



Paratuberkulose beim Rind – Morbus Crohn beim Menschen:

ein ursächlicher Zusammenhang?

Interdisziplinäre Arbeitsgruppe des LGL

Prof. Dr. M. Büttner

Dr. H. Gerbermann

Dr. L. Naumann

Dr. E. Neuendorf

PD Dr. Dr. H. Rinder

PD Dr. M. Wildner

Dr. A. Zapf



Kontakt:

www.lgl.bayern.de

09131/764-0

poststelle@lgl.bayern.de

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung

- 1. Einleitung**
- 2. Johne'sche Krankheit/Paratuberkulose**
 - 2.1. Historie
 - 2.2. Ätiologie
 - 2.3. Pathogenese der Paratuberkulose
 - 2.4. Tenazität des Erregers
 - 2.5. Zeitlicher Ablauf der Paratuberkulose
- 3. Diagnose der Paratuberkulose**
 - 3.1. Direkter MAP-Nachweis
 - 3.2. Indirekter Infektionsnachweis
 - 3.3. Schlussfolgerung
- 4. Therapie der Paratuberkulose und Impfung**
- 5. Epidemiologie der Paratuberkulose**
 - 5.1. Epidemiologie weltweit
 - 5.2. Deutschland
 - 5.3. Bayern
 - 5.4. Schlussfolgerung
- 6. Bekämpfung der Paratuberkulose und Sanierungsmaßnahmen**
 - 6.1. Wirtschaftliche Bedeutung der Erkrankung
 - 6.2. Sanierungsverfahren in anderen Ländern
 - 6.3. Situation in Deutschland
 - 6.4. Schlussfolgerung
- 7. Nachweis von MAP in Milch und Käse**
 - 7.1. MAP in der Milch
 - 7.2. MAP in Käse
 - 7.3. MAP in Handelsmilch
 - 7.4. Schlussfolgerung
- 8. Krankheitsbild des Morbus Crohn beim Menschen und Inzidenz in Deutschland**
- 9. Hypothesen zum Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und MAP: gegenwärtiger Stand der Forschung**
 - 9.1. Hypothesen zur möglichen Rolle von MAP bei der Entstehung von Morbus Crohn
 - 9.2. Bisherige Untersuchungen
 - 9.3. Fallberichte und Fall-Kontroll-Studien
 - 9.4. Kohorten-, Follow-up- und Therapie-Studien
 - 9.5. Aktuelle Untersuchungen
 - 9.6. Stellungnahmen verschiedener Expertenkommissionen
 - 9.7. Zusammenfassende Bewertung
- 10. Einschätzung der Notwendigkeit weiterer Studien**
 - 10.1. Studien zur Evaluierung und Validierung der Nachweismethoden von MAP beim Menschen und beim Tier
 - 10.2. Prävalenzstudien zum Vorkommen von Morbus Crohn beim Menschen und Paratuberkulose bei Tieren in Deutschland
 - 10.3. Studien zur Eingrenzung von Risikofaktoren
 - 10.4. Doppelblinde, randomisierte, kontrollierte Therapiestudien
 - 10.5. Molekularbiologischer Vergleich von MAP-Stämmen, die von Wiederkäuern und vom Menschen isoliert wurden
- 11. Fazit und Empfehlung des LGL**

Zusammenfassung

Die Paratuberkulose der Wiederkäuer (Johne'sche Krankheit) ist eine infektiöse, chronische Durchfallerkrankung hervorgerufen durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), die weltweit vorkommt. Der Erreger wird in großen Mengen mit dem Kot eines MAP infizierten Tieres ausgeschieden, besitzt eine hohe Tenazität und kommt ubiquitär vor. Der kulturelle Nachweis von MAP ist langwierig, indirekte Diagnostikmethoden sind nur bedingt aussagekräftig. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden einschließlich neuer molekularbiologischer Ansätze sind Prävalenzschätzungen beim Tier möglich. Die Aussagekraft von Diagnostika zum Einsatz für eine flächendeckende Überwachung wird derzeit vom deutschen Referenzzentrum überprüft. Bekämpfungsprogramme zur Vermeidung von wirtschaftlichen Schäden basieren in erster Linie auf Hygienemaßnahmen und erfordern ein jahrelanges konsequentes Vorgehen.

Milch und Milchprodukte gelten als mögliche Expositionsquelle für den Menschen. Zur Ermittlung der tatsächlichen Exposition wurde Handelsmilch untersucht. In Großbritannien und den USA konnte in pasteurisierter Milch MAP nachgewiesen werden, in einer neueren irischen Studie jedoch nicht. Eine erhebliche Reduzierung vermehrungsfähiger MAP findet durch den Pasteurisierungsprozess statt. Informationen über das MAP-Vorkommen in deutscher Handelsmilch sind nicht publiziert.

Im Gegensatz zu Wiederkäuern erkranken Menschen nicht an der Johne'schen Krankheit. Ein Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn (MC), einer chronische Darmentzündung des Menschen, wird seit einer Veröffentlichung im Jahr 1913 diskutiert (Dalziel, 1913). Die Übersicht der interdisziplinären Arbeitsgruppe des LGL analysiert wissenschaftliche Daten über den Erreger, das Krankheitsbild von Morbus Crohn und Paratuberkulose und das Vorkommen von MAP in Milch und Käse. Trotz zahlreicher epidemiologischer Untersuchungen, die in diesem Bericht bewertet werden, konnte eine kausale Rolle von MAP in der Ätiologie von MC nicht bewiesen werden. Vielmehr sind die Studien eher mit einer sekundären Darmbesiedelung mit MAP aufgrund der Vorschädigung durch die MC-Erkrankung vereinbar. Daher ist aus ähnlich angelegten epidemiologischen Studien zum jetzigen Stand der Wissenschaft kein valides Ergebnis zu erwarten. Allenfalls aus größer angelegten, methodisch stringenten Studien auf der Basis verlässlicher diagnostischer Verfahren wäre ein Erkenntnisgewinn möglich. Die Erfolgsaussichten sind jedoch schwer abschätzbar.

Das LGL unterstützt die Meinung internationaler Expertengruppen und eine jüngste Studie des Robert Koch-Instituts und des Bundesinstituts für Risikobewertung und kommt zu dem Schluss, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Paratuberkulose des Rindes und MC beim Menschen auf dem derzeitigen Stand der Wissenschaft nicht bewiesen ist.

1. Einleitung

Morbus Crohn (**MC**) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Verdauungstraktes. Die Erkrankung kann an jeder Stelle zwischen Mund und Anus vorkommen, in der Regel treten aber die Läsionen im terminalen Ileum und proximalen Kolon auf. Ein Zusammenhang zwischen MC und *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (**MAP**) wird seit der Veröffentlichung vom Thomas Kennedy Dalziel im Jahre 1913 (British Medical Journal) immer wieder diskutiert (Artikel in *Lancet* vom 18. Sept. 2004 mit Korrespondenz Dez. 2004). Die Abbildung 1 nach Chacon et al. (2004) zeigt, wie MAP möglicherweise vom Tier zum Menschen gelangen kann.

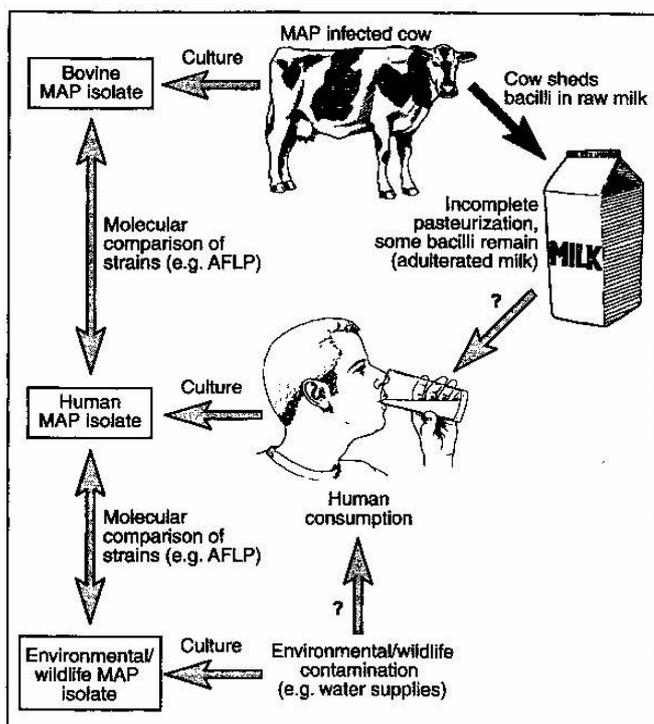


Abb. 1: Mögliche Quellen für eine Exposition des Menschen mit MAP

2. Johne'sche Krankheit / Paratuberkulose

Die Paratuberkulose, auch Johne'sche Krankheit genannt, ist eine durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufene, in Deutschland meldepflichtige Tierkrankheit der Wiederkäuer. Primär empfängliche Tierarten sind Rind, Schaf, Ziege und andere Wiederkäuer sowie Kamele.

2.1. Historie

Das klinische und pathologisch-anatomische Bild der Paratuberkulose ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts als chronische Enteritis mit ausgeprägten Veränderungen der Darmschleimhaut bekannt. Johne und Frothingham konnten im veränderten Gewebe säurefeste Stäbchenbakterien nachweisen und beschrieben diese Erkrankung erstmals 1895 als eigentümlichen Fall von Tuberkulose bei einem Rind. Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Eigenschaften des Erregers und der unterschiedlichen Art und Manifestation der pathologischen Veränderungen schlug Bang im Jahr 1906 vor, die Krankheit von der Tuberkulose abzutrennen. Seither gilt die Paratuberkulose der Wiederkäuer als eigenständige Erkrankung. 1910/1912 veröffentlichte Twort erstmals die Isolierung und Anzüchtung des Erregers. 1933 gelang schließlich die experimentelle Infektion einer Herde mit MAP. Damit waren die Henle-Koch'schen Postulate erfüllt und der wissenschaftliche Beweis geführt, dass MAP die monokausale Ursache der Paratuberkulose der Wiederkäuer darstellt.

2.2. Ätiologie

- Erreger

Mykobakterien (*Mycobacteriaceae*) sind Gram positive Mikroorganismen, die mehr als 100 Spezies umfassen. Sie vermehren sich primär intrazellulär und sind charakterisiert durch ihre Säurestabilität und ihre stark lipidhaltige Zellwand. *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (MAV) und *M. intracellulare* sind seit langer Zeit als opportunistische Keime bei Patienten mit chronischen Krankheiten des Respirationstraktes bekannt. In neuerer Zeit wurden diese auch als bedeutende opportunistische Pathogene bei immunsupprimierten, speziell bei AIDS Patienten, gefunden. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist klar abgrenzbar von *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. MAP ist die Subspezies mit der langsamsten Vermehrungsrate mit einer Generationszeit von über 20 Stunden, abhängig von der primär vorhandenen Bakterienzahl. MAP ist die einzige Subspezies, deren Wachstum abhängig ist von dem Siderophor Mycobaktin, speziell wenn Primärkulturen aus tierischem Gewebe gewonnen werden sollen. MAP ist der monokausale Erreger der Johne'schen Krankheit und erfüllt damit die Henle-Koch'schen Postulate für die Infektion der Wiederkäuer.

- MAP-Isolate von Mensch und Tier

Der Grad der Variabilität der MAP Isolate von Mensch und Tier ähnelt der Situation mit MAV. Mit modernen molekularbiologischen Methoden wie dem Restriktionsenzym Fragmentlängen Polymorphismus (RFLP) wurden drei Muster erstellt: Isolate vom Schaf (Muster A), Isolate vom Rind (Muster B) oder von Ziegen (Muster C).

Mit Hilfe von Multiplex-PCR unter Einbeziehung der IS900 Loci und Amplifikatfragment Längen Polymorphismus (AFLP) wurden Isolate vom Tier (n=203) und vom Menschen (n=7) verglichen. Dabei ließen sich Isolate vom Rind in Gruppen hoher genetischer Ähnlichkeit zusammenfassen, wogegen Schaf- und Humanisolate ein höheres Maß an Variabilität aufwiesen.

Die mit dieser Methode gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass die Genome der humanen Isolate sich vom Genom der Rinderisolate unterscheiden. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl der humanen Isolate lassen sich die genetischen Zuordnungen jedoch nicht abschließend beurteilen.

- MAP Genom

Das komplette Genom von MAP (4,38 Mb) aus einem typischen bovinen Typ II Stamm (MAP K-10) aus einer Kuh mit Johnes'scher Krankheit wurde kürzlich in USA sequenziert (Accession No. AE01958). Der Sequenzvergleich zwischen MAP und MAV war hiermit möglich und ergab einen hohen Homologiegrad von >97 %. Der Genombereich, der als IS900 Element bezeichnet wird, scheint einzigartig für MAP zu sein und wird allgemein als diagnostisches Werkzeug zum MAP Nachweis in klinischen Proben benutzt (siehe Antigene und Virulenzfaktoren und 3.1. Direkter Erregernachweis).

- Antigene und Virulenzfaktoren

Ein Hauptantigen von MAP ist das Lipoarabino-Mannan (LAM), das in vielen serologischen Testsystemen zum Nachweis von MAP-Antikörpern genutzt wird. Diverse immunreaktive Proteine haben Homologien zu anderen mykobakteriellen Antigenen (u. a. hoch konservierte Hitzeschockproteine). Ein dominantes Antigen, das die humorale Immunantwort induziert, ist das 34 kDa Zellwandantigen. Das MAP Antigen p26 wurde als Indikator für MAP Infektionen im Bezug auf die Seroreaktivität von Morbus Crohn Patienten dargestellt. Durch die vorhandene Sequenzinformation für dieses Antigen konnte aber sein Vorkommen bei allen *M. avium* Spezies bewiesen werden. Unklar ist in dieser Situation, ob MAP dieses Antigen in größeren Mengen produzieren als andere Subspezies. IS900 kodierte Proteine gelten als MAP spezifisch. Ein in größeren Mengen vom IS900-Lokus kodiertes Protein wird als Hed (host expression-dependent)-Protein bezeichnet..

Bisher sind nur wenige Virulenzfaktoren von MAP beschrieben. Die Haftung und Internalisierung von MAP an der Darmschleimhaut scheint durch ein Fibronektin bindendes Protein vermittelt zu werden. Ein weiteres Protein aus der Membran von MAP (35 kDa), das mit Seren von Rindern, die an Johne'scher Krankheit leiden reagiert, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Invasion boviner Epithelzellen.

2.3. Pathogenese der Paratuberkulose

Der Erreger wird direkt (fäkal-oral; oral über Kolostrum; intrauterin) und indirekt über kotkontaminiertes Futter, Wasser, Weiden etc. übertragen. Auch in Sperma konnte der Erreger nachgewiesen werden.

85 % der Tiere infizieren sich in den ersten Lebenswochen, 10 % intrauterin und 5 % innerhalb des ersten Lebensjahres. In der Regel findet die Infektion innerhalb der ersten 30 Lebenstage statt, danach entwickelt sich eine zunehmende Altersresistenz. Eine Infektion ist jedoch auch im späteren Lebensalter möglich, verläuft dann aber weniger gravierend. Als Hauptübertragungsweg wird die fäkal-orale Infektion angesehen. Kälber infizieren sich über kotverschmutzte Zitzen, direkt oder indirekt kontaminiertes Kolostrum, ältere Tiere über kontaminiertes Futter, Weiden oder Wasser. Die Inkubationszeit beträgt 2 - 10 Jahre. Die Tiere erkranken schließlich an einer chronisch verlaufenden, nicht therapierbaren Durchfallerkrankung, die zu Kachexie und Tod führt. Der Verlauf der Erkrankung ist chronisch intermittierend. Da infizierte Tiere lange keine Symptome zeigen, bleibt die Erkrankung lange unentdeckt. Die Erregerausscheidung beginnt jedoch schon vor dem Auftreten klinischer Symptome. Deshalb spielen nicht nur klinisch kranke Tiere, sondern auch besonders Tiere in der fortgeschrittenen subklinischen Phase eine wichtige Rolle als Überträger. Whitlock und Buergelt beschrieben 1996, dass ein klinisch erkranktes Tier lediglich die Spitze des Eisberges darstellt und pro klinisch erkranktem Tier mit weiteren 16 - 25 infizierten Tieren im Bestand gerechnet werden muss. Die intermittierende Ausscheidung des Erregers bei subklinisch infizierten Rindern wird als Hauptgrund für die Erhaltung der Infektion in der Herde angesehen. Während ein Tier mit klinischer Symptomatik 100 Millionen Erreger pro Gramm Kot ausscheidet, liegt die Ausscheidungsrate bei subklinisch infizierten Tieren bei 10^1 - 10^2 Erreger pro Gramm Kot. Als infektiöse Dosis für ein Kalb werden in der Literatur 10.000 Erreger genannt.

2.4. Tenazität des Erregers

Die Zellwandstruktur verleiht dem Erreger eine hohe Widerstandsfähigkeit. Die Überlebensdauer im Boden beträgt bis zu elf Monate. Die Überlebensfähigkeit in fließendem Gewässer wird mit bis zu 163 Tage angegeben. In stehendem Gewässer war der Erreger

noch nach 270 Tagen nachweisbar. Neben der hohen Tenazität in der Umwelt ist die Thermostabilität bedeutsam. Nach einer Lagerung bei Temperaturen von -14 °C war der kulturelle Nachweis auch nach zwölf Monaten noch möglich. Auch gelang es nach Pasteurisierung vermehrungsfähiges MAP in Milch nachzuweisen (siehe unter 7. Nachweis von MAP in Milch und Käse).

2.5. Zeitlicher Ablauf der Paratuberkulose

Das Krankheitsgeschehen kann in vier Phasen unterteilt werden, die sich immunologisch, klinisch und pathomorphologisch unterscheiden:

- a. Stilles Infektionsstadium
- b. Subklinisches Stadium
- c. Klinisches Stadium
- d. Endstadium

a. Stilles Infektionsstadium

Nach der oralen Aufnahme gelangt MAP in den Magen-Darmtrakt und wird zur Überwindung der gastrointestinalen Barriere von M-Zellen ins Darmepithel transportiert. Hier erfolgt die Aufnahme und der Transport des Erregers in die Peyerschen Platten des Darmes. Der Erreger wird durch Phagozytose von intra- und subepithelialen Makrophagen aufgenommen, persistiert in den Phagosomen und entzieht sich so intrazellulär dem direkten Zugriff des humoralen Immunsystems und der Nachweisbarkeit. Die Immunantwort ist zu diesem Zeitpunkt zellvermittelt. Das infizierte Tier zeigt keine Klinik. Pathohistologisch sind frühestens nach ca. vier Wochen erste diffuse Zellinfiltrationen nachweisbar. Die typischen Infiltrationen von Epitheloidzellen und Langhans' Riesenzellen sind nach ca. vier Monaten nachzuweisen. Mikroskopisch sind in Darmmaterial säurefeste Bakterien nachzuweisen und MAP lässt sich anzüchten. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion wird der Erreger nicht oder nur unterhalb der Nachweisgrenze ausgeschieden.

b. Subklinisches Stadium

Werden die von Makrophagen aufgenommenen Bakterien nicht gehemmt oder zerstört, erfolgt die intrazelluläre Vermehrung mit anschließendem Zelltod und Freisetzung der Erreger in das umliegende Gewebe und in das Darmlumen. Mit der Freisetzung von MAP schaltet sich die humorale Abwehr ein. Das infizierte Tier zeigt keine Klinik. Pathomorphologisch kommt es zu einer gering bis mittelgradigen Schleimhauthypertrophie und Vergrößerung der Mesenteriallymphknoten mit Infiltration epitheloider Zellen, Langhans' Riesenzellen und schaumig erscheinenden Makrophagen mit phagozytierten säurefesten Stäbchen.

c./d. Klinisches Stadium und Endstadium

Die Inkubationszeit liegt zwischen 2 - 10 Jahren. In der Regel erkranken Tiere im Alter zwischen 3 - 6 Jahren. Die klinische Symptomatik kann mehrere Monate mit Intervallen der Besserung andauern. Zunächst herrschen unspezifische Symptome vor: bei Milchkühen sinkt die Milchleistung um 10 - 20 %, die Tier magern trotz guter Futteraufnahme ab, und das Geburtsgewicht der Kälber ist vermindert. Als Auslöser des Ausbruches werden Stressfaktoren wie Abkalbungen genannt. Schließlich tritt lang anhaltender, stinkend schaumiger Durchfall auf, die Milchleistung kommt zum Erliegen. Paratuberkulose verläuft ohne Fieber. Die intermittierenden Durchfälle sind weder durch Antibiotika noch durch Antiparasitika zu beeinflussen. Pathologisch-anatomisch liegt eine hochgradige Schleimhauthypertrophie vor mit hirnwindungs-ähnlicher Darmstruktur und hochgradiger Schwellung der Mesenteriallymphknoten. Das histologische Bild ist geprägt von einer granulomatösen Entzündung, die sich bis in die Submucosa ausbreitet. Die Lamina propria ist erheblich entzündet, transmurale Prozesse kommen vor, sind aber selten. Die histologischen Veränderungen sind als Tuberkel angeordnet oder diffus in Schleimhaut und Lymphknoten verteilt. Betroffen sind im wesentlichen nur der hintere Dünndarm (Ileum, Jejunum), teilweise auch das Kolon. Auch in Leber und Lunge können Veränderungen zu finden sein. Fisteln, Fissuren oder ähnliches werden nicht beschrieben. In der klinischen Phase ist ein Antikörpernachweis möglich. Im finalen Stadium nimmt die humorale Immunantwort dann jedoch ab bis zur Anergie: ein serologischer Nachweis kann negativ sein. In diesem Stadium wird der Erreger hochgradig ausgeschieden.

Die Abbildung 2 nach Chacon et al. (2004) zeigt vergleichend die Darmschädigung bei ulzerativer Colitits, Morbus Crohn und Johne'scher Krankheit des Rindes. Die Darmveränderungen von MC und der Johne'schen Krankheit weisen Ähnlichkeiten auf.

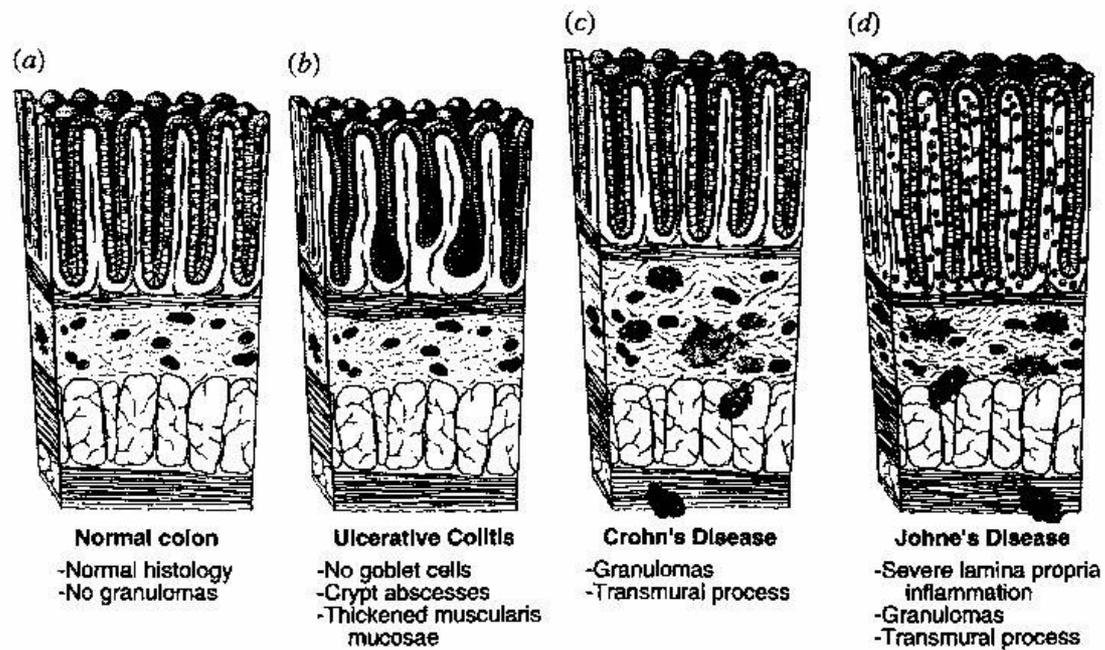


Abb. 2: Vergleichende schematische Darstellung der Darmveränderungen bei ulzerativer Colitis, Morbus Crohn und Johne'scher Krankheit des Rindes

3. Diagnose der Paratuberkulose

In der mikrobiologischen Diagnostik wird zwischen direktem und indirektem Erregernachweis unterschieden. Letzterer stützt sich auf spezifische Immunreaktionen, die nach Erregerkontakt (Exposition, Infektion, Immunisierung) auftreten. Alle diagnostischen Verfahren sollten in ihrer Spezifität (sog. Treffsicherheit - Wahrscheinlichkeit der Erkennung eines nichtinfizierten Tieres als negativ) und Sensitivität (Empfindlichkeit der Messung - Wahrscheinlichkeit der Erkennung eines infizierten Tieres als positiv) definiert sein.

3.1. Direkter MAP-Nachweis

- Kultureller Erregernachweis

Als Goldstandard gilt der kulturelle Erregernachweis (gilt als 100 % spezifisch, aber nur ca. 35 % sensitiv), der aber durch das langsame Wachstum von MAP den enormen Nachteil einer Zeitdauer von 8 - 12 Wochen hat. Allerdings kann im positiven Fall die Aussage des Vorliegens vermehrungsfähiger MAP getroffen werden. Die Auswertung der kulturellen Anzucht erfolgt lichtmikroskopisch nach der Ziehl-Neelsen Färbung als säurefeste Stäbchen. Dieses hoch spezifische Verfahren erfasst MAP i. d. R. nur bei hoher Erregerdichte in Probenmaterial von klinisch erkrankten Tieren, nicht bei subklinisch infizierten Tieren (geringe Sensitivität). Die Wachstumsabhängigkeit von MAP von der

Präsenz des Mykobaktin ist zu berücksichtigen, speziell wenn Primärkulturen aus tierischem Gewebe gewonnen werden sollen (siehe 2.2. Ätiologie). Im Falle der Rohmilchuntersuchungen war die Anwendung von HEYM Schrägagar sensitiver als die Anzuchtversuche in BACTEC-Kulturen, was auf mögliche negative Einflüsse durch den empfohlenen Zusatz von PANTA Antibiotikum zurückgeführt wird. Mehr oder weniger stark mit sonstigen Bakterien kontaminierte Substrate (Fezes, Rohmilch) müssen zur weitgehenden Abtötung dieser Keime vorbehandelt werden, dabei hat sich nach einer neueren Studie (Glanemann et al., 2004) NaOH/Oxalsäure am besten bewährt. Bei massiven Ausscheidern können Erreger ohne vorherige Isolierung direkt im Kotpräparat nach Ziehl-Neelsen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.

- Antigen-Nachweis

Die Problematik kreuzreaktiver Antigene innerhalb der Mykobakterien hat selbst bei der Herstellung monoklonaler Antikörper noch nicht zu verwertbaren und robusten MAP spezifischen Antigenfänger Tests geführt. Im Western Blot Verfahren können die verschiedenen Proteine von MAP differenziert werden, was u. a. zur Identifizierung des mycobakteriellen Proteins HupB geführt hat, das mit IgA Antikörpern aus dem Darm von CD Patienten reagiert und evtl. zur Aufrechterhaltung des chronisch entzündlichen Prozesses beiträgt. Ein Rückschluss auf MAP als krankheitsauslösendes Agens von MC lässt sich aus dieser Beobachtung jedoch nicht ableiten. Die tatsächliche Bedeutung bakterieller Untereinheiten und deren potentielle_ Beteiligung an der MC-Chronizität ist noch nicht geklärt und erfordert noch fundierte wissenschaftliche Arbeit.

- DNA-Nachweis

Molekularbiologische Methoden zum Genomnachweis von Erregern sind mittlerweile speziell durch den Einsatz der Polymerase Kettenreaktion (PCR) etabliert und weit verbreitet. Sie haben den Vorteil des schnellen Ergebniserhalts (24 - 48h), aber den Nachteil, dass keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit des Erregers gemacht werden kann. Der am häufigsten in der molekularen MAP Diagnostik genutzte Genomabschnitt ist IS900 (siehe 2.2. Ätiologie, MAP Genom bzw. Antigene und Virulenzfaktoren), aus dem Fragmente mit Hilfe gezielt selektierter Primer in nested PCR Protokollen amplifiziert werden. Zur molekularen Untersuchung von Proben mit hohem Verdünnungsfaktor für MAP (u. a. Fezes, Milch) hat sich ein Anreicherungsverfahren mit antikörperbeschichteten, supermagnetischen Fängerpartikeln (beads), gefolgt von hoch sensitiven PCR Verfahren wie real-time PCR (IMS-PCR) bewährt. Dieses Vorgehen soll eine Nachweissensitivität in Milch von einer Kolonien bildenden Einheit (KbE) pro 50 ml haben. Eine weitere MAP Kombinations-

Nachweisstrategie ist die Anreicherung von MAP mit Hilfe paramagnetischer Partikel, die mit einem *M. paratuberculosis* spezifischen Peptid gekoppelt sind, ebenfalls gefolgt von einer PCR zum Nachweis des Insertionselements ISMav2. Weitergehende molekularbiologische Nachweisverfahren sind der Restriktionsenzym Fragmentlängen Polymorphismus (RFLP), Hybridisierungen zur Feststellung von Sequenz-unterschieden innerhalb der *M. avium* Subspezies und gezielte Genomabschnitt-Sequenzierungen. Bedeutend sind die Unterschiede in der Sensitivität des kulturellen Nachweises zu molekularen Methoden wie IMS-PCR in direkten Vergleichsstudien, u. a. bei Milchuntersuchungen, die deutlich zeigten, dass der PCR-Nachweis mehr positive Ergebnisse liefert, damit aber die Wirkung der Hitzebehandlung auf die Vermehrungsfähigkeit von MAP indirekt evident wurde. Derzeit evaluiert das Nationale Referenzzentrum für Mykobakterien in Jena, Arbeitsgruppe Dr. Möbius, die in Deutschland etablierten PCR-Methoden. Ende der Studie soll voraussichtlich Ende April 2005 sein.

3.2. Indirekter Infektionsnachweis

- Zelluläre Immunantwort

Als indirekte Nachweismethoden einer stattgefundenen Infektion mit MAP (zugelassene Impfstoffe gibt es in Deutschland nicht) kommen die sog. zelluläre Immunantwort und die humorale Immunantwort als Antikörpernachweis in Frage. In Analogie zur äußerst erfolgreichen Bekämpfung der Tuberkulose (Tuberkulintest) wurde als in vivo Nachweis spezifischer zellulärer Immunantwort gegen MAP auch der Intrakutantest als sog. „Johnin“ Test angewandt. Er hat aber eine geringe Spezifität und ist deshalb als alleinige Methode für Bekämpfungsprogramme kaum nutzbar. Als Alternative zum in vivo Nachweis der zellvermittelten Immunität wurde die in vitro Interferon-gamma Sekretion spezifisch restimulierter Leukozyten eingesetzt. Diesem als Kit vermarkteten Test wird eine Spezifität von 66 - 67 % zugesprochen. Letztlich scheint nur die Kombination von Hauttest und Interferon-gamma Nachweis sinnvoll, weil dann mit Tieren, die tatsächlich MAP infiziert sind eine Spezifität von 97,6 % erzielt wird. Ein wichtiger Einflussfaktor für beide Tests ist die Variabilität der Antigenchargen.

- Humorale Immunantwort

Serologische Tests basieren auf dem Nachweis MAP spezifischer Antikörper, z. Z. überwiegend als Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA). In Deutschland sind momentan vier kommerzielle ELISA zum Antikörpernachweis zugelassen. Alle Tests weisen eine eingeschränkte Sensitivität auf. In den Studien des Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. (TGD) zur Prävalenz seropositiver Rinder in Bayern wurde deshalb die Strategie einer

kombinierten Untersuchung durch Einsatz von drei ELISA verschiedener Hersteller verbunden mit dem Erregernachweis angewandt (siehe 5. Epidemiologie). In einer neueren MAP Nachweisuntersuchung in der Schweiz (Glanemann, 2004) wurden mit einem kommerziellen ELISA auf der Basis von MAP Lipoarabinomannan Antigen 16,8 % seropositive Rinder gefunden.

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) zum MAP Antikörpernachweis ist nicht standardisierbar. Die Anwendung des Agargel-Immendiffusionstests (AGID) ist nur bei Tieren mit klinischer Symptomatik sinnvoll, weil nur dann eine gerade noch akzeptable Sensitivität von 50 % erreicht wird. Für Bestandsuntersuchungen kommen beide Tests wegen ihrer geringen Spezifität nicht in Frage.

3.3. Schlussfolgerung

Alle indirekten Nachweisverfahren über Immunreaktionen als singuläre Tests sind z. T. mit erheblichen Spezifitäts- oder Sensitivitätsproblemen belastet. Für die Massendiagnostik zur Erhebung einer Bestandssituation bzw. eines Herdenstatus oder weitergehender regionaler Prävalenzen ist nur eine gezielte Kombination von Diagnostikverfahren nach dem momentanen Stand der Technik sinnvoll, wenn auf den aufwendigen und teuren direkten Erregernachweis verzichtet werden soll.

Darüber hinaus gilt es für die Diagnostik zu berücksichtigen, dass auf Grund der MAP-Pathogenese unterschiedliche Erregermengen zu verschiedenen Stadien im infizierten Tier vorhanden sind. Initial dominiert die zelluläre Immunantwort mit geringer Antikörperproduktion (tuberkuloide Form). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung wird zunehmend durch Freisetzung von MAP aus abgestorbenen Phagozyten eine starke humorale Reaktion (Antikörperbildung) ausgelöst (Iepromatöse Form). Durch die im Verlauf der Infektion und Krankheitsmanifestation stattfindende, unterschiedlich starke Erregervermehrung und Immunreaktion, kommt es zu Schwankungen sowohl in der Erregerausscheidung als auch in der Ausprägung der diagnostisch verwertbaren Immunreaktionen (siehe 10.1. Studien zur Evaluierung und Validierung der Nachweismethoden von MAP beim Menschen und beim Tier).

Nach den Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen des BMVEL vom 17. Januar 2005 (Bundesanzeiger Nr. 28 vom 10.02.2005 ; S. 2165) gibt es derzeit keine Zulassung für Tests, die für eine flächendeckende Erfassung und Überwachung geeignet sind (Massendiagnostikum).

4. Therapie der Paratuberkulose und Impfung

Eine Heilung von mit MAP infizierten, klinisch kranken Tieren ist nicht möglich. Antibiotika, die in vitro wachstumshemmende Wirkung zeigen, führen beim Tier zu keinem dauerhaften Behandlungserfolg. Eine kurzfristige Milderung der klinischen Symptome durch Einsatz verschiedener Antibiotika oder Antihistaminika wurde in der Literatur beschrieben. Die Erregerausscheidung konnte jedoch nicht verhindert werden.

In Deutschland ist derzeit kein Impfstoff zugelassen. Impfungen sind jedoch prinzipiell möglich. Die erste Vakzine wurde 1926 entwickelt. Der Einsatz von Impfstoffen wird von zahlreichen Autoren hinsichtlich der Vor- und Nachteile beschrieben. Die Ausscheidung der Erregermenge kann durch eine Impfung verringert und somit der Infektionsdruck gesenkt werden. Die Impfung bietet jedoch keinen Schutz vor Infektion und Erkrankung. Als Problem werden Granulome an der Einstichstelle genannt. Darüber hinaus kommt es nach Impfung zu einem positiven Tuberkulin-Intrakutantest durch Kreuzreaktion. Der Einsatz serologischer Untersuchungsmethoden in einem Sanierungsverfahren ist in Beständen mit geimpften Tieren nicht mehr möglich.

5. Epidemiologie der Paratuberkulose

Im Internetportal PubMed werden derzeit (Stand: 16.03.2005) unter dem Suchbegriff „paratuberculosis/epidemiology“ 225 Studien weltweit zitiert; davon 10 Studien aus Deutschland, 18 aus den Niederlanden, 9 aus Dänemark, 3 aus Frankreich und jeweils 2 aus Schweden und Österreich. Italien wird nur einmal zitiert; dagegen werden aus den USA 46 Veröffentlichungen aufgelistet.

Zusammenfassend stellt die II. Medizinische Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät zur Epidemiologie der MAP auf ihrer Internetseite:

(<http://www.vetmed.uni-muenchen.de/med2/skripten/b5-21.html>) folgendes fest:

„Die Krankheit kommt weltweit vor und befällt vor allem Wiederkäuer (einschließlich Alt- und Neuweltkameliden), gelegentlich auch andere Tierarten. Sowohl bei Rindern als auch bei Schafen scheint es Unterschiede zwischen den Rassen hinsichtlich der Empfänglichkeit zu geben. So sollen Rinder der Kanalinselrassen (Jersey, Guernsey) besonders empfänglich sein. Rinder sollen sich von Schafen infizieren können, aber nicht umgekehrt. In Großbritannien wurde in jüngster Zeit MAP in Wildkaninchen, Füchsen und Hermelinen sowie Raben- und Greifvögeln nachgewiesen. Im Darm dieser Tiere wurden auch entsprechende Veränderungen gefunden. Darüber hinaus wurde ein spontaner Ausbruch in einer Kolonie von Makaken beschrieben.

Die Einschleppung in einen bis dahin freien Bestand geschieht in aller Regel durch Zukauf eines infizierten, aber unauffälligen Rindes. Eine Übertragung durch infektiöse Larven von

Magen-Darm-Würmern wird spekuliert. MAP wurde auch aus Insekten isoliert, die auf Rinderweiden oder in Schlachthöfen gefangen wurden.“ Weiter heißt es zur Prävalenz: „Paratuberkulose kommt dort vor, wo danach gesucht wird. Das Fehlen von Hinweisen auf Paratuberkulose bedeutet in der Regel, dass keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt wurden.“

5.1. Epidemiologie weltweit

„Untersuchungen an einigen Schlachthöfen in den **USA** ergaben, dass 7 % bis 11 % der normal geschlachteten Kühe bakteriologisch positiv waren. In Wisconsin wird geschätzt, dass ein Drittel der Herden infiziert ist. In Bundesstaat Michigan sind nach einer neueren Untersuchung (1999) über die Hälfte der Betriebe infiziert. In einer seroepidemiologischen Untersuchung in 22 dänischen Milchrinderbetrieben wurden in 19 Betrieben Reagenten gefunden. Dabei reagierten Jersey-Kühe, ältere Kühe und Kühe in den ersten Monaten der Laktation häufiger positiv“, soweit die Ausführungen der II. Medizinischen Tierklinik der tierärztlichen Fakultät München.

In einer Dissertation aus dem Jahr 2000 werden zur Epidemiologie folgende Daten angeführt (von Schloss, 2000):

In den **Niederlanden** wird die geschätzte Prävalenz in Rinderherden mit 25 % und in Ziegenherden mit 90 % angegeben; in **Südwestengland** wird die Herdenprävalenz in Rinderherden mit 2,6 % (kulturelle Nachweismethode) bis 3,5 % (PCR-Untersuchung) angegeben. In **Italien** wird die Einzeltierprävalenz auf 2,8 % geschätzt, in bestimmten Regionen sind ca. 10 - 15 % aller Herden infiziert. In **Österreich** wurde eine durchschnittliche Einzeltierprävalenz mittels serologischer Verfahren von 6,96 % ermittelt (Studienumfang: 11.028 Rinder aus 2.757 Beständen). In der **Schweiz** wurde in der Region Plateau de Diesse 5,99 % Einzelprävalenz mittels serologischer Verfahren diagnostiziert.

Die Dissertation zitiert zahlreiche Studien über das Auftreten der Paratuberkulose in den **USA**. Die durchschnittliche Prävalenz beträgt (kulturelle Untersuchungen) durchschnittlich 1,6 %. Milchrinder sind mit 2,9 % signifikant stärker von der Erkrankung betroffen als Fleischrinder mit 0,8 %. In einer anderen Studie wird die Einzeltier-Prävalenz mit 4,79 % angegeben (serologische Untersuchungen). In **Neuengland** wurde sogar eine Prävalenz von 18 % festgestellt (kulturelle Untersuchung von Schlachttierorganen!). Im Bundesstaat **Michigan** wurde eine Herdenprävalenz von 54 % und eine Einzeltierprävalenz von 6,9 % festgestellt (serologische Studie). **Australische** Autoren schätzen die Prävalenz wesentlich geringer ein.

Bei Betrachtung aller dieser Daten, so die Autorin, ist zu berücksichtigen, dass die eingesetzten diagnostischen Methoden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität sehr unterschiedlich sind (siehe 3. Diagnose der Paratuberkulose).

5.2. Deutschland

Im Internetportal PubMed werden für Deutschland zehn wissenschaftliche Studien unter dem Suchbegriff: „paratuberculosis/epidemiology/germany“ zitiert. Die in diesem Zusammenhang auswertbaren Veröffentlichungen ergeben ein unterschiedliches Bild, darüber hinaus bringen nur wenige Veröffentlichungen statistisch auswertbare Daten zur Einzeltier- und Herdenprävalenz. Häufig wird vorselektiertes Untersuchungsmaterial herangezogen und mit unterschiedlichen diagnostischen Methoden untersucht. Beispielhaft wird das Vorkommen in **Mecklenburg-Vorpommern** angeführt: Bei serologischen Untersuchungen von 2.997 Blutproben aus 59 vorselektierten Rinderherden mittels Svanovir-ELISA wurde eine Herdenprävalenz von 84,7 % festgestellt, dabei war mindestens ein Reagent in der Herde. Es wurden durchschnittlich 12,2 % Reagenten in den infizierten Herden gefunden (Hacker, 2004).

Die Internetseite der Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen dient zur Orientierung über Prävalenzdaten bei Ziegen und Schafen:

(<http://landwirtschaftskammer.de/fachangebot/tiergesundheit/hgd/paratuberkulose.htm>).

Zusammenfassend wird vom Verfasser festgestellt: In Westfalen-Lippe beträgt die Paratuberkulose-Seroprävalenz bei Schafen und Ziegen 3,1 % bzw. 3,8 % und entspricht in etwa dem Prozentsatz, der für Rinder in NRW ermittelt wurde. Etwa in jedem dritten Bestand ist mit Reagenten zu rechnen. Bei den serologisch positiven Schafen konnten keine klinischen Erscheinungen oder Leistungseinbußen festgestellt werden. Alle durch ihren schlechten Nährzustand auffallende, infizierte Ziegen stammen aus einem Bestand, d.h. das Zusammenwirken mehrerer negativer Einflussfaktoren dominiert offenbar beim kleinen Wiederkäuer maßgeblich das klinische Bild der Paratuberkulose (negative Beeinträchtigung des Immunsystems).

Durch kulturelle Kotuntersuchungen und gegebenenfalls Milchuntersuchungen bei allen Reagenten könnte eine potentielle Infektionsgefahr für den Menschen bzw. andere Tierarten relativiert werden, wobei nach Erfahrungen beim Rind subklinisch infizierte Tiere ein deutlich geringeres Risikopotential darstellen.

5.3. Bayern

Aus verschiedenen bayerischen Regionen wurde in einer Studie des LGL (vormals: Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern) im Rahmen der Routinediagnostik im Zeitraum von 1992 bis 1999 (I. Quartal) in Kotproben von 125 der 1.116 untersuchten Rinder (Einzeltierprävalenz = 11,2 %) kulturell MAP nachgewiesen. In 15 der 52 untersuchten Bestände (Herdenprävalenz = 28,8 %) wurden Rinder als Träger und Ausscheider von MAP ermittelt (Weber, 2000). Durch den Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. (TGD) wurden in den Jahren 2003 und 2004 Studien zur Prävalenz der Paratuberkulose mit finanzieller Beteiligung des Freistaates Bayern und der Bayerischen Tierseuchekasse durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse wurde im Jahr 2004 veröffentlicht: (Böttcher, 2004). Diese Studie diente vor allem dazu, ein diagnostisches Vorgehen zu etablieren. Aufgrund dieser Ergebnisse war es möglich, die 119 untersuchten Bestände in sog. „MAP-Gefährdungskategorien“ einzuteilen.

Fasst man alle Ergebnisse aus den Jahren 2003 und 2004 zusammen, so ergibt eine konservative Schätzung folgende Prävalenzen (pers. Mitteilung Böttcher, 2005): die Infektion mit MAP ist in 6 % der Herden hoch wahrscheinlich (Bestandskategorie A); in diesen Herden wurde neben serologisch positiven Befunden bei einzelnen Tieren MAP kulturell isoliert. 15 % der bayerischen Herden sind aufgrund serologischer Befunde als MAP-verdächtige Bestände (Bestandskategorie B) einzustufen; in diesen Herden gelang kein (!) kultureller Nachweis von MAP.

Basis für diese Ergebnisse sind die serologischen Untersuchungen von 792 Beständen im Jahr 2003. Berücksichtigt wurden nur Bestände mit mindestens 10 Blutproben. Die Untersuchungen wurden mit dem Svanovir-ELISA durchgeführt. Als weitere Basis für die Berechnung der Prävalenz wurden detaillierte Untersuchungen (mehrstufiges serologisches Verfahren) von 119 Beständen (insgesamt also 911 Bestände) einbezogen. Diese 119 Bestände gehörten zur so genannten Kategorie A.

Die Studien des TGD zeigen, dass serologische Verfahren die Herden-Prävalenz nur bedingt, die Einzeltier-Prävalenz aber nicht erfassen können. Die vom TGD vorgeschlagene sequenzielle Serologie ist nur mit erheblichen finanziellen Aufwendungen durchführbar. Auch andere Länder suchen nach ausreichend abgesicherten Ergebnissen. So soll beispielhaft das Studiendesign der Tierärztlichen Hochschule in Hannover erwähnt werden, in dem u. a. in den Jahren 2001 bis 2004 epidemiologische Daten ermittelt werden sollen; die Ergebnisse liegen dem LGL derzeit nicht vor. Das Studiendesign ist unter

http://www.tiho-hannover.de/einricht/bioepi/forschung/forschungsprojekte/ibei_15.htm
einzusehen.

5.4. Schlussfolgerung:

Die vorliegenden Daten aus Bayern lassen eine hinreichende Abschätzung der Prävalenz zu. Weitere epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz sind derzeit in Bayern nicht mehr notwendig. Ein Erkenntniszugewinn ist zum jetzigen Stand der Diagnostik nicht zu erwarten.

6. Bekämpfung der Paratuberkulose und Sanierungsmaßnahmen

6.1. Wirtschaftliche Bedeutung der Erkrankung

Für die Milch produzierenden Betriebe entstehen infolge von Paratuberkulose-Erkrankungen wirtschaftliche Schäden: Zum einen durch die eigentlichen Tierverluste, zum anderen durch verminderte Milchleistung, höhere Krankheitsanfälligkeit, Tierarzkosten und verminderten Schlachterlös. Berechnungen aus den Niederlanden kamen zu dem Ergebnis, dass der Schaden für einen Betrieb mit 100 Milchkühen über einen Zeitraum von 20 Jahren 6800 Euro pro Jahr betragen kann. In Betrieben mit klinisch kranken Tieren wird der Schaden auf 900 Euro pro klinisch krankes Tier geschätzt. Nach Berechnungen der USA betragen in infizierten Herden die Verluste je Kuh durchschnittlich 100 US\$.

Die Paratuberkulose gewinnt darüber hinaus wirtschaftspolitische Bedeutung. Vom O.I.E. (Office International des Epizooties) ist die Paratuberkulose der Wiederkäuer in die Liste B der Erkrankungen mit sozioökonomischer Bedeutung und/oder Bedeutung als Zoonose aufgenommen worden. Die Aufnahme in die Liste B ermöglicht Drittländern für den Import von Zuchtrindern, Sperma und Embryonen einen Nachweis der Paratuberkulose-Unverdächtigkeit zu verlangen.

6.2. Sanierungsverfahren in anderen Ländern

Seit 1970 werden in den Niederlanden Sanierungsmaßnahmen durchgeführt und seit 1984 Impfprogramme. Es werden unterschiedliche Sanierungsoptionen angeboten (von Schloss, 2000). Nach OIE-Angaben (2003) sind die Niederlande noch nicht frei von Paratuberkulose. Schweden gilt seit 2000 als Paratuberkulose frei, da hier die restriktivsten Maßnahmen zur Bekämpfung angewandt wurden. Bestände mit Reagenten in der kulturellen und/oder serologischen Untersuchung werden komplett der Schlachtung zugeführt.

Sanierungsprogramme wurden auch in den USA, Tschechien und Italien durchgeführt. Es wird hiermit deutlich, dass die Bekämpfung der Paratuberkulose ein sehr komplexes und langdauerndes Vorgehen erfordert (Köhler, 2003). Über zehn Jahre können notwendig sein, um in einem Bestand einen Paratuberkulose-freien Status zu erreichen.

6.3. Situation in Deutschland

In mehreren Ländern gibt es freiwillige Bekämpfungsprogramme (Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Thüringen). Im Januar 2005 wurde mit der Veröffentlichung der Paratuberkuloseleitlinien des BMVEL die Grundlage für ein einheitliches Vorgehen in Deutschland geschaffen. Im Wesentlichen basieren sie auf einem strikten Hygienemanagement und der Eliminierung MAP positiver Tiere. Ein Bestand wird als Paratuberkulose unverdächtig beurteilt, wenn dieser mindestens fünf Jahre mit negativem Ergebnis nach den Richtlinien auf Paratuberkulose untersucht wurde. Kosten/Nutzenanalysen für Sanierungsmaßnahmen nach den Bundesleitlinien sind noch nicht veröffentlicht. Eine Studie der Tierärztlichen Hochschule, Hannover, bearbeitet z. Z. diesen Themenkomplex:

http://www.tiho-hannover.de/einricht/bioepi/forschung/forschungsprojekte/ibei_15.htm

6.4. Schlussfolgerung

Aus den bisher vorliegenden Erfahrungen aus Bekämpfungsmaßnahmen wird deutlich, dass nur konsequente jahrelange Sanierungsprogramme zum Erfolg führen können. Dabei spielen vielfältige Einflussfaktoren eine Rolle, u. a. sind die Betriebsstruktur, sowie die gesamte Agrarstruktur eines Landes von Bedeutung. Kosten/Nutzen-Analysen hinsichtlich freiwilliger Bekämpfungsverfahren z. B. nach den Bundesleitlinien liegen nicht vor. Das oben erwähnte Studiendesign der Tierärztlichen Hochschule, Hannover, könnte dafür eine Orientierung bieten.

7. Nachweis von MAP in Milch und Käse

7.1. MAP in der Milch

MAP kann über zwei Wege in die Rohmilch (im Handel Vorzugsmilch) gelangen: zum einen direkt über die Milchdrüse (nur bei klinisch kranken Tieren, vermutete Keimzahl 2 - 8 Keime/50 ml Milch), zum anderen indirekt über fäkale Kontamination. Im Vergleich zur sekretorischen Kontamination ist der Weg der fäkalen der wesentlich bedeutsamere, da hier erhebliche Keimmengen eingetragen werden und auch subklinische Tiere bereits den Erreger mit dem Kot ausscheiden. In der Milchwirtschaft werden unterschiedliche Erhitzungsverfahren eingesetzt. Die bedeutendsten sind das HTST-Verfahren (72 - 75 °C, 15 - 30 s) mit einem Marktanteil von ca. 40 % (Pasteurisierung) und das UHT-Verfahren (≥ 135 °C, ≥ 1 s) mit einem Marktanteil von ca. 60 % (ultrahechoerhitzte Milch). Milchprodukte werden überwiegend aus HTST-Milch hergestellt, eine Erhitzung über 75 °C wird dabei aus technologischen Gründen nicht durchgeführt. Zur Untersuchung der Thermoresistenz von

MAP in der Milch wurden zahlreiche experimentelle Untersuchungen durchgeführt, u. a. auch an der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel. Für UHT-Milch wird ein Überleben vermehrungsfähiger MAP nach dem Erhitzungsprozess ausgeschlossen. Nach experimenteller Kontamination von Milch mit 10^2 - 10^3 Kolonien bildenden Einheiten (KbE)/ml Milch) MAP können nach HTST-Behandlung (Pasteurisierung) vermehrungsfähige MAP nachgewiesen werden. Es findet jedoch eine Keimzahlreduktion um fünf Zehnerpotenzen statt. Dies entspricht einer Reduktion um 99.999 %. Nach experimenteller Kontamination der Milch mit geringeren Keimzahlen (10 KbE/ml) war nach der Hitzebehandlung kein Erregernachweis mehr möglich. Bei der Dateninterpretation ist zu berücksichtigen, ob der Versuch unter Erzeugung eines kontinuierlichen Durchflusses zur uniformen Hitzeverteilung durchgeführt wurde, wie er auch in der Milchindustrie zur Anwendung kommt. Dies wurde in vielen Studien vernachlässigt und könnte die Ursache für widersprüchliche Ergebnisse sein.

7.2. MAP in Käse

Zum MAP Vorkommen in Rohmilchkäse liegen wenig Daten vor: Bei der experimentellen Herstellung von Käse aus kontaminierter Rohmilch zeigte sich, dass MAP während des Reifeprozesses ebenfalls stark reduziert wird, aber nicht vollständig abgetötet.

7.3. MAP in Handelsmilch:

Zum Vorkommen von MAP in Trinkmilchpackungen HTST-behandelter Milch aus dem Handel wurden in den USA, Großbritannien (GB) und Irland Feldstudien durchgeführt. Dabei wurde in den USA und GB MAP in geringer Keimzahl und Häufigkeit nachgewiesen: In GB enthielten 1,8 % von 567 getesteten Packungen MAP, in den USA 2,8 % von 702 Packungen. In einer irischen Untersuchung, die im September 2004 veröffentlicht wurde, war in keiner der 357 untersuchten Milchpackungen vermehrungsfähiges MAP nachweisbar. 56 % der untersuchten Herstellerbetriebe hatten in der irischen Studie die Milch bei mind. 75 °C für 25 s hitzebehandelt. Bei positiven Befunden bei Handelsmilch wird als eine Ursache mangelhafte Stallhygiene diskutiert, was regionale Unterschiede der untersuchten Milchproben erklären könnte.

7.4. Schlussfolgerung

Zur Abschätzung des Verbraucherrisikos beim Verzehr von Milch kann man sich einer Vorgehensweise nach Codex alimentarius bedienen, die von Hammer und Knappstein (Hammer, 1998) in modifizierter Form aufgestellt wurde:

- **Charakterisierung der Gefährdung:** Der Keim kann in niedriger Keimzahl in der Milch vorkommen, bei ausnahmsweise sehr hoher Keimzahl können wenige Organismen die handelsübliche Pasteurisierung überleben. Zur Situation der Handelsmilch liegen aus Deutschland keine Zahlen vor. (Nach Einschätzung der Bundesanstalt für Milchforschung sind bei einem theoretischen Zugrundelegen eines „worst case scenario“, dass Rohmilch mit einer Belastung von 8000 KbE/Liter in der Molkerei abgeliefert wird, nach Durchlauf der technologischen Prozesse 0,5 KbE/Liter pasteurisierter Milch zu erwarten.)
- **Charakterisierung der Exposition:** Die Paratuberkulose des Rindes ist weltweit verbreitet. Eine Exposition der Rohmilchkonsumenten ist möglich. Konsumenten pasteurisierter Milch sind weit weniger exponiert.
- **Charakterisierung des Risikos:** Das tatsächliche Risiko für den Verbraucher ist vermutlich sehr niedrig, da in natürlich kontaminierter Milch nur sehr niedrige Keimzahlen zu erwarten sind und durch Erhitzungsprozesse vermehrungsfähige Keime drastisch reduziert oder völlig inaktiviert werden.

Von der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (Schreiben vom 21.02.2005 an die Milchindustrie) werden für Deutschland keine Daten zum Vorkommen von MAP in Milchproben aus dem Handel aufgeführt. Ebenfalls gibt es aus Deutschland noch keine Publikationen zum Vorkommen von MAP in handelsüblichem Käse (aus Rohmilch oder pasteurisierter Milch hergestellt). Um Informationen über das MAP-Vorkommen in deutscher Handelsmilch und/oder Käse zu erhalten, werden ähnliche Studien, wie jüngst in GB und Irland durchgeführt, angeregt. Damit kann geklärt werden, wie häufig MAP regional (z.B. in Bayern) in Rohmilch-, Käse- und pasteurisierten Milchstichproben nachweisbar ist. Erkenntnisse über einen kausalen Zusammenhang von MAP und MC lassen sich daraus nicht ableiten.

8. Krankheitsbild des Morbus Crohn beim Menschen und Inzidenz in Deutschland

Morbus Crohn (MC) ist eine chronische, schubweise verlaufende entzündliche Darmerkrankung (CED) des Menschen und wird als eine diskontinuierlich segmental auftretende Entzündung, auch der tiefen Wandschichten des Gastrointestinaltraktes, mit einer multifaktoriellen Ätiologie und Pathogenese beschrieben. Die Erkrankung kann an jeder Stelle des Verdauungstraktes vom Mund bis zum Anus vorkommen; am häufigsten treten jedoch abgegrenzte Läsionen im terminalen Ileum (ca 30 %), proximalen Kolon (25 %) oder in beiden Darmabschnitten gleichzeitig (ca. 45 %) auf. Für die Patienten kann der chronische, schubweise Verlauf eine starke Beeinträchtigung der Lebensqualität bedeuten. Die Ätiologie der Erkrankung ist bisher unbekannt. Autoimmunvermittelte Prozesse, genetische Disposition und infektiöse Ursachen werden diskutiert. Der Altersgipfel der Krankheitsmanifestation liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen.

Das Krankheitsbild ist dadurch gekennzeichnet, dass sich in den befallenen Darmabschnitten alle Schichten der Darmwand entzünden, wobei zwischen den Entzündungsherden nicht betroffene Stellen liegen können (siehe Abb. 2: Vergleichende schematische Darstellung der Darmveränderungen). Nach der Abheilung der entzündeten Regionen kommt es zu Narbenbildungen, die den Darm verengen. Zusätzlich kann es zur Bildung von Abszessen und Fisteln zu benachbartem Gewebe kommen, zum Beispiel zu anderen Darmabschnitten, zur Blase oder zur Hautoberfläche. In den betroffenen Darmabschnitten werden Nährstoffe aus der Nahrung nicht mehr ausreichend aufgenommen.

Die Inzidenz des Morbus Crohn liegt in Deutschland bei jährlich 5,2/100.000 (95 %-iges Konfidenzintervall: 4,4 - 6,1) und entspricht dem Durchschnitt in Europa (5,6/100.000; 95 %-iges Konfidenzintervall: 2,8 - 8,3).

9. Hypothesen zum Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und MAP: gegenwärtiger Stand der Forschung

Im Gegensatz zu Wiederkäuern erkranken Menschen nicht an der Johne'schen Krankheit. Ein Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn (MC) wird jedoch seit fast 100 Jahren immer wieder diskutiert, da MAP bei MC-Patienten in manchen Studien häufiger nachgewiesen werden kann als bei Gesunden. Eine kausale Beteiligung von MAP an der Ätiologie des Morbus Crohn konnte jedoch trotz zahlreicher, im Folgenden bewerteter Studien nie bewiesen werden.

9.1. Hypothesen zur möglichen Rolle von MAP bei der Entstehung von Morbus Crohn

Eine Hypothese zur Pathogenese des Morbus Crohn geht davon aus, dass durch einen „first hit“ die Darmbarriere beschädigt wird und dass sich eine perpetuierende Entzündung entwickelt. Die Frage, was dieser „first hit“ sein könnte, ist bisher unbeantwortet. Spekulativ kommen auch MAP in Betracht. Bei CED-Patienten werden in der geschädigten Mukusschicht des Darmes sowie in einzelnen Zellen der Darmschleimhaut Ansammlungen verschiedener Keime beobachtet, die überwiegend der normalen Darmflora angehören. Es werden viele verschiedene Spezies gefunden, u. a. *Bacteroides spp.* und *Enterobacter spp.*, ohne dass eine besondere Häufung bestimmter Spezies erkennbar ist. Weiterhin gibt es keinen konstanten Unterschied im Keimspektrum zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, einer weiteren CED (BgVV, 2001). Die Frage nach einer infektiösen Ätiologie von MC und insbesondere die Frage, ob die Krankheit durch einen Keim hervorgerufen wird, der nicht zur normalen Darmflora gehört, ist bisher unbeantwortet geblieben. Ebenso ist offen, ob MAP eine kausale Rolle spielt oder ob es sich beim Nachweis von MAP aus MC-Patientenmaterial lediglich um eine Koinzidenz handelt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass MAP, wie auch andere Darmkeime, bei der Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse eine Rolle spielen (Sekundärphänomen)..

9.2. Bisherige Untersuchungen

Bezüglich der Annahme einer kausalen Verbindung zwischen MAP und Morbus Crohn existieren widersprüchliche Untersuchungen mit niedrigen Evidenzniveaus. Dies ist auch die Schlussfolgerung einer ausführlichen Literaturstudie des RKI in Zusammenarbeit mit dem BfR (Schrauder, 2003). Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien starke methodische Schwächen aufwies. So fanden sich keine Arbeiten, die den Kriterien einer Fall-Kontroll-Studie entsprachen. Lediglich die Studie von Thomas et al. (1998) entspricht nach den Kriterien des RKI den Kriterien einer Kohortenstudie. Auch bei der Auswertung der Reviewsuche konnte keine von insgesamt 43 Arbeiten zusammenfassend zu einer eindeutigen Bewertung kommen. So wird zum Beispiel in einer Arbeit von Chamberlin et al. (2001) schon gleich zu Beginn MAP als eine der möglichen Ursachen für MC impliziert, während andere von vornherein eher keinen Zusammenhang erkennen können (van Kruiningen, 1999).

9.3. Fallberichte und Fall-Kontroll-Studien

Bei der Suche nach Fallberichten und Fall-Kontroll-Studien wurden von Schrauder et al. (2003) 14 Studien ausgewertet. Zu diesen gehörten sechs Fallberichte (Chiodini, 1984; Schneebaum, 1987; Cummins, 1996; Voulgarelis 1998; Hermon-Taylor, 1998; Richter 2002),

eine in vitro-Untersuchung (Rastogi, 1992) und drei unsystematische Reviews (Engstrand, 1995; Prantera, 1999; Selby, 2000). Fall-Kontroll-Studien lagen keine vor. In drei Fallberichten wird ein Nachweis von MAP bei Menschen beschrieben. In der ersten Veröffentlichung beschrieben Chiodini et al. (1984), wie es ihnen erstmalig gelang, bei zwei MC Patienten MAP nachzuweisen. 1998 beschrieben Hermon-Taylor et al. (1998) den Nachweis von MAP in einem Halslymphknoten eines sieben Jahre alten Jungen, der fünf Jahre später an einer terminalen Ileitis erkrankte. Richter et al. (2002) beschrieben die Krankheitsgeschichte eines 36-jährigen, mit HIV und mit Hepatitis C infizierten und an Hämophilie erkrankten Patienten, der unter neu aufgetretenen Diarrhoen litt. In den Biopsieproben aus Darm, Leber und Knochenmark ließen sich säurefeste Stäbchen nachweisen, die kulturell und mit IS900-Analyse als MAP identifiziert wurden. Naser et al. (2000) beschrieben eine Untersuchung von sieben Brustmilchproben auf MAP, zwei von Müttern mit Morbus Crohn und fünf von gesunden Müttern. Aus beiden Brustmilchproben der Mütter mit Morbus Crohn gelang es den Autoren, MAP zu isolieren, bei den Gesunden jedoch nicht. In einer weiteren Fallbeschreibung eines 16-jährigen Patienten mit extraintestinaler Manifestation des Morbus Crohn in Form einer granulomatösen Entzündung der Gesichtshaut konnte MAP mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Bei zwei weiteren Fallbeschreibungen ist lediglich in der Arbeit von Voulgarelis et al. (1998) ein Erreger des *Mycobacterium avium*-Komplexes nachgewiesen worden. In einer älteren Arbeit von Schneebaum et al. (1987) konnte nur der Nachweis von *Mycobacterium intracellulare* geführt werden.

In zwölf Studien haben die Autoren die Möglichkeiten des Nachweises von MAP bei MC Patienten und bei einer oder mehreren Kontrollgruppen analysiert (Fiasse, 1994; Fidler, 1994; Lisby, 1994; Rowbotham, 1995; Mishina, 1996; Walmsley, 1996; Al-Shamali, 1997; Clarkston, 1998; Kallinowski, 1998; Naser, 2000; Ryan, 2002; Fujita, 2002). Die Kontrollgruppen bestanden meist aus Colitis ulcerosa-Patienten und einer weiteren Kontrollgruppe, die sich aus Patienten zusammensetzte, die nicht an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung litten (Gesunde, Darmkarzinom, Irritables Kolon, etc.). Ohne ein klar zu erkennendes Studiendesign zeichneten sich alle Studien auch durch eine schwache Beschreibung ihrer Methodik aus. Bei überwiegend geringer und ungleicher Fallzahl blieb die Art der Patientenauswahl und der Kontrollen meist unklar, ebenso fehlte den meisten Studien eine genaue Beschreibung aller Studienteilnehmer (Alter, Geschlecht, Komorbiditäten, Medikation, etc.).

Weiterhin fanden Schrauder et al. (2003), dass sich die Studien untereinander durch die Art der untersuchten Proben und durch die Nachweismethoden unterschieden, z.B. durch unterschiedliche PCR-Techniken, sowie auch durch unterschiedliche immunologische

Untersuchungen und kulturelle Isolationstechniken. Selbst bei gleich angewandter Untersuchungsmethodik sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen widersprüchlich und sehr unterschiedlich. Während manche Gruppen MAP bei Morbus Crohn-Patienten nachweisen konnten (Mishina, 1996; Ryan, 2002), konnten andere Forschergruppen dies nicht reproduzieren (Rowbotham, 1995; Clarkston, 1998; Kallinowsky, 1998; Fujita, 2002;) bzw. war MAP auch bei gesunden Kontrollpersonen nachweisbar (Rowbotham, 1995). Abgesehen von den widersprüchlichen Ergebnissen ist bei all diesen Studien von erheblichen systematischen Fehlern (insbesondere Selektionsbias) auszugehen. Die Studien sind daher nur von geringem Evidenzgrad.

9.4. Kohorten-, Follow-up- und Therapie-Studien

Ebenfalls von Schrauder et al. (2003) wurden vier Untersuchungen als Kohortenstudien zum MAP-Nachweis (Mishina, 1996; Clarkston, 1998; Kallinowski, 1998) sowie zum Antikörper-Nachweis gegen MAP (Walmsley, 1996) identifiziert. Außerdem wurden drei so genannte Follow-up-Untersuchungen (Thomas, 1998; Borody, 2002), ein Follow-up nach dreifach antituberkulöser Medikation (Thomas, 1998) und eine Follow-up-Untersuchung mit einer dreifach antibiotischen Therapie basierend auf einem Makrolid mit einer Therapiedauer von bis zu 54 Monaten (Borody, 2002) gefunden. Bis auf die Studie von Thomas et al. (1998) entsprach keine dieser Studien den Kriterien einer Kohortenstudie.

Bei der Auswertung der Kategorie Therapie wurden insgesamt 22 Studien gefunden und 18 in die Bewertung eingeschlossen. Die Ergebnisse dieser Suchstrategie überschneiden sich mit der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Suche. Es fanden sich fünf bereits bekannte Reviews (Thayer, 1992; Thompson, 1994; Stabel, 1998; Selby, 2000; Hulten, 2000) und zwei Fallberichte (Hermon-Taylor, 1998; Richter, 2002), die bereits in den vorherigen Abschnitt ausgewertet worden waren. Desweiteren wurden ein bisher noch nicht identifizierter Review von Hermon-Taylor et al. (2000) sowie drei ebenfalls von diesem Autor verfasste Kommentare bzw. Leserbriefe gefunden, die keine neuen Erkenntnisse vermittelten. Bei zwei Studien handelte es sich um Untersuchungen, die im Zusammenhang mit dem Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis*-spezifischer DNA durchgeführt wurden (Fidler, 1994; Lisby, 1994). Vier Studien (Prantera, 1989; Thomas, 1998; Borody, 2002; Shafran, 2002) beschäftigen sich mit der Therapie von Morbus Crohn. Zwei Studien aus dem Jahr 2002 lagen nur als „Abstract“ vor (Borody, 2002; Shafran, 2002). Beide Studien sind offene, unkontrollierte, klinische Studien mit einer kleinen Anzahl von Patienten, die mit einer zweifach- (Clarithromycin und Rifabutin), bzw. einer dreifach-antibakteriellen Medikation (Clarithromycin, Rifabutin und Clofazimin) behandelt worden sind (Shafran, 2002; Borody, 2002). In der zuerst genannten Studie beschrieben Shafran et al. (2002) unter der

Zweifach-Medikation bei 21 von 29 Patienten in einem Follow-up nach 4 - 17 Monaten eine Verbesserung des „Crohn's disease activity index“. Eingeschlossen waren ursprünglich 36 Patienten, von denen bei sieben aufgrund von Nebenwirkungen die Therapie abgebrochen werden musste. Unter der Dreifach-Medikation beschreiben Borody et al. (2002) eine Besserung des so genannten Harvey-Bradshaw-Indexes bei acht von insgesamt zwölf Patienten nach 52 - 54 Monaten.

Die Evidenz und Aussagekraft dieser Studien ist jedoch aufgrund ihres Studiendesigns, u. a. wegen fehlender Kontrollgruppe und damit fehlender Randomisierung, nur gering. Aus dem Jahre 1998 stammt ein Bericht von Thomas et al. (1998) über die Ergebnisse einer fünf Jahre währenden Follow-up-Studie, die im Jahre 1994 als multizentrische, randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde Studie (RCT) mit 130 Patienten gestartet worden war. Ziel des RCT war es, die Wirksamkeit einer antituberkulösen Therapie zu testen, bestehend aus Rifampicin, Isoniazid und Ethambutol. Einhundertelf (81 %) der Patienten konnten über fünf Jahre nachverfolgt werden. Jährlich wurden die Anzahl der chirurgischen Eingriffe, die Anzahl der Krankenhauseinweisungen, die Aktivität der Erkrankungen, verschiedene Blutwerte, die Medikation und die Anzahl der Krankheitsschübe dokumentiert. Nach 36, 48 und 60 Monaten wurden die Ergebnisse der Placebogruppe mit der „aktiven“ Gruppe verglichen. Bis auf den Zeitpunkt nach 60 Monaten - hier hatten 26 % in der „aktiven“ Gruppe und 52 % in der Kontrollgruppe einen oder mehrere Schübe im vorangegangenen Jahr erlitten - zeigte sich für die oben genannten Erhebungen kein statistisch signifikanter Unterschied in beiden Gruppen. Die Behandlung von fünf Patienten mit Dapson, einem Medikament gegen *Mycobacterium leprae*, wird von Prantera et al. (1989) beschrieben. Auch diese Studie ist u. a. aufgrund ihrer geringen Patientenzahl nur von geringem Evidenzgrad.

9.5. Aktuelle Untersuchungen

Eine neuere Studie wurde von Saleh et al (2004) in der Zeitschrift *Lancet* veröffentlicht. In dieser Studie wurden Blutproben von 28 Patienten mit MC und neun Patienten mit Colitis ulcerosa mit einer Kontrollgruppe von 15 Personen ohne entzündliche Darmkrankheit verglichen, darunter zwei Patienten mit Dickdarmkrebs, einem Patienten mit Refluxkrankheit und elf Gesunden. In der Gruppe der MC-Patienten waren zehn von 22 Personen PCR- und Kultur-positiv, zwei waren nur PCR- und vier waren nur Kultur-positiv. Eine kausale Beteiligung von MAP bei MC kann jedoch auch aus dieser Untersuchung nicht abgeleitet werden, da im vorliegenden Studiendesign eine Sekundärbesiedelung mit nachfolgender (aseptischer) Bakteriämie ohne Krankheitswert nicht ausgeschlossen werden kann. Vielmehr können die Beobachtungen zwanglos durch die krankheitsbedingten Darmschädigungen erklärt werden.

In einer aktuellen, umfangreichen Studie von Bernstein et al. (2004) wurden 283 Patienten mit MC, 144 mit anderen entzündlichen Darmerkrankungen und 540 gesunde Kontrollen, einschließlich 138 Geschwistern von Erkrankten, serologisch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen MAP untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der MAP-Antikörperprävalenz zwischen den drei Gruppen, insbesondere auch nicht zwischen Geschwisterpaaren mit und ohne MC. Auch waren keine Risikofaktoren mittels demographischer Analyse oder mittels Fragebogen zu erkennen.

9.6. Stellungnahmen verschiedener Expertenkommissionen

Das Scientific Committee zu Tiergesundheit der EU (2000), das Sub-committee der Irischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (FSAI, 2000), das Beratungskomitee für mikrobiologische Lebensmittelsicherheit der Food Standard Agency des Vereinigten Königreichs (FSA UK, 2001), die Nationale Wissenschaftsakademie der USA (Board on Agriculture and National Resources, 2003) und andere Expertengruppen kamen zu dem Schluss, dass der momentane Erkenntnisstand nicht ausreicht um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und MAP beweisen zu können. Eine gemeinsame, umfassende Literaturstudie vom Dezember 2003 des Robert Koch-Instituts und des Bundesinstituts für Risikobewertung fand ebenfalls keine wissenschaftlich haltbare Evidenz für eine kausale Verbindung zwischen MAP und MC.

9.7. Zusammenfassende Bewertung

Trotz zahlreicher epidemiologischer Untersuchungen, die in diesem Bericht bewertet wurden, konnte eine kausale Rolle von MAP in der Ätiologie von MC nicht bewiesen werden. Vielmehr sind die Studien eher mit einer sekundären Darmbesiedelung mit MAP aufgrund der Vorschädigung durch die MC-Erkrankung vereinbar. Auf die Fragestellung „Führt beim Menschen eine Exposition mit *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP) zu einem erhöhten Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken?“ gibt es keine validen wissenschaftlichen Erkenntnisse. Auch Schrauder et al. (2003) kommen zu dem Schluss, dass die ausgewerteten Studien aufgrund ihrer Anfälligkeit für systematische Fehler methodisch dazu nicht geeignet sind. Auch bei Therapiestudien mit antimykobakteriellen Chemotherapeutika muss ein möglicher „Benefit“ nicht MAP-spezifisch sein, sondern kann durch eine breitere antibakterielle Wirkung der verwendeten Antibiotika bedingt sein. Auch wenn der Nachweis von MAP bei Patienten mit Morbus Crohn zur Unterstützung der Hypothese verlockend sein könnte, ist es wissenschaftlich inkorrekt, hieraus allein eine ätiologische bzw. kausale Beziehung herzustellen. In der Mikrobiologie werden oft die Henle-Koch'schen

Postulate als Kausalitätskriterien herangezogen, so auch in einigen der oben genannten Publikationen. Schon lange wird die Anwendung dieser Kriterien diskutiert und kritisiert, da sie für chronische Erkrankungen mit komplexen bzw. multifaktoriellen Ursachen nicht geeignet sind. Da aufgrund der zuvor dargestellten Datenlage eine kausale Rolle von MAP in der Ätiologie von Morbus Crohn überaus zweifelhaft ist, ist ein aktueller Forschungsbedarf an weiteren Studien nur schwer zu identifizieren (siehe 10. Einschätzung der Notwendigkeit weiterer Studien). Es sind auch keine nationalen oder internationalen Forschungsaktivitäten bekannt, in die eine solche Studie eingebracht werden könnte.

10. Einschätzung der Notwendigkeit weiterer Studien

Unabhängig von der fachlichen Empfehlung des LGL, aufgrund des gegenwärtigen Kenntnisstands derzeit keine weiteren epidemiologischen Studien durchzuführen, soll hier auf statistisch-epidemiologische Aspekte denkbarer, weiterer Untersuchungen eingegangen werden.

10.1. Studien zur Evaluierung und Validierung der Nachweismethoden von MAP beim Menschen und beim Tier

Die Verfügbarkeit von validen und ausreichend präzisen diagnostischen Verfahren ist unverzichtbare Voraussetzung für eine weitere Abklärung der Häufigkeit sowohl als Prävalenz (bestehende Krankheiten) als auch als Inzidenz (Neuerkrankungen) des MAP-Vorkommens bei Mensch und Tier. Sofern diese nicht vorliegen, ist ihre Entwicklung bzw. Validierung zur Klärung der weiteren Fragestellungen dringlich. Die Testung setzt den Vergleich mit einer zuverlässigen Referenzmethode („Goldstandard“) voraus. Dieser liegt die unverzerrte und objektive Untersuchung des Tests an einer ausreichend großen repräsentativen Stichprobe zu Grunde, mit deren Hilfe sich Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert ableiten lassen. Zu berücksichtigen wären beim Menschen u. a. auch ethische Aspekte invasiv-diagnostischer Methoden bei gesunden Kontrollgruppen (Biopsienahme bei Gesunden) im Vergleich mit an Morbus Crohn Erkrankten.

10.2. Prävalenzstudien zum Vorkommen von Morbus Crohn beim Menschen und Paratuberkulose bei Tieren in Deutschland

Derartige Informationen setzen ebenfalls ausreichend valide und präzise diagnostische Tests für diese Krankheiten voraus. Prävalenzdaten lassen sich aus Inzidenzdaten und der durchschnittlichen Krankheitsdauer schätzen bzw. aus Querschnittsuntersuchungen direkt

erheben. Orientierende Zahlen zur Neuerkrankungsrate in Deutschland aus dem Bericht von RKI und BfR entstammen einer städtischen Bevölkerung und liegen bei etwa fünf Fällen je 100.000 Personen im Jahr (Timmer 1999). Diese Zahlen beziehen sich allerdings nur auf die Zeit von 1980 bis 1995. Neuere und aussagefähigere Aussagen zu einem zeitlichen Trend setzen ein hinreichendes Studiendesign sowie eine belastbare Testmethode voraus. Dafür ist eine sensitive und spezifische Erfassung aller Neuerkrankungsfälle in einer ausreichend großen Studienpopulation notwendig und setzt die Kooperation mit entsprechenden Einrichtungen der klinischen Versorgung voraus. Da für eine belastbare Aussage ein prospektives Studiendesign und eine ausreichende zeitliche Reichweite notwendig sind, sind keine kurzfristigen Aussagen für Deutschland bzw. Bayern zu erwarten. Der Nutzen besteht in der Verwendung solcher Daten für die Risikoabschätzung, nicht jedoch in einer Klärung der Hypothese einer ätiologischen Rolle von MAP.

10.3. Studien zur Eingrenzung von Risikofaktoren

Derartige Studien lassen sich zum einen als so genannte Fall-Kontroll-Studien oder als Kohortenstudien durchführen. Grundlegendes Prinzip der Fall-Kontroll-Studie ist die Bestimmung der Häufigkeit bestimmter Risikofaktoren einschließlich des MAP-Nachweises bei an Morbus Crohn Erkrankten verglichen mit nicht an Morbus Crohn Erkrankten. Dabei sollten neben dem hauptsächlich interessierenden Risikofaktor, hier MAP, zusätzlich weitere relevante Einflussgrößen mit erfasst werden, wie Ernährungsgewohnheiten oder Kontakt zu Rindern. Angesichts der verschiedenen Unsicherheiten bei der Bestimmung von Exposition und potentiell konfundierenden Einflussgrößen sollte für die Fallzahlschätzung eine nachweisbare Risikoerhöhung um 30 – 50 % angenommen werden, nicht jedoch geringere Risikoerhöhungen. Weiterhin wird angesichts der uneinheitlichen Datenlage konservativ eine Prävalenz der MAP-Besiedelung bei MC-Erkrankten von 50 % angenommen. Bei einem entsprechend gematchten Studiendesign läge die notwendige Fallzahl bei einem Typ-I-Fehler von 5 % und einer Power von 80 % bei jeweils 284 Personen (Relatives Risiko, RR = 1,3) bzw. jeweils 129 Personen (RR = 1,5) bei Fällen und Kontrollen. Problematisch ist die Verwendung von prävalenten Fällen, da hier die zeitliche Ordnung des MAP-Befalls in Zusammenhang mit einer entzündlichen Darmkrankheit unklar ist. Um zu klären, ob sich die auffällige MAP-Besiedelung vor der Erkrankung oder als Folge der Erkrankung ereignet, wäre grundsätzlich das Design einer Kohortenstudie anzustreben. Angesichts der niedrigen Inzidenzzahlen von 5 pro 100.000 pro Jahr wäre ein solches Design allenfalls in einer Hochrisikogruppe darstellbar. Eine Alternative wäre die Verbindung einer inzidenten Fall-Kontroll-Studie mit einem Follow-up der Fälle und der Kontrollen (Case-Cohort-Design). Damit könnten Veränderung der MAP-Prävalenz im Krankheitsverlauf untersucht werden.

10.4. Doppelblinde, randomisierte, kontrollierte Therapiestudien

Die Option einer doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Therapiestudie kann zwar Hinweise auf die therapeutische Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie liefern, nicht jedoch schlüssige Beweise zur Klärung der ätiologischen Fragestellung.

10.5. Molekularbiologischer Vergleich von MAP-Stämmen, die von Wiederkäuern und vom Menschen isoliert wurden

Angesichts des ubiquitären Vorkommens von MAP ist von einem solchen Ansatz nur ein begrenzter Nutzen zur Klärung der ätiologischen Fragestellung zu erwarten. Die vergleichende Genomanalyse einer größeren Anzahl humaner MAP-Isolate könnte fundiertere Erkenntnisse über die mögliche Herkunft dieser Erreger liefern. So könnte ein Nutzen aus der Abgrenzung eines möglicherweise der Nahrungskette entstammenden Risikos erwachsen.

11. Fazit und Empfehlung des LGL

Die durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verursachte Paratuberkulose ist eine schwere Erkrankung von Wiederkäuern. Mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden wurde eine Prävalenzschätzung zum Vorkommen von MAP in bayerischen Rinderbeständen durchgeführt. Ein Erkenntnisgewinn ist zum jetzigen Stand der Diagnostik aus weiteren epidemiologischen Prävalenzstudien nicht zu erwarten. Erfolgreiche Bekämpfungsprogramme erfordern ein jahrelanges konsequentes Vorgehen. Dabei spielen strukturelle Faktoren eine große Rolle. Kosten/Nutzen-Analysen für ein Bekämpfungsverfahren liegen nicht vor, werden jedoch vor Aufnahme von Bekämpfungsmaßnahmen als sinnvoll erachtet. Milch und Milchprodukte werden als zentrale Expositionsquelle von MAP für den Menschen diskutiert. Daten zum Vorkommen von MAP in deutscher Handelsmilch sind derzeit nicht publiziert. Eine Studie zum Vorkommen von MAP in bayerischer Handelsmilch (Roh-, bzw. pasteurisierter Milch) wird zur Verbesserung des Informationsstandes und als Ergänzung der wenigen Untersuchungen aus EU-Mitgliedsstaaten angeregt. Rückschlüsse auf einen kausalen Zusammenhang von MAP und MC lassen sich daraus nicht ableiten.

Im Gegensatz zum Wiederkäuer existiert das Krankheitsbild einer "Paratuberkulose" beim Menschen nicht. Eine vermutete kausale Beteiligung dieses Erregers an der Entstehung von Morbus Crohn bleibt weiterhin unbewiesen. Das LGL erwartet hierzu aus gleichartigen epidemiologischen Studien derzeit keinen weiteren Erkenntnisgewinn.

Literatur

- Al-Shamali M, Khan I, Al-Nakib B, Al-Hassan F, Mustafa AS. A multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:819-823.
- Bang, B. Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rind. *Berl. Tierärztl. Wochenschrift* 1906, 42: 759-763.
- Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT. Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's Disease and ulcerative colitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1129-1135.
- Böttcher J., Gangl A. *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*-combined serological testing and classification of individual animals and herds. *J. Vet. B. Infect. Dis. Vet Public Health.* 2004; 51(10):443-448.
- BgVV. Protokoll des Sachverständigengesprächs zur mikrobiologischen Risikoabschätzung einer Verbindung zwischen *Mycobacterium paratuberculosis* und Morbus Crohn. Broschüre des BgVV, 2001.
- Borody TJ, Leis S, Warren EF, Surace R. Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy--approaching a cure? *Dig Liver Dis* 2002; 34:29-38.
- Chacon, O., Bermudez, L.E., Barletta, R. Review article: Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *mycobacterium paratuberculosis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 2004; 58:329-363.
- Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, et al. Review article: *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:337-346.
- Chiodini DU, Van Kruvingen HJ, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I: An unclassified *Mycobacterium species* isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29:1073-1079.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA, Merkal RS. In vitro antimicrobial susceptibility of a *Mycobacterium sp.* isolated from patients with Crohn's disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26:930-932.
- Clarkston WK, Presti ME, Petersen PF, Zachary PEJ, Fan WX, Leonardi CL, et al. Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease: a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:195-199.
- Cummins RE, Mullins D, Smith LJ, Ford MJ. Metastatic Crohn's disease: a case report. *Pediatr Dermatol* 1996; 13:25-28.
- Dalziel TK. Chronical interstitial enteritis. *Br. Med. J.* 1913; 2:1068-1070.
- Engstrand L *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. *Scand. J. Inf. Dis. Suppl.* 1995; 98:27-29.

- Fiasse R, Vannuffel P, Dieterich C, Naerhuyzen B, Gilot P, Coene M, et al. Antibodies against a species-specific recombinant polypeptide of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. Correlation with disease activity. *Acta Gastroenterologica Belgica* 1994; 57:C 34.
- Fidler HM, Thurrell W, Johnson NM, Rook GA, McFadden JJ. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease. *Gut* 1994; 35:506-510.
- Glanemann, B, Hoelzle, LE, Bogli-Stuber, K, Jemmi, T., Wittenbrink, MM. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by culture and serology. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2004; 46:409-415.
- Hacker, U, Hüttner, K., Konow, M. Untersuchung zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 2004; 117, 140-144.
- Harris, NB, Barletta, RG. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 14:489-512.
- Hammer P., Knappstein K. *Mycobacterium paratuberculosis* als Zoonoseerreger. Tagung der Fachgruppe Tierseuchen der DVG in Hannover, 18.-19.6.1998: 12-21.
- Hermon-Taylor J, Barnes N, Clarke C, Finlayson C. *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *BMJ* 1998; 316:449-453.
- Hermon-Taylor J. The causation of Crohn's disease and treatment with antimicrobial drugs. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30:607-610.
- Hermon-Taylor J. Protagonist. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is a cause of Crohn's disease. *Gut* 2001; 49:755-756.
- Hulten K, Almashhrawi A, El-Zaatari FA, Graham DY. Antibacterial therapy for Crohn's disease: a review emphasizing therapy directed against mycobacteria. *Dig Dis Sci* 2000; 45:445-456.
- Johne, H.A. und L. Frothingham Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift für Thiermedizin* 1895; 21: 438-453
- Kallinowski F, Wassmer A, Hofmann MA, Harmsen D, Heesemann J, Karch H; et al. Prevalence of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease. *Hepatology* 1998; 45:1552-1558.
- Köhler H., Geue L., Conraths F.J. Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle* 2003; 1/2003:40-44.
- Lisby G, Andersen J, Engbaek K, Binder V. *Mycobacterium paratuberculosis* in intestinal tissue from patients with Crohn's disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29:923-929.
- Mishina D, Katsel P, Brown ST, Gilberts EC, Greenstein RJ. On the etiology of Crohn disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:9816-9820.
- Naser SA, Hulten K, Shafran I, Graham DY, El-Zaatari FA. Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2000; 77:497-504.

- Prantera C, Bothamley G, Levenstein S, Mangiarotti R, Argentieri R. Crohn's disease and mycobacteria: two cases of Crohn's disease with high anti-mycobacterial antibody levels cured by dapsone therapy. *Biomed Pharmacother* 1989; 43: 295-299.
- Prantera C, Scribano ML. Crohn's disease: the case for bacteria. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31:244-246.
- Richter E, Wessling J, Lugerling N, Domschke W, Rusch-Gerdes S. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:729-731.
- Rowbotham DS, Mapstone NP, Trejdosiewicz LK, Howdle PD, Quirke P. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* 1995; 37:660-667.
- Saleh AN, et al. Culture of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* from the blood patients with Crohn's disease. *Lancet* 2004; 364: 1039 - 1044
- Schneebaum CW, Novick DM, Chabon AB, Strutynsky N, Yancovitz SR, Freund S. Terminal ileitis associated with *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in a homosexual man with acquired immune deficiency syndrome. *Gastroenterology* 1987; 92:1127-1132.
- Schrauder A, Ammon A, Stark K, Euler U, Bräunig J, Weise E. Morbus Crohn und *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* - eine Literaturstudie. Broschüre des RKI, 2003.
- Schröder K.H., Naumann L. The avian mycobacteria. *Immunität und Infektion* 1994; 22:131 – 136
- Selby W. Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease. *Vet Microbiol* 2000; 77:505-511.
- Shafran I, Piromalli C, Decker JW, Sandoval J, Naser SA, El-Zaatari FA. Seroreactivities against *Saccharomyces cerevisiae* and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* p35 and p36 antigens in Crohn's disease patients. *Dig Dis Sci* 2002; 47:2079-2081.
- Shafran I, Kugler L, El-Zaatari FA, Naser SA, Sandoval J. Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002; 34:22-28.
- Stabel JR. Johne's disease: a hidden threat. *J Dairy Sci* 1998; 81:283-288.
- Thayer WR. The use of antimycobacterial agents in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15: 5-7.
- Thomas GA, Swift GL, Green JT, Newcombe RG, Braniff-Mathews C, Rhodes J, et al. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut* 1998; 42:497-500.
- Thompson DE. The role of mycobacteria in Crohn's disease. *J Med Microbiol* 1994; 41:74-94.
- Twort, F.W. and G.L.Y. Ingram. A method for isolating and cultivations the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculosis enteritis of bovines. *Proc.Soc.London* 1912, 99: 1323-1329.
- Van Kruiningen HJ. Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5:183-191.
- Von Schloss, A. Auswertung eines Sanierungsverfahrens zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen in Nordrhein-Westfalen, *Vet. Med. Diss.*, Hannover, 2000.

- Voulgarelis M, Chorti M, Kittas C, Karachristos A, Ikonomopoulos G, Skopouli FN. Fever and abdominal pain in a 45-year-old woman with cutaneous necrotising vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16:72-76.
- Walmsley RS, Ibbotson JP, Chahal H, Allan RN. Antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *QJM* 1996; 89:217-221.
- Weber A, Schäfer-Schmidt R, Fuchs D, Weigl U. Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben von Rindern aus bayerischen Beständen. *Tierärztl. Umschau* 2000; 55:97-99.
- Whitlock RH, Buerget C. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1996; 12(2):345-56.