig 1. Experimental set up for alveolar breath sampling in goats.** A—sampling mask; B—CO<sub>2</sub>-sensor; C—Needle Trap Device (NTD); D—CO<sub>2</sub> triggered flow valve; E—Capnograd for time resolved CO<sub>2</sub>-monitoring; F—sampling box; dashed arrows represent air flows; continuous arrows represent electronic signals.

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g001

took place. In order to control the quality of SPME-fibers, a consistent concentration (ppb-range) of 2,3-dimethyl-1,3-butadiene in methanol was analyzed at the beginning and at the end of every GC-MS sampling queue.

**Breath gas.** An automated alveolar sampling device (PAS Technology, Magdala) [26] was used for alveolar NTD breath sampling (Fig 1).

Sixty mL of alveolar gas were collected onto the NTD by means of the automated CO<sub>2</sub> controlled device. The device was connected to a fast responding mainstream capnometer (Philips Respironics, response time < 60 ms). In the alveolar phase of exhalation a valve was opened and breath gas was drawn through the NTD. Sample volume was controlled by means of a mass flow controller. The flow rate during sampling was 20 mL/min. After sampling the NTDs were sealed at the luer lock end by means of magnetic caps with Teflon-inlets. On the tip end, NTDs were sealed with Teflon-caps. The same procedure of breath sampling without CO<sub>2</sub> controlled opening of the valve D (Fig 1) was used for generation of at least two room air samples per day and per stable.

Prior to first usage NTDs were conditioned in a heating device (PAS technology) for at least 20 hours at 195°C under permanent helium flow (1 bar front pressure). After conditioning, NTDs were sealed at both ends with Teflon-caps. Before actual use NTDs were reconditioned for 30 minutes at 195°C.

**SPME-GC-MS analysis of feces.** GC-MS (Agilent MSD) was used for separation and detection of VOCs desorbed from SPME-fibers. SPME fibers were thermally desorbed at 290°C in the GC-injector. During sample injection the injector was operated in splitless mode for 60s at a head pressure of 0.643 bar, resulting in a column flow rate of 1.7 mL/min. After the injection phase a split ratio of 30 was applied for the remaining analysis time. The column temperature program consisted of the following steps: 90°C for 6 min, 15°C/min to 120°C for 1 min, 10°C/min to 140°C for 7 min, 15°C/min to 260°C for 6 min. The mass spectrometer was

operated in electron impact ionization (70 eV) mode and recording was done in full scan mode. The mass range was 35–300 amu and the scan rate was 2.73 scans per second. The temperature of the ion source was set to 230°C and the temperature of the transfer line was set to 280°C. Extracted ion counts (EIC) were used to calculate peak areas for all compounds. Peak areas were calculated using Agilent MSD Chemstation (E.02.00.493) Software.

**NTD-GC-MS analysis of breath gas.** GC-MS (Agilent MSD) was used for separation and detection of VOCs desorbed from the NTDs. Teflon-caps at the tip end were stripped off by the NTD-auto-sampler (Concept, PAS Technology, Germany) prior to injection. Automatic desorption of NTDs was realized by automated insertion of NTDs into the injection port [27]. NTDs were thermally desorbed using the expansive flow technique in the injection port of the GC (splitless mode). The temperature of the injector was 200°C [28]. During desorption the injector was operated in splitless mode for 30s at a head pressure of 0.603 bar, resulting in a column flow rate of 1.5 ml/min. After the injection phase a split ratio of 33 was applied for the remaining analysis time. The column temperature program consisted of the following steps: 40°C for 5 min, 8°C/min to 120°C for 2 min, 10°C/min to 220°C, 20°C/min to 250°C for 4 min. The mass spectrometer was operated in electron impact ionization (70 eV) mode and recording was done in full scan mode. Mass range was 50–300 amu and scan rate was 2.73 scans per second. Temperature of the ion source was 250°C and temperature of the transfer line was 240°C. Extracted ion counts (EIC) were used to calculate peak areas for all compounds. Peak areas were calculated using Agilent MSD Chemstation (E.02.00.493) Software.

**Identification and quantification of marker substances by means of GC-MS.** Tentative substance identification was done by means of mass spectral library (NIST 2005 Gatesburg, PA, USA) search. Compounds with concentration differences between inoculated and non-inoculated animals were considered as potential marker substances.

GC retention times and mass spectra of all potential marker compounds were verified through analysis of pure reference substances. The substance lists are given in Table 2. Substances marked with an asterisk (\*) in Table 2b had been identified as potential biomarkers for MAP bacteria in a former *in vitro* study [9].

For quantification, gas standards were prepared in concentrations between 1 and 50 ppbV. For acetone, 3-octanone, 1-propanol, 2-butanone, 2-pentanone, 2-hexanone, 3-methyl-2-pentanone, methylacetate and dimethylsulfide higher concentrations were prepared additionally for calibration. At least five different concentration levels were prepared for calibration of each substance. Calibration mixtures of pure reference materials not available as gaseous standards were prepared by transferring liquid reference substances into an evacuated 100 mL gas bulb by means of a 10 $\mu$ L syringe. The gas bulb was then equilibrated with pure nitrogen. 50  $\mu$ L of the gas mixture were transferred into a Tedlar-bag filled with 1 L of nitrogen. Different concentration levels were prepared by further dilution with nitrogen. For SPME calibration, 15 mL of these gas standards were transferred into evacuated 20 mL headspace vials and pressure was equilibrated with nitrogen. All gas standards were pre-concentrated by means of SPME under the same conditions as the headspace of the feces samples. For NTD calibration 50 mL of gas standard was pre-concentrated on the NTD device similar to sampling of breath gas.

Limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) for SPME-GC-MS and NTME-GC-MS methods were determined by means of the signal to noise ratio. Noise level was determined experimentally from blank samples. LOD was defined as S/N of 3, LOQ as S/N of 10.

**Blood samples.** Blood samples were collected from inoculated and control animals in regular intervals. 20 mL of heparinized blood were collected from each animal in intervals of four weeks until the end of the experiment starting at 4 weeks after inoculation. The serum antibody response was measured with the ID Screen Paratuberculosis Indirect ELISA (ID Vet, Montpellier, France) according to the instructions of the manufacturer. The antibody response was

**Table 2. Retention times, regression coefficients, detection limits and concentration ranges of selected VOC marker substances from breath (a) and feces (b).**

substance	retention time	R <sup>2</sup>	LOD	LOQ	VOC-concentration [ppbV]					
					inoculated animals			non-inoculated animals		
					43 measurements			45 measurements		
					25%	median	75%	25%	median	75%
<b>a) breath</b>	[min]	[/]	[ppbV]		<b>57 measurements</b>			<b>50 measurements</b>		
1-Propanol	9.96	0.976	1.41	3.48	184	258	445	69	214	528
2-Butanone	10.95	0.993	0.19	0.36	0.39	0.54	0.68	0.48	0.67	0.95
Acetone	7.53	0.854	0.25	0.45	22.2	30	38.7	26.7	32.7	38.3
Benzene	12.44	0.994	0.50	1.06	†	0.52	0.64	†	0.58	0.75
Butanal, 2-methyl-	12.99	0.977	0.08	0.11	†	†	0.24	†	0.33	0.57
Ethylbenzene	19.04	0.984	0.11	0.24	†	†	0.13	†	†	0.17
Hexanal	17.5	0.995	0.11	0.28	0.45	0.62	0.91	0.49	0.62	0.81
Nonanal	25.32	0.954	0.40	0.91	1.44	2.02	3.09	1.51	2.27	3.12
Styrene	20.18	0.982	0.02	0.03	0.05	0.09	0.24	0.03	0.06	0.21
<b>b) feces</b>					<b>57 measurements</b>			<b>50 measurements</b>		
Pentane*	13.22	0.999	2.41	11.1	13.5	18.1	23.1	11.8	16.6	21.1
Hexane*	20.58	0.999	4.41	16.3	1.9	10	12.4	†	†	9.4
Heptane*	23.83	0.998	2.64	8.81	7.4	8.9	12.1	6	8.2	10
Acetone*	10.11	0.999	7.06	24.8	613	857	1180	273	379	476
2-Butanone	16.06	1.000	0.43	1.26	53	100	169	46	78	107
2-Pentanone	22.13	0.998	1.69	5.64	278	416	586	192	276	339
2-Hexanone	24.97	0.997	5.39	18.0	117	174	224	59	95	120
2-Heptanone*	26.46	0.999	2.98	9.94	27.4	36.9	46.3	21.5	26	34.2
3-Octanone*	28.36	0.999	22.6	75.5	41.1	58.3	90.6	25.3	51	86.1
2-Butanone, 3-methyl-	21.53	0.997	0.53	1.77	23.8	28.5	36.4	29.1	39.4	72.7
2-Pentanone, 3-methyl-	24.22	0.997	1.79	5.95	24.1	34.1	63.9	13.4	17.9	27.5
Methyl Isobutyl Ketone*	24.00	0.998	1.26	4.19	9.7	13.2	16.9	6	7.8	10.9
Isoprene*	12.63	1.000	1.22	4.65	20	27.2	35.1	4.2	12.5	22.1
Acetic acid, methyl ester*	11.57	0.999	0.29	0.97	42.5	49.6	61.4	45.6	57.1	72.3
Sulfide, dimethyl	10.91	0.997	0.99	3.29	473	869	1316	99	183	360
Disulfide, dimethyl*	22.61	0.993	0.08	0.26	0.5	2	6.5	†	0.4	1.1
Furan*	9.81	0.999	0.10	0.35	1.5	1.8	2.3	1.6	1.9	2.8
Furan, 2-ethyl-*	21.95	0.998	0.19	0.65	8.3	10.1	12.4	4.6	6.1	7.7
Furan, 2-methyl-*	15.82	0.993	9.6	31.8	16.4	20.3	27.6	11.9	14.9	17.2
Furan, 3-methyl-*	16.62	0.996	0.13	0.42	24.1	31.8	40.1	17.3	21	25.6
Furan, 2-pentyl-*	28.40	0.995	4.64	15.5	23.6	28.2	34.5	19.3	24.6	33.2

R<sup>2</sup>—coefficient of determination; LOD—limit of detection; LOQ—limit of quantification

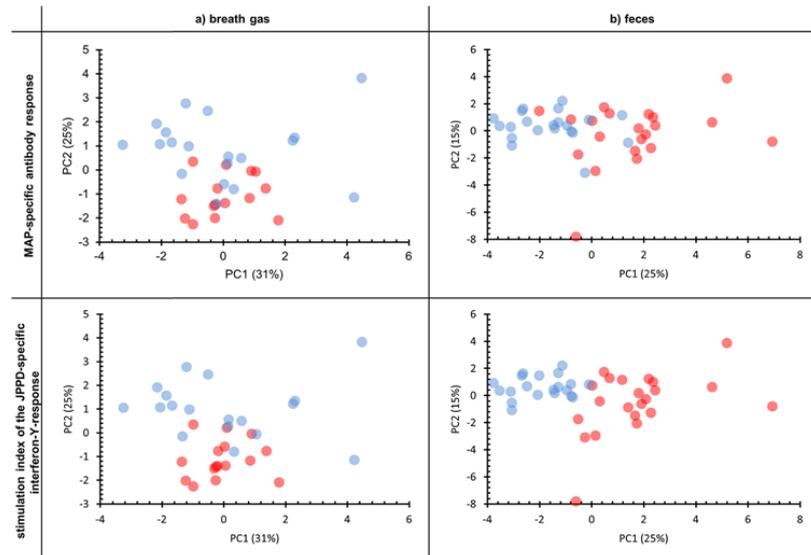
\* potential marker substances from a former in vitro study [9]

† values lower than LOD

doi:10.1371/journal.pone.0123980.t002

demonstrated by the sample-to-positive ratio (S/P %). The interferon- $\gamma$  response after 24 h stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with Johnin purified protein derivative (JPPD, 4  $\mu$ g/mL), was measured with an in-house ELISA based on monoclonal capture and detection antibodies against bovine IFN- $\gamma$  (AbD Serotec, Kidlington, UK).

It was assumed that the non-inoculated control group represented a population whose physiological responses were comparable to natural non-infected animals. Inoculated animals



**Fig 2. PCA-scatterplots of VOC patterns in breath gas (a) and headspace over feces (b) in relation to MAP-specific antibody levels and to the interferon- $\gamma$  response.** Red dots represent S/P-ratios of the antibody-ELISA higher than 51 and stimulation-indices of the interferon- $\gamma$  response higher than 1.157, respectively. The loading plot referring to the PCA results from breath gas is given in [S1 Fig](#) and the loading plot referring to the PCA analysis of results from feces is given in [S2 Fig](#), respectively. Blue dots represent S/P-ratios of the antibody-ELISA lower than 51 and stimulation-indices of the interferon- $\gamma$  response lower than 1.157, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g002

were possibly representing progress of infection. Therefore, cut-off-values with high specificity ( $>99\%$ ), estimated via Receiver-operating-characteristics (= ROC)-analysis, were chosen for both MAP-specific features. These cut-off-values were used for labeling of results in PCA-scatterplots of VOC-measurements which are given in [Fig 2](#).

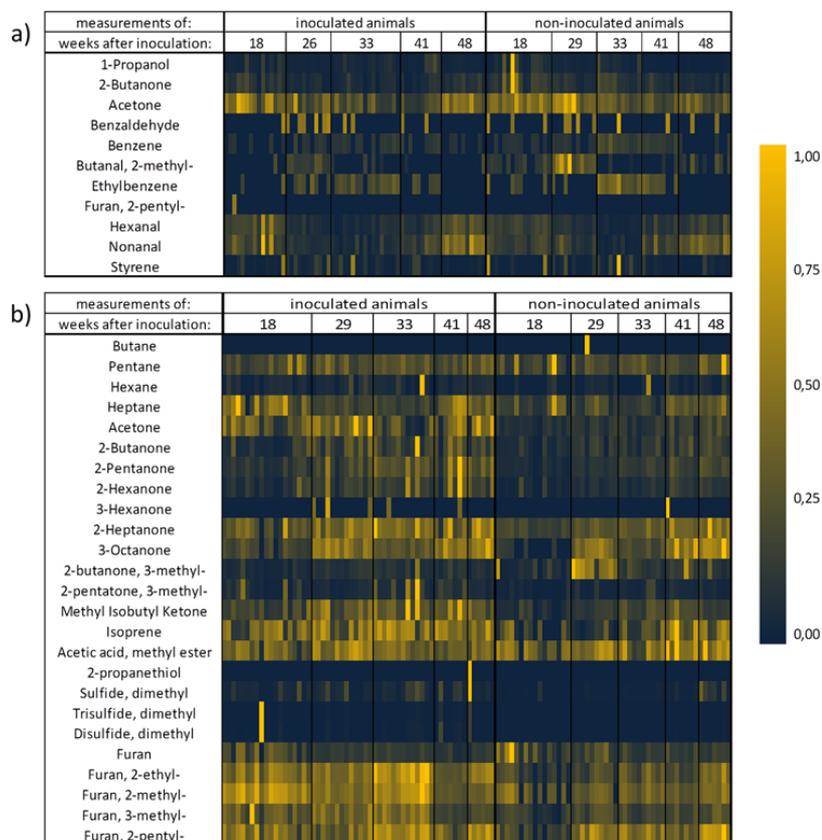
**Statistical methods and visualizations.** For all statistical methods and visualizations only quantified data were used. Visualization of VOC patterns in two-color heat maps was done with substance concentrations normalized by means of the maximum in the data set.

Principle component analyses (PCA) were performed by means of The Unscrambler 9.7 and 10.3 (Camo Software AS). For that purpose, data were normalized onto standard deviations and cross-validation was applied as validation method.

Mann-Whitney-U-tests, t-tests and ROC-analyses were realized by means of Sigmaplot 3.5 as well as SigmaPlot (Version 10.0.0.54; Systat, San Jose, USA). Significance levels were set to  $\alpha = 0.05$ . Values of  $p \geq 0.05$  meant that there were no significant differences between the two tested groups. No significance test was performed if percentiles of regarded groups were lower than LOD. Confidence level for ROC-analysis was set to 99%. In case of normal distribution, t-tests instead of U-tests were performed.

## Results

More than 100 substances could be detected in breath and in feces of the animals by means of GC-MS-analysis. Detection limits in the high pptV- or low ppbV- and linear ranges of two orders of magnitude could be achieved. Twenty eight substances could be identified having



**Fig 3. Heat-map of selected VOCs from breath (a) and feces (b) normalized onto maximum of concentrations.**

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g003

different concentrations in inoculated and non-inoculated animals. VOC marker patterns changed during infection. Fig 3 shows the normalized VOC concentration patterns of all analyzed samples from headspace over feces and from exhaled breath. Although patterns of most prominent substances such as furans, oxygenated substances and hydrocarbons changed in the course of infection, differences between inoculated and non-inoculated animals remained detectable at any time for 16 substances in feces and 3 VOCs in breath. Table 2 shows the selected marker substances together with the detection/quantitation limits of the method and the measured concentration ranges.

### VOC Patterns in Headspace over Feces

Within the group of 25 substances having different concentrations in the inoculated and non-inoculated groups of animals (Fig 3b) butane, 3-hexanone, 2-propanethiol and dimethyltrisulfide were only detected in a few measurements. These substances were, therefore, not introduced into the final marker set.

Table 3. Mann-Whitney-U-tests for analyses from headspace over feces.

Substances:	p-values	Substances:	p-values
Pentane	0.176	Methyl Isobutyl Ketone	<0.001
Hexane	0.003	Isoprene	<0.001*
Heptane	0.022	Acetic acid, methyl ester	0.898
Acetone	<0.001	Sulfide, dimethyl	<0.001
2-Butanone	0.016	Disulfide, dimethyl	<0.001
2-pentanone	<0.001	Furan	0.275
2-hexanone	<0.001	Furan, 2-ethyl-	<0.001
2-heptanone	<0.001	Furan, 2-methyl-	<0.001*
3-Octanone	0.161	Furan, 3-methyl-	<0.001
2-Butanone, 3-methyl-	<0.001	Furan, 2-pentyl-	0.057*
2-Pentanone, 3-methyl-	<0.001		

\*—p-value from t-test

doi:10.1371/journal.pone.0123980.t003

Twenty one substances were identified as potential marker substances in headspace over feces (see also Table 2b). Mann-Whitney-U-tests revealed significant differences in substance concentrations between the inoculated and non-inoculated groups of animals (Table 3).

Concentrations of hexane, heptane, acetone, 2-butanone, 2-pentanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 3-methyl-2-pentanone, methyl isobutyl ketone, isoprene, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide, 2-ethyl-furan, 2-methyl-furan and 3-methyl-furan were significantly higher in headspace over feces of the inoculated group. Significantly lower concentrations for 3-methyl-2-butanone were found in headspace over feces of the inoculated group.

Fig 4 shows scatterplots of the first two principal components of a PCA analysis of the marker sets for inoculated and non-inoculated animals. As shown in Fig 4a discrimination between inoculated and non-inoculated animals is mainly attributed to PC1. The time passed after inoculation had an effect on VOC-patterns (Fig 4b) but did not interfere with the discrimination of inoculated and non-inoculated animals.

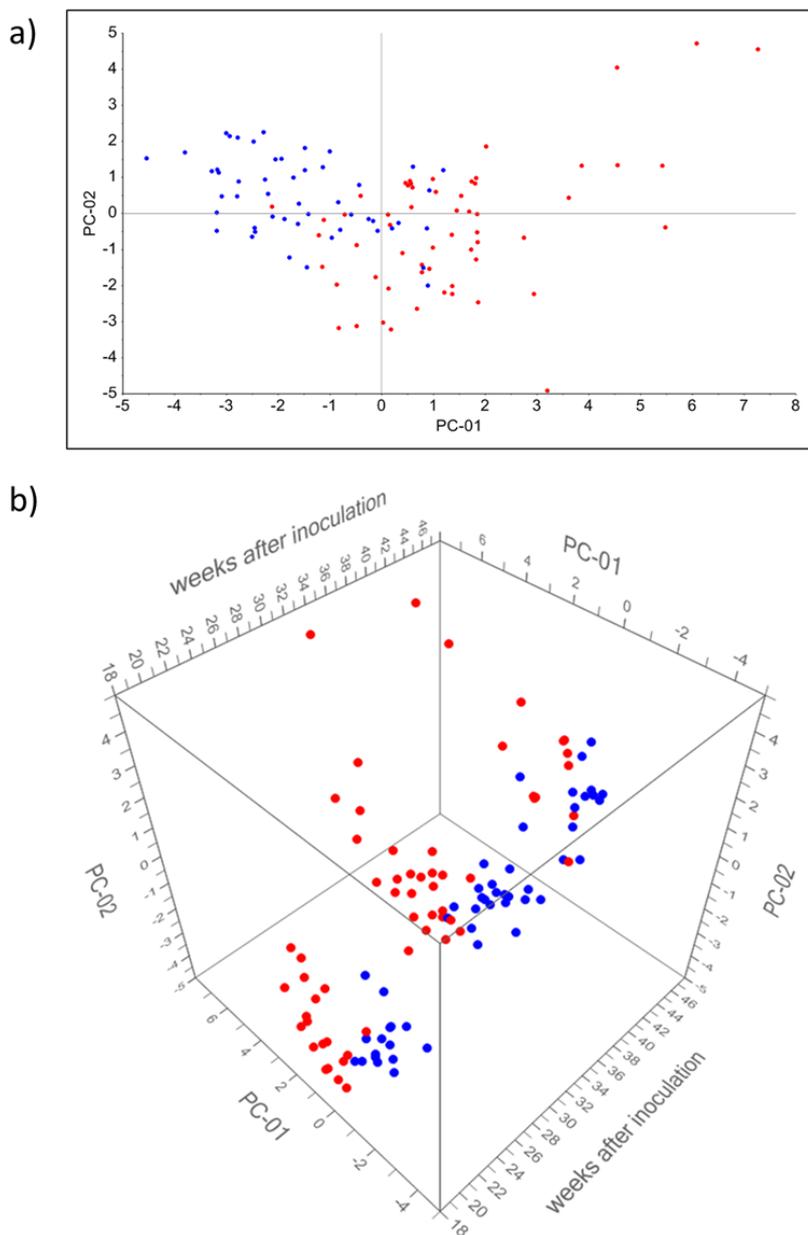
### VOC Patterns in Breath Gas

Within the group of eleven substances having different concentrations in the inoculated and non-inoculated groups of animals (Fig 3a) benzaldehyde and 2-pentyl-furan were only detected in a few measurements. Those substances were, therefore, not introduced into the final marker set.

Nine substances were identified as potential marker substances through NTME-GC/MS analysis of breath gas (see also Table 2a). Mann-Whitney-U-tests revealed significant concentration differences ( $p < 0.05$ ) of three substances between the inoculated and non-inoculated group of animals (Table 4). 2-butanone, benzene and 2-methyl-butanal were higher concentrated in breath gas of the non-inoculated group than in exhaled breath of the inoculated group.

Fig 5 shows scatterplots of a PCA including all identified substances. No discrimination related to PC 1 and PC 3 was found between inoculated and non-inoculated animals (Fig 5a). As seen in Fig 5b the time after inoculation has more effect on PC1 and PC3 than the bacterial status of animals.

Additionally, room air of each stable was sampled for estimation of background contaminations. Fig 6 representatively shows concentrations of 1-propanol in the breath of animals and in the air of the corresponding stables.



**Fig 4. PCA-scatterplots based on VOC-analysis of headspace over feces.** PCA (a) was done for substances (Table 3) having significantly different ( $p < 0.05$ ) concentrations in inoculated and non-inoculated animals. The 3D-scatterplot (b) is derived from the same PCA with respect to weeks after inoculation on the third axis. The loading plot referring to this PCA analysis is given in S3 Fig. Blue dots represent the non-inoculated group. Red dots represent the inoculated group. PC-01 explains 31% and PC-02 explains 16% of variance.

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g004

**Table 4. Mann-Whitney-U-tests for breath gas-measurements.**

Substances	p-values
1-Propanol	0.458
2-Butanone	0.003
Acetone	0.064
Benzene	0.023
Butanal, 2-methyl-	0.002
Ethylbenzene	0.32
Hexanal	0.372
Nonanal	0.881
Styrene	0.649

doi:10.1371/journal.pone.0123980.t004

### Correlation of VOC Patterns with Blood Based Immunological Tests

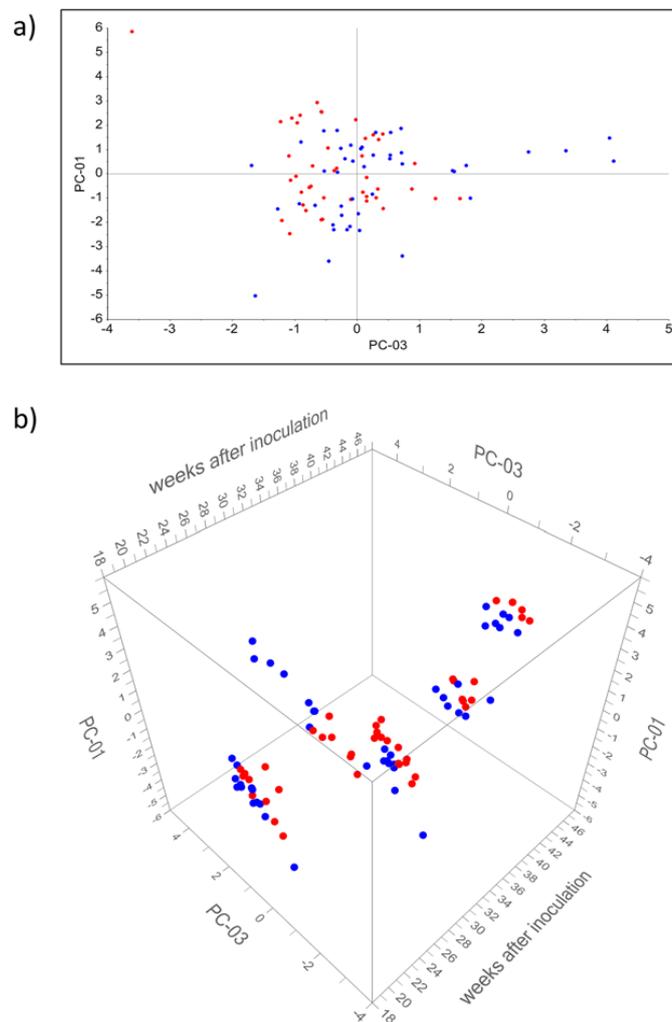
[Fig 2a](#) shows scatterplots of a PCA analysis of breath gas VOC profiles in relation to MAP-specific antibodies and interferon- $\gamma$  response. PC1 explained 31% and PC2 25% of the variance within the data set. According to the loading plot substances such as nonanal, 2-methyl-butanal, ethylbenzene and benzene had the highest impact on PC1. Styrene, benzaldehyde, 1-propanol and 2-butanone showed the highest loadings on PC2. S/P-ratios of antibody titer and stimulation index of interferon- $\gamma$  response were positively correlated to PC 2. No correlation was found to PC 1. [Table 5](#) exhibits that concentrations of 2-butanone, acetone and benzene were significantly higher in animals with lower antibody titers and interferon- $\gamma$  response. Nonanal concentrations were also higher in animals with lower interferon- $\gamma$  response.

PCA scatterplots in [Fig 2b](#) reflect the correlations of VOC profiles from feces and MAP-specific antibodies and interferon- $\gamma$  response. PC1 explained 25% and PC2 15% of the variance within the data set. Loadings of PCA showed that 2-pentanone, 2-hexanone, methyl-isobutyl-ketone, 2-heptanone, 2-butanone, 2-ethyl-furan, 3-methyl-furan had the highest impact on PC1. Dimethylsulfide, dimethyldisulfide, dimethyltrisulfide, 2-methyl-furan and 3-methyl-2-pentanone had the highest impact on PC2. S/P-ratios of antibody titer and stimulation index of interferon- $\gamma$  response were positively correlated to PC 1. No correlation was found between the immunological parameters and PC 2. As seen in [Table 5](#) concentrations of acetone, 2-butanone, 2-pentanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 3-methyl-2-pentanone, methyl isobutyl ketone, isoprene, dimethylsulfide, dimethyldisulfide, 2-ethylfuran, 2-methylfuran and 3-methylfuran were higher in animals with higher antibody titer and stimulation index of interferon- $\gamma$  response.

### Discussion

VOCs from exhaled breath and headspace over feces were analyzed in an animal study in 42 goats. Twenty six animals had been inoculated with MAP 3–4 months before the first measurement and 16 non-inoculated animals served as a control group.

Distinct VOC patterns in breath and feces of infected and healthy animals could be detected by means of adapted microextraction pre-concentration techniques and GC-MS. Twenty eight VOCs were identified as potential volatile biomarkers for MAP infection *in vivo*. Differences of VOC concentrations in the headspace over feces were pronounced and reflected presence of MAP bacteria. Some of these indicative VOCs had also been found in the headspace over MAP cultures in a former *in vitro* study [9]. Differences in VOC profiles from breath were less pronounced as VOC profiles from feces and seemed to be linked to the host response in terms of interferon- $\gamma$  concentrations. Although patterns of most prominent substances such as furans, oxygenated substances and hydrocarbons changed in the course of infection, differences

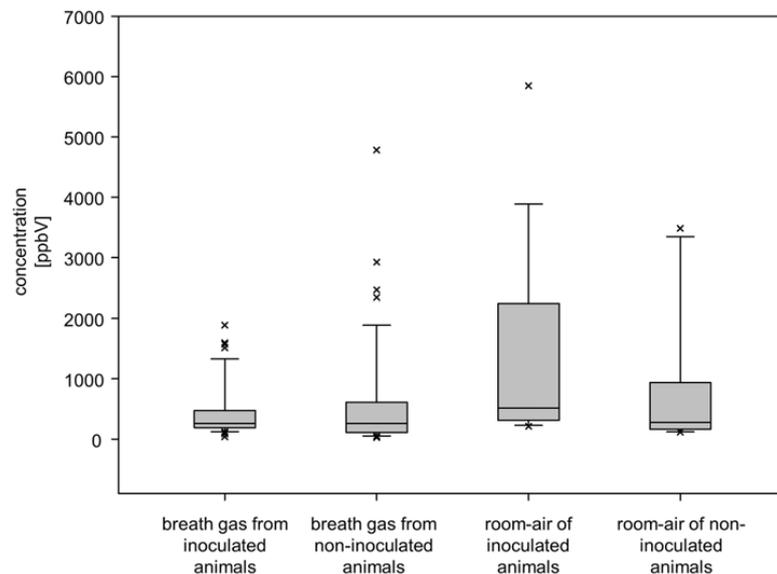


**Fig 5. PCA-scatterplots based on VOC-analysis of breath.** PCA (a) was done for all substances (Table 2) having different concentrations in inoculated and non-inoculated animals. The 3D-scatterplot (b) is derived from the same PCA with respect to weeks after inoculation on the third axes. The loading plot referring to this PCA analysis is given in S4 Fig. Blue dots represent the non-inoculated group. Red dots represent the inoculated group. PC-01 explains 31% and PC-03 explains 15% of variance.

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g005

between inoculated and non-inoculated animals remained detectable for 16 substances in feces but only 3 VOCs in breath.

Unequivocal identification and reliable quantification is mandatory in order to decide which of these volatile emissions [11, 29] can reliably indicate bacterial presence or growth. Hence, in this study, substance identification was confirmed by analysis of pure reference substances and did not solely rely on MS-database (e.g. NIST) search. Any quantification was done through calibration with reference materials.



**Fig 6. Concentration of 1-propanol in breath gas- and room air-samples.**

doi:10.1371/journal.pone.0123980.g006

A previous study based on differential ion-mobility spectrometry (DMS) [8] suggested differences between VOC 'features' in the breath and the headspace over feces from infected and non-infected animals. Due to its principal mode of action DMS is not able to unequivocally identify any substances. As numerous contaminations in order of magnitudes higher concentrations than actual marker substances such as 1-propanol may occur in the *in vivo* setting, results from unspecific methods such as DMS may easily be biased.

In general, volatile metabolites having different concentrations in feces of inoculated and not inoculated animals can be generated by bacteria or the host organism itself. Around 60% of the solid content of feces consists of bacteria [30]. Therefore, samples from feces reflect the composition and activity of the gut microbiota, which comprises the highest quantities of bacteria in the whole body. Thus, analysis of headspace over feces has the potential to provide information on characteristics of the gut microbiota. The presence and metabolism of mycobacteria which do not belong to its physiological components are likely to alter the volatile signature. As a prerequisite for identifying changes in the VOC profile caused by the presence of MAP bacteria, knowledge on commensal bacteria is necessary. In our study, we met this point by measuring a control group of animals bred and living under identical conditions as the inoculated group in a well-established animal model [7].

Concentrations of acetone, 2-butanone, 2-pentanone, 2-hexanone, 2-heptanone, 3-methyl-2-pentanone, methyl isobutyl ketone and isoprene in headspace over feces were constantly higher in the inoculated group. Potential sources of these compounds are MAP metabolism and/or host response to chronic inflammation. Aldehydes and ketones are known to be linked to oxidative or inflammatory activity on the cellular level [6]. On the other hand, mycobacteria have specific cell wall structures which account for many of the unique properties of this bacterial species. Clinically relevant characteristics include resistance to bactericidal effects or functions of the host immune system and low permeability to antibiotics. Mycolic acids represent important components of the cell envelope of mycobacteria. Derivatives of mycolic acids occur

Table 5. VOC-concentration ranges and differences in relation to MAP-specific antibody levels and interferon-γ response after stimulation with JPPD.

a) breath	antibody titer (S/P%)							stimulation-index of the JPPD-specific interferon-γ response								
	≥ 51.02			< 51.02				p	≥ 1.157			< 1.157				
	15			19					16			18				
measurements	percentiles		25%	median	75%	25%	median	75%	p	25%	median	75%	25%	median	75%	p
1-Propanol	182.08	202.26	305.02	221.18	325.37	647.68	<b>0.048</b>	181.29	199.16	279.77	246.43	417.71	669.23	<b>0.01</b>		
2-Butanone	0.34	0.40	0.53	0.61	0.75	1.08	<b>&lt;0.001</b>	0.33	0.41	0.54	0.69	0.76	1.12	<b>&lt;0.001</b>		
Acetone	18.89	24.11	32.66	28.76	32.70	43.21	<b>0.011</b>	18.53	23.32	30.22	32.11	34.34	46.93	<b>&lt;0.001</b>		
Benzene	†	0.55	0.61	0.59	0.70	0.82	<b>0.012</b>	†	0.55	0.64	0.59	0.71	0.93	<b>0.009</b>		
Butanal, 2-methyl-	†	0.32	0.45	†	†	0.85	<b>0.776</b>	†	0.35	0.50	†	†	0.68	<b>0.83</b>		
Ethylbenzene	†	0.12	0.15	†	0.14	0.19	<b>0.211</b>	†	0.11	0.15	†	0.16	0.20	<b>0.084</b>		
Hexanal	0.35	0.41	0.51	0.43	0.50	0.74	<b>0.055</b>	0.36	0.45	0.51	0.37	0.50	0.77	<b>0.128</b>		
Nonanal	1.32	1.46	1.71	1.26	2.05	2.50	<b>0.053</b>	1.30	1.45	1.82	1.29	2.07	2.59	<b>0.047</b>		
Styrene	0.06	0.16	0.49	0.05	0.15	0.63	<b>0.839</b>	0.08	0.19	0.75	0.04	0.10	0.39	<b>0.183</b>		
b) feces	antibody titer (S/P%)							stimulation-index of the JPPD-specific interferon-γ response								
measurements	≥ 51.02			< 51.02				p	≥ 1.157			< 1.157				
	21			21					22			20				
percentiles	25%	median	75%	25%	median	75%	p	25%	median	75%	25%	median	75%	p		
Pentane*	11.45	15.11	20.27	11.43	15.79	20.70	<b>0.839*</b>	12.41	17.67	20.14	11.38	15.54	20.78	<b>0.426*</b>		
Hexane*	†	7.99	11.14	†	†	9.25	<b>0.221*</b>	†	8.12	11.10	†	†	9.15	<b>0.07</b>		
Heptane*	6.85	7.45	9.70	6.66	8.04	9.28	<b>0.94</b>	7.02	7.63	10.62	5.86	7.15	8.75	<b>0.073*</b>		
Acetone*	799.26	1011.08	1305.37	291.71	383.92	501.73	<b>&lt;0.001</b>	744.34	1007.45	1295.41	290.37	370.35	485.57	<b>&lt;0.001</b>		
2-Butanone	87.85	125.45	193.84	47.87	62.05	104.01	<b>0.007</b>	68.67	125.14	191.82	46.50	69.65	104.25	<b>0.012</b>		
2-Pentanone	347.69	476.16	585.54	209.40	280.80	315.93	<b>&lt;0.001</b>	331.36	479.08	573.15	200.64	281.89	315.15	<b>&lt;0.001</b>		
2-Hexanone	139.44	178.42	212.50	61.14	94.08	119.06	<b>&lt;0.001</b>	141.33	178.82	221.09	65.81	91.67	116.33	<b>&lt;0.001</b>		
2-Heptanone*	33.08	38.79	45.64	22.55	26.04	34.42	<b>0.005*</b>	33.68	38.76	45.86	22.96	25.98	33.81	<b>0.005*</b>		
3-Octanone*	47.89	56.37	85.87	36.40	56.19	82.12	<b>0.718*</b>	52.48	59.19	88.40	30.68	49.18	78.29	<b>0.091*</b>		
2-Butanone, 3-methyl-	26.26	32.89	39.74	25.59	36.20	111.90	<b>0.237</b>	26.90	32.65	39.49	23.88	39.79	113.00	<b>0.399</b>		
2-Pentanone, 3-methyl-	26.30	34.37	53.09	16.07	19.41	28.06	<b>&lt;0.001</b>	28.42	35.71	62.36	15.97	18.91	25.10	<b>&lt;0.001</b>		
Methyl Isobutyl Ketone*	11.57	13.51	18.23	6.35	9.00	11.36	<b>&lt;0.001*</b>	12.49	14.64	19.64	6.24	8.76	10.41	<b>&lt;0.001</b>		
Isoprene*	19.87	29.60	37.19	8.92	16.18	22.30	<b>0.009*</b>	24.37	33.72	37.96	6.85	13.58	20.17	<b>&lt;0.001</b>		
Acetic acid, methyl ester*	46.57	55.47	68.61	49.83	56.22	67.18	<b>0.898*</b>	44.16	53.06	67.61	51.26	57.65	67.51	<b>0.494*</b>		
Sulfide, dimethyl	409.76	815.52	1099.63	127.23	184.20	258.03	<b>&lt;0.001</b>	377.90	836.66	1158.19	123.61	182.72	241.42	<b>&lt;0.001</b>		
Disulfide, dimethyl*	0.37	1.12	6.44	†	0.23	0.68	<b>0.005</b>	0.41	1.21	5.72	†	0.22	0.74	<b>0.005</b>		
Furan*	1.46	1.70	1.79	1.52	1.84	3.22	<b>0.208</b>	1.47	1.72	1.99	1.53	1.82	2.94	<b>0.332</b>		
Furan, 2-ethyl-*	7.43	9.96	11.89	5.26	6.63	7.75	<b>&lt;0.001*</b>	7.80	9.97	12.30	5.23	6.40	7.50	<b>&lt;0.001</b>		
Furan, 2-methyl-*	14.72	19.98	23.68	12.41	15.23	17.90	<b>0.046*</b>	15.36	19.78	24.46	12.74	15.15	17.93	<b>0.007*</b>		
Furan, 3-methyl-*	23.41	32.32	41.93	19.33	21.37	25.66	<b>&lt;0.001</b>	27.69	33.00	43.16	18.63	19.96	24.03	<b>&lt;0.001</b>		
Furan, 2-pentyl-*	21.99	29.25	33.91	23.11	26.73	30.05	<b>0.454*</b>	24.74	29.45	34.33	20.85	24.64	28.64	<b>0.099*</b>		

p-values from Mann-Whitney-U-tests

† value lower than limit of detection

\* p-values from t-tests

doi:10.1371/journal.pone.0123980.t005

in significant amounts. Among these compounds are long chain fatty acids, alcohols and ketones [31]. In addition, aldehydes may play a role as intermediates in the biosynthesis of mycobacterial lipid metabolites [32].

Furan derivatives have already been described as metabolites from various microorganisms [29, 33–37]. Mycobacterial surface glycolipids contain D-galactofuran [38] and arabinofuranosyl residues [39]. From these pentose compounds, furfural and furans can be derived. Furans can also be synthesized from acetyl-CoA building blocks [29] or along oxidative degradation of fatty acids. I.e. furans are likely to indicate (myco-)bacterial growth as they mirror cell wall turnover. Since substituted furans can be derived from D-galactofuran or arabinofuranosyl residues, which represent mycobacterial surface structures, these compounds may even be assigned to the growth of distinct mycobacteria. In a recent *in vitro* study we detected concentrations as high as ppmV of 2-methylfuran, 2-ethylfuran and 2-pentylfuran in MAP cultures [9]. Elevated concentrations of 2-ethylfuran, 2-methylfuran and 3-methylfuran in feces of the inoculated animals may thus be attributed to presence and growth of MAP in the gut of these animals.

3-methyl-2-butanone was the only substance having lower concentrations in the inoculated group. This substance is generated during the biosynthesis of fatty acids [29] and, therefore, represents a general marker of (bacterial) growth rather than a bacteria specific substance. Lower quantities of this marker may indicate reduced replication or decreased amounts of overall bacteria (other than MAP) in the inoculated group.

The appearance of higher dimethylsulfide concentrations in MAP-infected animals could be the result of a reduced immune defense which may have affected the composition of the gut microbiota. Ubiquitously distributed Dinoflagellates are microorganisms often associated to human illnesses [40]. Their co-existence with bacteria enables the aerobic degradation of 3-dimethylsulfoniopropionate (3DMSP) to dimethylsulfide [41–43]. 3DMSP is known to be generated from L-methionine from higher plants which, being components of hay, belong to the goat's diet [44]. Direct catabolic degradation of L-methionine to dimethylsulfide by lactic acid bacteria is also probable [45–48].

When animals were grouped according to the immunological host response distinction between groups became more pronounced. Distinction mainly relied on the same substances which had been identified to differentiate between inoculated and non-inoculated animals. This could be due to a higher amount of MAP bacteria in those animals with higher inflammatory immune response. On the other hand, inflammatory response with generation of volatile aldehydes and ketones in the gut might as well have contributed to this effect.

In contrast to VOC patterns from feces, exhaled VOC patterns did not show pronounced differences between healthy and inoculated animals.

From the PCAs it is obvious that the actual immunological response and the age of the animals had a more pronounced effect on exhaled VOC profiles than the inoculation with MAP bacteria. Surprisingly, concentrations of differentiating VOCs were consistently higher in the group of animals with lower antibody ratios and lower interferon- $\gamma$  responses. This was true for oxygenated substances related to lipid peroxidation or metabolic stress, such as aldehydes or ketones, as well as for substances typically related to environmental effects, such as benzene.

When compared to our recent *in vitro* results, 15 substances from the bacterial *in vitro* pattern could be found in the headspace of feces, but only 5 substances were detectable in the breath of the animals [9]. VOCs produced by MAP in the gut are likely to be metabolized in the liver when they enter systemic circulation via the portal vein. I.e. concentrations of reactive substances such as unsaturated hydrocarbons, aldehydes, ketones or furans potentially synthesized by MAP in the gut will be vanishingly low in breath. These results demonstrate that a direct transfer from *in vitro* biomarker to *in vivo* conditions [24, 25] is not possible and that physiology and metabolism must be taken into account.

Apart from bacterial presence and immunological response other factors including physiology, age and nutrition may influence VOC-patterns. The influence of nutrition was minimized, as the study started only after the transition from milk to plant feeding was completed and all animals received identical diet. Nevertheless the age of the animals between 21 and 55 weeks of life had a distinct effect on VOC-patterns. Although VOC profiles from feces changed markedly over time, distinction between inoculated and non-inoculated animals was still possible at every time point.

## Conclusion

VOC concentrations in the headspace over feces showed differences between infected and healthy animals. Discriminating VOCs could be linked to MAP membrane structures and metabolism. Differences in VOC profiles from breath were less pronounced and seemed to be linked to the host response. Transfer of results from *in vitro* VOC studies to *in vivo* conditions need careful consideration of related biochemistry, physiology and potential confounding parameters. Concentrations patterns of volatile marker substances determined from feces and breath changed in the course of infection. Nevertheless, differences between inoculated and non-inoculated animals remained detectable at any time. In a perspective, VOC profiles from feces may be used to recognize mycobacterial presence in the gut of ruminants.

## Supporting Information

**S1 Fig. Loading-plot referring to PCA-analysis of breath gas samples in relation to blood tests (Fig 2a).**

(TIF)

**S2 Fig. Loading-plot referring to PCA-analysis of feces samples in relation to blood tests (Fig 2b).**

(TIF)

**S3 Fig. Loading-plot referring to PCA-analysis of feces samples (Fig 4).**

(TIF)

**S4 Fig. Loading-plot referring to PCA-analysis of breath gas samples (Fig 5).**

(TIF)

## Acknowledgments

Credit is due to assistances of laboratory and animals attendants from FLI Jena for continuous support and warm help. The authors are thankful to Mr. Dietmar Hein from PAS-technologies for continuous support, useful inventions and help in handling technological problems. Also great thanks to all involved members from ROMBAT breath research team in Rostock.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PR WM HK JS. Performed the experiments: KK PT GW WM HK AB. Analyzed the data: PT AB GW SF HK WM PR KK MS MZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: PR JS HK WM. Wrote the paper: AB PT JS SF MS MZ HK WM PR.

## References

1. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 1999; 40(3–4):179–92. PMID: [10423771](#)

2. Grant IR. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of applied microbiology*. 2005; 98(6):1282–93. Epub 2005/05/27. PMID: [15916642](#)
3. Mendoza JL, Lana R, Diaz-Rubio M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2009; 15(4):417–22. Epub 2009/01/20. PMID: [19152445](#)
4. Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(12):3883–90. Epub 2007/10/05. PMID: [17913930](#)
5. Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, McCallum RW. Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? *Critical reviews in microbiology*. 2012; 38(1):52–93. Epub 2012/01/17. doi: [10.3109/1040841X.2011.638273](#) PMID: [22242906](#)
6. Miekisch W, Trefz P, Bergmann A, Schubert JK. Microextraction techniques in breath biomarker analysis. *Bioanalysis*. 2014; 6(9):1275–91. PMID: [25077354](#)
7. Kruger C, Kohler H, Liebler-Tenorio EM. Sequential Development of Lesions 3, 6, 9, and 12 Months After Experimental Infection of Goat Kids With *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology Online*. 2014:1–15.
8. Purkhart R, Kohler H, Liebler-Tenorio E, Meyer M, Becher G, Kikowitz A, et al. Chronic intestinal Mycobacteria infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *Journal of breath research*. 2011; 5(2):027103. Epub 2011/04/23. doi: [10.1088/1752-7155/5/2/027103](#) PMID: [21512209](#)
9. Trefz P, Koehler H, Klepek K, Moebius P, Reinhold P, Schubert JK, et al. Volatile emissions from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mirror bacterial growth and enable distinction of different strains. *PLoS one*. 2013; 8(10):e76868. doi: [10.1371/journal.pone.0076868](#) PMID: [24116177](#)
10. Sevilla IA, Garrido JM, Molina E, Geijo MV, Elguezabal N, Vazquez P, et al. Development and Evaluation of a Novel Multicopy-Element-Targeting Triplex PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Feces. *Appl Environ Microbiol*. 2014; 80(12):3757–68. doi: [10.1128/AEM.01026-14](#) PMID: [24727272](#)
11. Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS pathogens*. 2013; 9(5):e1003311. Epub 2013/05/16. doi: [10.1371/journal.ppat.1003311](#) PMID: [23675295](#)
12. Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, White P, Spencer R, Probert CS, et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007; 21(8):1675–88. Epub 2007/02/23. PMID: [17314143](#)
13. Garner CE, Smith S, Bardhan PK, Ratcliffe NM, Probert CS. A pilot study of faecal volatile organic compounds in faeces from cholera patients in Bangladesh to determine their utility in disease diagnosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 103(11):1171–3. Epub 2009/03/10. doi: [10.1016/j.trstmh.2009.02.004](#) PMID: [19268999](#)
14. Ahmed I, Greenwood R, Costello Bde L, Ratcliffe NM, Probert CS. An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome. *PLoS one*. 2013; 8(3):e58204. Epub 2013/03/22. doi: [10.1371/journal.pone.0058204](#) PMID: [23516449](#)
15. De Preter V, Van Staeyen G, Esser D, Rutgeerts P, Verbeke K. Development of a screening method to determine the pattern of fermentation metabolites in faecal samples using on-line purge-and-trap gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of chromatography A*. 2009; 1216(9):1476–83. Epub 2009/01/27. doi: [10.1016/j.chroma.2008.12.095](#) PMID: [19167006](#)
16. Tait E, Hill KA, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Development of a novel method for detection of *Clostridium difficile* using HS-SPME-GC-MS. *Journal of applied microbiology*. 2014; 116(4):1010–9. Epub 2013/12/11. doi: [10.1111/jam.12418](#) PMID: [24320174](#)
17. Probert CS, Jones PR, Ratcliffe NM. A novel method for rapidly diagnosing the causes of diarrhoea. *Gut*. 2004; 53(1):58–61. Epub 2003/12/20. PMID: [14684577](#)
18. Walton C, Fowler DP, Turner C, Jia W, Whitehead RN, Griffiths L, et al. Analysis of volatile organic compounds of bacterial origin in chronic gastrointestinal diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2013; 19(10):2069–78. Epub 2013/07/23. doi: [10.1097/MIB.0b013e31829a91f6](#) PMID: [23867873](#)
19. Syhre M, Manning L, Phuanukoannon S, Harino P, Chambers ST. The scent of *Mycobacterium tuberculosis*—Part II breath. *Tuberculosis*. 2009; 89(4):263–6. doi: [10.1016/j.tube.2009.04.003](#) PMID: [19481976](#)
20. Phillips M, Cataneo RN, Condos R, Ring Erickson GA, Greenberg J, La Bombardi V, et al. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007; 87(1):44–52. Epub 2006/04/26. PMID: [16635588](#)

21. Knobloch HK, Commander N, Reinhold P, Turner C., Chambers M. Volatile Organic Compound (VOC) Analysis For Disease Detection: Proof Of Principle For Field Studies Detecting Paratuberculosis And Brucellosis. Olfaction and Electronic Nose: Proceedings of the 13th International Symposium, edited by Pardo M and Sberveglieri G, American Institutes of Physics. 2009; CP1137:195–7.
22. Proudman CJ, Hunter JO, Darby AC, Escalona EE, Batty C, Turner C. Characterisation of the faecal metabolome and microbiome of Thoroughbred racehorses. *Equine veterinary journal*. 2014.
23. Saito Y, Ueta I, Kotera K, Ogawa M, Wada H, Jinno K. In-needle extraction device designed for gas chromatographic analysis of volatile organic compounds. *Journal of chromatography A*. 2006; 1106(1–2):190–5. Epub 2006/01/31. PMID: [16443461](#)
24. Pereira SP, Khin Maung U, Duncombe VM, Bolin TD, Linklater JM. Comparison of an in vitro faecal hydrogen test with the lactulose breath test: assessment of in vivo hydrogen-producing capability in Burmese village children. *Annals of tropical paediatrics*. 1992; 12(2):177–83. PMID: [1381894](#)
25. Zhu J, Bean HD, Wargo MJ, Leclair LW, Hill JE. Detecting bacterial lung infections: in vivo evaluation of in vitro volatile fingerprints. *Journal of breath research*. 2013; 7(1):016003. doi: [10.1088/1752-7155/7/1/016003](#) PMID: [23307645](#)
26. Trefz P, Rosner L, Hein D, Schubert JK, Miekisch W. Evaluation of needle trap micro-extraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405:3105–15. Epub 2013/02/08. doi: [10.1007/s00216-013-6781-9](#) PMID: [23388692](#)
27. Mieth M, Schubert JK, Groger T, Sabel B, Kischkel S, Fuchs P, et al. Automated needle trap heart-cut GC/MS and needle trap comprehensive two-dimensional GC/TOF-MS for breath gas analysis in the clinical environment. *Analytical chemistry*. 2010; 82(6):2541–51. Epub 2010/02/23. doi: [10.1021/ac100061k](#) PMID: [20170082](#)
28. Mieth M, Kischkel S, Schubert JK, Hein D, Miekisch W. Multibed needle trap devices for on site sampling and preconcentration of volatile breath biomarkers. *Analytical chemistry*. 2009; 81(14):5851–7. Epub 2009/06/25. doi: [10.1021/ac9009269](#) PMID: [19548667](#)
29. Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep*. 2007; 24(4):814–42. PMID: [17653361](#)
30. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003; 361(9356):512–9. PMID: [12583961](#)
31. Rafidinarivo E, Laneelle MA, Montrozier H, Valero-Guillen P, Astola J, Luquin M, et al. Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. *J Lipid Res*. 2009; 50(3):477–90. doi: [10.1194/jlr.M800384-JLR200](#) PMID: [18772482](#)
32. Chhabra A, Haque AS, Pal RK, Goyal A, Rai R, Joshi S, et al. Nonprocessive [2+2]e(-) off-loading reductase domains from mycobacterial nonribosomal peptide synthetases. *P Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(15):5681–6. doi: [10.1073/pnas.1118680109](#) PMID: [22451903](#)
33. Borjesson T, Stollman U, Schnurer J. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(8):2599–605. Epub 1992/08/01. PMID: [1514807](#)
34. Dickschat JS, Wenzel SC, Bode HB, Muller R, Schulz S. Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *Chembiochem*. 2004; 5(6):778–87. Epub 2004/06/03. PMID: [15174160](#)
35. Pollak FC, Berger RG. Geosmin and Related Volatiles in Bioreactor-Cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62(4):1295–9. Epub 1996/04/01. PMID: [16535293](#)
36. Scholler CE, Gurtler H, Pedersen R, Molin S, Wilkins K. Volatile metabolites from actinomycetes. *J Agric Food Chem*. 2002; 50(9):2615–21. Epub 2002/04/18. PMID: [11958631](#)
37. Schulz S, Fuhlendorff J, Reichenbach H. Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron*. 2004; 60(17):3863–72.
38. Dhiman RK, Dinadayala P, Ryan GJ, Lenaerts AJ, Schenkel AR, Crick DC. Lipoarabinomannan localization and abundance during growth of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. 2011; 193(20):5802–9. Epub 2011/08/16. doi: [10.1128/JB.05299-11](#) PMID: [21840972](#)
39. Appelmelk BJ, den Dunnen J, Driessen NN, Ummels R, Pak M, Nigou J, et al. The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the Mycobacterium-host interaction. *Cellular microbiology*. 2008; 10(4):930–44. Epub 2007/12/12. PMID: [18070119](#)
40. Miller TR, Belas R. *Pfiesteria piscicida*, *P. shumwayae*, and other *Pfiesteria*-like dinoflagellates. *Research in microbiology*. 2003; 154(2):85–90. PMID: [12648722](#)
41. Kiene RP. Dimethyl sulfide production from dimethylsulfoniopropionate in coastal seawater samples and bacterial cultures. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56(11):3292–7. PMID: [16348336](#)
42. Kiene RP, Malloy KD, Taylor BF. Sulfur-containing amino acids as precursors of thiols in anoxic coastal sediments. *Appl Environ Microbiol*. 1990; 56(1):156–61. PMID: [16348088](#)

43. Taylor BF, Gilchrist DC. New routes for aerobic biodegradation of dimethylsulphonioacetate. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(12):3581–4. PMID: [16348607](#)
44. Otte ML, Wilson G, Morris JT, Moran BM. Dimethylsulphonioacetate (DMSA) and related compounds in higher plants. *Journal of experimental botany.* 2004; 55(404):1919–25. PMID: [15181109](#)
45. Bonnarne P, Pisoni L, Spinnler HE. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(12):5514–7. PMID: [11097940](#)
46. Dias B, Weimer B. Purification and characterization of L-methionine gamma-lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(9):3327–31. PMID: [9726878](#)
47. Dias B, Weimer B. Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(9):3320–6. PMID: [9726877](#)
48. Hanniffy SB, Pelaez C, Martinez-Bartolome MA, Requena T, Martinez-Cuesta MC. Key enzymes involved in methionine catabolism by cheese lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology.* 2009; 135(3):223–30. doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.009](#) PMID: [19733414](#)

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

#### Literaturübersicht

Abb. 1:	Modell beeinflussender Prozesse und Faktoren auf volatile organische Substanzen (volatile organic compounds, VOCs) im Makroorganismus .....	9
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines physiologischen Kapnogramms und der CO <sub>2</sub> -kontrollierten Atemgasprobenahme (modifiziert nach Miekisch <i>et al.</i> , 2004 ) .....	11

#### Eigene Untersuchungen

Abb. 3:	Das automatisierte Needle Trap Mikroextraktions (NTME)-Probenahmesystem. ....	19
Abb. 4:	Schematische Übersicht über den Versuchsablauf (STUDIE 1).....	20
Abb. 5:	Design der Probenahme für eine Messkampagne (STUDIE 2).....	21

#### Publikationen

<b>STUDIE I</b>	<b>Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model</b>	
Figure 1:	In the large-animal model, young, healthy goats were observed during the first year of their life .....	27
Figure 2:	Automatic, CO <sub>2</sub> -controlled sampling of exhaled breath in goats performed by means of needle-trap microextraction (NTME).....	27
Figure 3:	Physiological data of healthy goats within their first year of life ( <i>n</i> =15).....	29
Figure 4:	Heat map of VOCs assessed in (a) headspace above faecal samples and (b) exhaled breath of healthy goats presenting significant changes within the first year of life.....	31
Figure 5:	Relationships between concentrations of (a) 3-hexanone, (b) dimethylsulfide, and (c) 3-methylfuran in the headspace above faeces and concentrations of glucose and albumin in peripheral venous blood of healthy goats.....	34
Figure 6:	Relationships between concentrations of nonanal in exhaled breath and concentrations of glucose and/or albumin, respectively, in peripheral venous blood of healthy goats .....	38

**STUDIE II: Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model**

Figure 1: Schematic representation of the experimental design of the collection of VOCs from exhaled breath in each single animal .....45

Figure 2: Concentration courses of selected volatile organic compounds in exhaled breath of healthy goats (n=9) before and after food intake .....49

Figure 3: Concentration courses of selected volatile organic compounds in exhaled breath of healthy goats (n=9) before and 60 min after food intake at the two different measurement campaigns.....49

**10.2 Abbildungsverzeichnis des Anhangs**

**STUDIE AI: *In vivo* volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

Figure 1: Experimental set up for alveolar breath sampling in goats ..... 100

Figure 2: PCA-scatterplots of VOC patterns in breath gas (a) and headspace over feces (b) in relation to MAP-specific antibody levels and to the interferon- $\gamma$  response..... 103

Figure 3: Heat-map of selected VOCs from breath (a) and feces (b) normalized onto maximum of concentrations..... 104

Figure 4: PCA-scatterplots based on VOC-analysis of headspace over feces ..... 106

Figure 5: PCA-scatterplots based on VOC-analysis of breath ..... 108

Figure 6: Concentration of 1-propanol in breath gas- and room air-samples..... 109

**10.3 Tabellenverzeichnis**

**Literaturübersicht**

Tab. 1: Übersicht über bereits durchgeführte Studien zur Nutzung von VOCs zur Diagnostik von Erkrankungen bei Wiederkäuern..... 14

**Publikationen**

**STUDIE I: Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model**

Table 1: Concentrations of VOCs assessed in the headspace above faeces.....30

Table 2: Concentrations of VOCs assessed in the exhaled breath... .....32

Table 3: Multiple interactions between VOCs assessed in headspaces above faeces or exhaled breath, respectively, and blood components in healthy goats... .....35

Table 4:	Regressions between VOCs assessed in headspaces above faeces or exhaled breath, respectively, and blood concentrations of glucose in healthy goats... ..	36
Table 5:	Regressions between VOCs assessed in headspaces above faeces or exhaled breath, respectively, and blood concentrations of proteins in healthy goats... ..	37
Table 6:	Comparison of VOCs in exhaled breath and in room air.....	39

**STUDIE II: Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model**

Table 1:	Schedule for collection of VOCs from exhaled breath of healthy goats (n=9) and from room air at one measurement campaign .....	45
Table 2:	Analytical features of reference substances used for quantification of selected VOCs.....	46
Table 3:	Comparison of concentrations of selected VOCs in exhaled breath of healthy goats and in room air.....	47
Table 4:	Concentrations of VOCs assessed in exhaled breath of healthy goats before and after food intake in the morning.....	48
Table 5:	Effects of different factors on exhaled VOC concentrations.....	49

**10.4 Tabellenverzeichnis des Anhangs**

**STUDIE AI: *In vivo* volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

Table 1:	Overview of breath gas samples (b) and feces samples (f) taken from goats .....	99
Table 2:	Retention times, regression coefficients, detection limits and concentration ranges of selected VOC marker substances from breath (a) and feces (b).....	102
Table 3:	Mann-Whitney-U-tests for analyses from headspace over feces.....	105
Table 4:	Mann-Whitney-U-tests for breath gas-measurements .....	107
Table 5:	VOC-concentration ranges and differences in relation to MAP-specific antibody levels and interferon- $\gamma$ -response after stimulation with JPPD.....	110

## 11 Publikationsverzeichnis

### 11.1 Publikationen mit Peer-Review-Verfahren

Bergmann, A.; Trefz, P.; **Fischer, S.**; Klepik, K.; Walter, G.; Steffens, M.; Ziller, M.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H.; Miekisch, W. (2015):  
*In vivo* volatile organic compound signatures of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

PLoS One 10 (4): e0123980. DOI: 10.1371/journal.pone.0123980.

**Fischer, S.**; Trefz, P.; Bergmann, A.; Steffens, M.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):

Physiological variability in volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath and released from faeces due to nutrition and somatic growth in a standardized caprine animal model.

J Breath Res 9 (2): 027108. DOI: 10.1088/1752-7155/9/2/027108.

*Journal Impact Factor (2014): 4,631.*

**Fischer, S.**; Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, P.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):

Impact of food intake on *in vivo* VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model.

J Breath Res 9 (4): 047113. DOI: 10.1088/1752-7155/9/4/047113.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. (2016):

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

J Breath Res 10 (3): 037103. DOI: 10.1088/1752-7155/10/3/037103.

*Aufnahme in die „Highlights of 2016 collection“ des Journal of Breath Research.*

Kasbohm, E.; **Fischer, S.**; Küntzel, A.; Oertel, P.; Bergmann, A.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Ziller, M.; Fröhlich, A.; Liebscher, V.; Köhler, H. (2017):

Strategies for the identification of disease biomarkers in samples of volatile organic compounds: Prediction of paratuberculosis using random forests.

J Breath Res 11 (4): 047105. DOI: 10.1088/1752-7163/aa83bb.

*Aufnahme in die „Highlights of 2017 collection“ des Journal of Breath Research.*

Redlberger, S.; **Fischer, S.**; Köhler, H.; Diller, R.; Reinhold, P. (2017):  
Age-dependent physiological dynamics in acid-base balance, electrolytes, and blood  
metabolites in growing goats.

Vet J 229. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.10.017.

Küntzel, A.; Oertel, P.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Trefz, P.; Schubert, J. K.; Miekisch, W.;  
Reinhold, P.; Köhler, H. (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.

Oertel, P.; Bergmann, A.; **Fischer, S.**; Trefz, P.; Küntzel, A.; Reinhold, P.; Köhler, H.;  
Schubert, J. K.; Miekisch, W. (2018):

Evaluation of needle trap- and solid phase micro-extraction: obtaining comprehensive  
information on volatile emissions of *in vitro* cultures.

Biomed Chromatogr e4285. DOI: 10.1002/bmc.4285.

## 11.2 Publierte Abstracts

**Fischer, S.**; Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, M.; Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Köhler,  
H.; Reinhold, P. (2013):

Determination of volatile organic compounds and their potential as a novel diagnostic tool for  
bacterial infection.

Proceedings of the Second Junior Scientist Symposium of the Friedrich-Loeffler-Institut,  
August 21–24, 2013, Jena (Germany), *Poster*.

**Fischer, S.**; Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Köhler,  
H.; Reinhold, P. (2013):

Flüchtige organische Substanzen von Erreger und Wirt als Biomarker zur Diagnostik der  
Paratuberkulose.

Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung „Physiologie und Biochemie“, 13.-15. Februar  
2014, Zürich (Schweiz), *Vortrag*.

Bergmann, A.; Trefz, P.; Rösner, L.; Klepik, K.; **Fischer, S.**; Walter, G.; Steffens, M.;  
Reinhold, P.; Köhler, H.; Schubert, J. K.; Miekisch, W. (2014):

*In vivo* detection of volatile organic compounds for identification of *Mycobacterium avium*  
subsp. *paratuberculosis* in goats.

Proceedings of the Pittsburgh Conference & Exhibition (Pittcon), March 2-6, 2014, Chicago  
(USA), *Poster*.

Zigan, A.; **Fischer, S.**; Schinköthe, J.; Reinhold, P.; Liebler-Tenorio, E.; Köhler, H. (2014): Gamma-interferon release from PBMC of goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP).

Proceedings of 12<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis (ICP), Parma (Italy), June 22-26, 2014, *Poster*.

**Fischer, S.**; Bergmann, A.; Trefz, P.; Klepik, K.; Steffens, M.; Ziller, M.; Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2014):

Impact of nutrition and metabolic effects on *in vivo* VOC profiles in breath and faeces of young, healthy goats.

Proceedings of the Breath Analysis 2014 - 9<sup>th</sup> International Conference on Breath Research & Cancer Diagnosis, July 06-09, 2014, Torun (Poland), *Poster*.

*Auszeichnung mit dem Preis für das beste wissenschaftliche Poster.*

**Fischer, S.**; Trefz, P.; Bergmann, A.; Klepik, K.; Steffens, M.; Ziller, M.; Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2014):

Impact of nutrition and metabolic effects on VOC profiles in breath and faeces of young, healthy goats.

Proceedings of the Third Junior Scientist Symposium of the Friedrich-Loeffler-Institut, August 19–22, 2014, Mariensee (Germany), *Poster*.

Steffens, M.; Bergmann, A.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Köhler, H.; Schubert, J.K.; Miekisch, W. (2015):

Micro-extraction-techniques (-GC-MS) for detection of VOC-patterns emitted from mycobacterial cultures.

Proceedings of the Pittsburgh Conference & Exhibition (Pittcon), March 8-12, 2015, Chicago (USA), *Vortrag*.

**Fischer, S.**; Trefz, P.; Bergmann, A.; Steffens, M.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):

Flüchtige organische Substanzen im Atemgas: Methodische Einflüsse und biologische Variabilität potentieller Biomarker (Modelltier Ziege).

Abstracts zum 18. Workshop des DVG-Arbeitskreises „Respiratorisches System“ in Kooperation mit dem 56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. (DGP), 18. März 2015, Berlin (Deutschland), *Vortrag*.

*Pneumologie* **69** (06): A14. DOI: 10.1055/s-00000059.

Schinköthe, J.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Köhler, H.; Liebler-Tenorio, E. (2015):  
Granulomatöse Enteritis und Lymphadenitis nach experimenteller Infektion von Ziegen mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.  
Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung „Krankheiten kleiner Wiederkäuer“, 19.-20. Mai 2015, Triesdorf (Deutschland), *Vortrag*.

**Fischer, S.**; Trefz, P.; Bergmann, Steffens, M.; Ziller, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2015):  
Altersabhängige Entwicklung von Biomarkern in Blut, Ausatemluft und Kot bei gesunden Ziegen.  
Tagungsbroschüre der internationalen Tagung „Zukunft gestalten - 40 Jahre Präventivmedizin“, 19.-20. Juni, 2015, Leipzig (Deutschland), *Vortrag*.

Köhler, H.; Zigan, A.; Schinköthe, J.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Möbius, P.; Liebler-Tenorio, E.M. (2015):  
Comparative analysis of systemic and local host-responses against MAP and MAH in an experimental goat model.  
Proceedings of the European Symposium on Non-Tuberculosis Mycobacteria, 24.-27. Juni 2015, Borstel (Deutschland), *Poster*.

Liebler-Tenorio, E.M.; Schinköthe, J.; Möbius, P.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Köhler H. (2015):  
Unusual outcome of an experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.  
Proceedings of the European Symposium on Non-Tuberculosis Mycobacteria, 24.-27. Juni 2015, Borstel (Deutschland), *Poster*.

**Fischer, S.**; Bergmann, A.; K.; Steffens, M.; Ziller, M.; Trefz, P.; Schubert, J. K.; Miekisch, W.; Köhler, H.; Reinhold, P. (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, September 14-16, 2015, Vienna (Austria), *Poster*.  
*Auszeichnung mit dem Preis für das beste wissenschaftliche Poster.*

Köhler, H.; Zigan, A.; Schinköthe, J.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Möbius, P.; Liebler-Tenorio, E. M. (2015):

Comparative analysis of *Mycobacterium (M.) avium*-complex (MAC) infections in a goat model.

Proceedings of the National Symposium on Zoonoses Research 2015, October 15-16, 2015, Berlin (Deutschland), *Vortrag*.

Schinköthe, J.; **Fischer, S.**; Reinhold, P.; Möbius, P.; Köhler, H.; Liebler-Tenorio E. M. (2015):

Different disease outcomes in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) and their potential relevance for zoonotic infection.

Proceedings of the National Symposium on Zoonoses Research 2015, October 15-16, 2015, Berlin (Deutschland), *Poster*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Trefz, P.; Steffens, M.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Köhler, H.; Reinhold, P. (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), 2. März 2016, Leipzig (Deutschland), *Vortrag*.

*Pneumologie* **70** (07): A7. DOI: 10.1055/s-0036-1584383.

Redlberger, S.; **Fischer, S.**; Köhler, H.; Reinhold, P. (2016):

Acid-base variables in healthy goats and in goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung “Physiologie und Biochemie”, 30. März – 01. April 2016, Berlin (Deutschland), *Vortrag*.

Vater, E.; **Fischer, S.**; Köhler, H.; Rothe, M.; Reinhold, P. (2016):

Eicosanoide als potentielle Biomarker in der Pathophysiologie der Paratuberkulose.

Tagungsband der DVG-Fachgruppentagung “Physiologie und Biochemie”, 30. März – 01. April 2016, Berlin (Deutschland), *Poster*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Köhler, H.; Reinhold, P. (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 (Deutschland), *Poster*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. (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),  
June 20-24, 2016, Nantes (France), *Poster*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. (2016):

Kinetics of volatile organic compounds from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* indicate bacterial growth.

Proceedings of the International Association for Breath Research (IABR) Summit 2016,  
September 14–16, 2016, Zürich (Switzerland), *Vortrag*.

Kasbohm, E.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J.; Reinhold, P.; Köhler, H.; Fröhlich, A.; Liebscher, V. (2016):

Repeated cross-validation with embedded feature selection promotes identification of potential biomarkers for paratuberculosis.

Proceedings of the International Association for Breath Research (IABR) Summit 2016,  
September 14–16, 2016, Zürich (Switzerland), *Poster*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. (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,  
September 21-23, 2016, Jena (Deutschland), *Vortrag*.

Oertel, P.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Küntzel, A.; Reinhold, P.; Köhler, H.; Schubert, J. S.; Miekisch, W. (2017):

Evaluation of SPME and NTME for VOC profiling in bacterial cultures.

Proceedings of the Pittcon Conference,

March 05–09, 2017, Atlanta (USA), *Vortrag*.

Küntzel, A.; **Fischer, S.**; Bergmann, A.; Oertel, P.; Steffens, M.; Trefz, P.; Miekisch, W.; Schubert, J. K.; Reinhold, P.; Köhler, H. (2017):

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

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

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

## 12 Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer und herzlicher Dank Frau Prof. Dr. Petra Reinhold für die Bereitstellung des interessanten Themas und die exzellente fachliche Betreuung. Für die vielen Anregungen, Ermunterungen und die jederzeit gewährte fachliche und persönliche Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren danke ich herzlich Frau Dr. Heike Köhler für die Betreuung der Laborarbeiten sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die stets angenehme Zusammenarbeit. Ein besonderes Dankeschön an Sandy Werner für die engagierte Einarbeitung in diverse Methoden und manch freundschaftliches Gespräch.

Dem ROMBAT-Team in Rostock danke ich für die freundliche Aufnahme und die gewährte fachliche und organisatorische Unterstützung bei der Umsetzung des Projektes. Mein besonderer Dank gilt Dr. Wolfram Miekisch, Dr. Andreas Bergmann und Dr. Phillip Trefz für die konstruktive Zusammenarbeit.

Bei Dr. Ziller bedanke ich mich für die geduldige Zusammenarbeit und die exzellente statistische Beratung. Dem gesamten Team des Tierhauses danke ich für die sorgfältige Betreuung der Tiere, die Einsatzbereitschaft und die kooperative und stets fröhliche Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön gilt Annelie Langenberg, Sylke Stahlberg und Ines Lemser für die Vorbereitung und technische Unterstützung bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Proben.

Prof. Dr. Elisabeth Liebler-Tenorio und ihrer Arbeitsgruppe danke ich für die Durchführung und Auswertung der pathologischen Untersuchungen. Bei Maria-Christina Haase bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Literaturbeschaffung. Wolfram Maginot danke ich für die Aufnahme und Bearbeitung der Fotos.

Mein Dankeschön gilt außerdem Herrn Dietmar Hein von PAS Technology für die Beratung und Unterstützung bei technischen Fragestellungen und für die schnell bereitgestellte Hilfe.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für den freundlichen Umgang und die nette Atmosphäre. Allen Mitdoktoranden am Institut gilt ein herzliches Dankeschön für den Erfahrungsaustausch und so manche fröhliche Stunden. Ich bedanke mich für diese unvergessliche Zeit und die daraus entstandenen Freundschaften.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und die bedingungslose Unterstützung. Fiete danke ich dafür, dass er mich in allen Lebenslagen zum Lachen bringt und mir immer wieder zeigt, was im Leben von Bedeutung ist.

### **13 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 15.05.2018

Sina Fischer









