

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Charakterisierung von Pflanzenlektinen bezüglich ihrer
Eignung zur Anreicherung von *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* aus Milch

von Bernhard Franz Hobmaier
aus Moosburg an der Isar

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/en: Prof. Dr. Herbert Kaltner
Priv.-Doz. Dr. Andrea Stockmaier-Didier
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meiner Familie

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	3
2.1 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	3
2.1.1 Taxonomie und Morphologie	3
2.1.2 Zellwand und Tenazität	4
2.1.3 Resistenz gegen Pasteurisierung	5
2.2 Paratuberkulose	6
2.2.1 Pathogenese	6
2.2.2 Krankheitsverlauf (nach Whitlock und Buergelt 1996)	8
2.3 MAP beim Menschen	9
2.3.1 Wirtsspektrum.....	9
2.3.2 MAP und Morbus Crohn	10
2.3.3 Beteiligung an anderen Erkrankungen des Menschen	13
2.4 Mögliche Übertragungswege	16
2.4.1 MAP im Lebensmittel.....	16
2.5 Nachweisverfahren im Lebensmittel	17
2.5.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)	17
2.5.2 Kultur	18
2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	19
2.5.4 Phagen Assay	20
2.5.5 Vergleichende Evaluierung der verfügbaren Nachweismethoden	21

2.6 Spezifische Voranreicherung von MAP aus Milch	22
2.6.1 Immunomagnetische Separation (IMS)	22
2.6.2 Peptid-medierte magnetische Separation (PMS).....	23
2.6.3 Lektinmedierte magnetische Separation (LMS).....	23
3 PUBLIKATION	25
5 DISKUSSION	37
6 ZUSAMMENFASSUNG	59
7 SUMMARY	61
8 LITERATURVERZEICHNIS	63
DANKSAGUNG	87

Abb.	Abbildung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Desoxyribonucleic acid)
EEA	Mit Ethanol extrahierte Membran-Antigene (<i>engl.</i> Ethanol extracted antigen)
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
ELLecSA	Enzyme linked Lectin-sorbent assay
Engl.	Englisch
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (<i>engl.</i> Food and Agriculture Organization)
Fig.	Abbildung (<i>engl.</i> Figure)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLI	Friedrich Löffler Institut
Franz.	Französisch
GAD	Glutamat-Dehydrogenase (<i>engl.</i> Glutamic acid dehydrogenase)
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GMP	Glykomakropeptid des Kappa-Kaseins
GPL	Glycopeptidolipid
HEYM	Herold's Egg Yolk Medium
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid
HSP65	Heat Shock Protein 65
HSP70	Heat Shock Protein 70
HT	Hashimoto-Thyreoiditis
IBD	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (<i>engl.</i> Inflammatory bowel diseases)
IFN γ	Interferon Gamma
IL-12	Interleukin 12
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IMS	Immunomagnetische Separation
ISO	International Organization for Standardization
LacNAc	N-Acetyllactosamin
LMS	Lektinmedierte magnetische Separation

Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
M7H9	Middlebrook 7H9 Medium
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
Man	Mannose
ManLAM	Mannosyliertes Lipoarabinomannan
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MBP	Myelin Basic Protein
MDBK-Zellen	Zelllinie aus bovinen Nierenepithelzellen (<i>engl.</i> Madin-Darby bovine kidney epithelial cells)
MFGM	Milk fat globule membrane
mJRLs	Unterfamilie der Jacalinartigen Lektine (<i>engl.</i> Mannose-binding Jacalin-related lectins)
MS	Multiple Sklerose
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NACMCF	Gremium zur Beratung staatlicher Lebensmittelbehörden der USA (<i>engl.</i> National Advisory Committee of Microbiological Criteria for Foods)
NO	Stickstoffmonoxid
nsGPL	Nicht serotypspezifische Glycopeptidolipide
OD	Optische Dichte
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (<i>franz.</i> Office International des Epizooties)
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>engl.</i> Pathogen associated molecular patterns)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl.</i> Peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
PMS	Peptidmedierte magnetische Separation
qPCR	Quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
ssGPL	Serotypspezifische Glycopeptidolipide
T1D	Typ 1 Diabetes
T2D	Typ 2 Diabetes

Th1	Typ 1 T-Helferzellen
Th2	Typ 2 T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
WCA	Mit Gammastrahlung abgetötete, intakte MAP-Zellen (<i>engl.</i> Whole cell antigen)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl.</i> World Health Organization)
ZnT8	Zink Transporter 8

Lektine:

AAL	<i>Aleuria aurantia</i> Lektin
ABL	<i>Agaricus bisporus</i> Lektin
ACL	<i>Amaranthus caudatus</i> Lektin
BanLec	<i>Musa paradisiaca</i> Lektin
BPL	<i>Bauhinia purpurea</i> Lektin
ConA	Concanavalin A
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> Agglutinin
DSL	<i>Datura stramonium</i> Lektin
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> Lektin
GNL	<i>Galanthus nivalis</i> Lektin
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lektin I
GSL-I-B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lektin I Isolektin B4
GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lektin II
HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i> Lektin
JAC	Jacalin
LCA	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i> Lektin
LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i> Lektin
MAL-II	<i>Maackia amurensis</i> Lektin II
MPL	<i>Maclura pomifera</i> Lektin
NPL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Lektin
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> Erythroagglutinin
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leukoagglutinin

Abkürzungsverzeichnis

PNA	Peanut Agglutinin
PSA	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin
PTL	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> Lektin
RCA-I	<i>Ricinus communis</i> Agglutinin I
SBA	Soybean Agglutinin
SJA	<i>Sophora japonica</i> Agglutinin
SNA	<i>Sambuccus nigra</i> Agglutinin
STL	<i>Solanum tuberosum</i> Lektin
sWGA	succinyliertes Wheat germ Agglutinin
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> Agglutinin I
VVA	<i>Vicia villosa</i> Lektin
WFA, WFL	<i>Wisteria floribunda</i> Lektin
WGA	Wheat germ Agglutinin

1 EINLEITUNG

Ein römisches Sprichwort besagt: „*Prodest cautela plus quam postremo querela*“, was im Deutschen so viel heißt wie „Vorsorge nützt mehr als die Klage hinterher“ oder auch „Vorsicht ist besser als Nachsicht“. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist ein Bakterium, für das dieser Ausspruch treffender nicht sein könnte. Der Erreger der Paratuberkulose des Rindes und anderer Wild- und Hauswiederkäuer steht schon seit Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts im Verdacht, an der Entstehung von Krankheiten des Menschen, insbesondere Morbus Crohn, beteiligt zu sein (Garvey, 2018). Auch heute noch ist die wissenschaftliche Beweislage uneindeutig und wird teilweise kontrovers diskutiert (Garvey, 2018; Robertson et al., 2017).

Dabei ist vor allem der Konsum von Milch und Milchprodukten ein allgemein anerkannter Expositionsweg des Menschen, nicht zuletzt dadurch, dass eine Abtötung von MAP durch die Pasteurisierung nicht gewährleistet werden kann (Mullan, 2019).

Da MAP wie die meisten Mykobakterien eine hohe Resistenz gegen gebräuchliche Antibiotika aufweist, ist eine Behandlung sehr schwierig (Brennan and Nikaido, 1995; Niederweis, 2003). Auch wenn nicht hundertprozentig erwiesen ist, dass MAP Morbus Crohn und andere Krankheiten des Menschen auslösen kann, gibt es doch starke Hinweise auf eine Korrelation, welche bislang nicht widerlegt werden konnten (Garvey, 2018; Robertson et al., 2017). Aufgrund dieser Unsicherheit bezüglich der Rolle von MAP als Pathogen für den Menschen herrscht unter Wissenschaftlern im Bereich Lebensmittelsicherheit ein allgemeiner Konsens, dass die Exposition des Menschen mit MAP vorsorglich möglichst minimiert werden sollte (Foddai and Grant, 2017). Dafür ist es notwendig, MAP im Lebensmittel schnell, sensitiv und spezifisch nachzuweisen.

Etablierte Kontrollsysteme für die Sicherstellung der Hygiene von Konsummilch sind nicht in der Lage, eine Kontamination mit MAP zuverlässig festzustellen, vor allem, weil die Anzucht von MAP schwierig und langwierig ist und erst nach Ablauf mehrerer Wochen eine verlässliche Aussage getroffen werden kann (Cocito et al., 1994). Sensitivere und schnellere Methoden wie PCR können hingegen keine Aussage über die Viabilität der Bakterien und somit ihr infektiöses Potential treffen (Slana et al., 2008). Über eine spezifische Voranreicherung von MAP aus Milch können sowohl

Sensitivität als auch Spezifität der eingesetzten Nachweismethoden erhöht werden (Foddai et al., 2010). Es ist bekannt, dass MAP über Glycostrukturen auf seiner Oberfläche mit Makrophagen und anderen Wirtszellen kommunizieren kann (Busatto et al., 2019). Diese Strukturen gelten als wesentlicher Pathogenitätsfaktor von MAP und müssen daher auf der Oberfläche von MAP für Interaktionen mit Rezeptoren zugänglich sein. Aus diesem Grund könnten sie als Ziel MAP-bindender Moleküle für die Voranreicherung von MAP infrage kommen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Gruppe von 36 Pflanzenlektinen hinsichtlich ihrer Bindung an Glycostrukturen auf der Oberfläche von MAP und damit ihrer Eignung zur Entwicklung eines spezifischen und sensitiven Voranreicherungsverfahrens zu testen, das den Nachweis von MAP in Milch erleichtern und somit eine mögliche Aufnahme infektiöser Erreger durch den Menschen verhindern soll.

2 LITERATUR

2.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

2.1.1 Taxonomie und Morphologie

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist ein obligat pathogenes Bakterium aus der Familie der *Mycobacteriaceae* und der Erreger der Paratuberkulose oder Johnsenen Erkrankung beim Wiederkäuer (Twortand Ingram, 1913; Twort et al., 1912). Mykobakterien sind aerobe, gram-positive, säurefeste Stäbchenbakterien mit einer dicken, wachsartigen Zellwand (van Winden et al., 2019). Sie werden traditionell in verschiedene phänotypische Gruppen (Runyon-Gruppen) unterteilt, abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, Pathogenität und Koloniemorphologie (Runyon, 1959). MAP wird dabei zu den langsam wachsenden, nicht photochromogenen Mykobakterien (Gruppe III) gezählt (Rogall et al., 1990). Nahe verwandte, langsam wachsende Mykobakterien sind unter anderem auch *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium bovis*, die Erreger der Tuberkulose des Menschen bzw. des Rindes sowie *Mycobacterium leprae*, der Erreger der Lepra (Hessand Rambukkana, 2019; van Pittius et al., 2006; van Winden et al., 2019). Anders als der Name „Paratuberkulose“ vielleicht vermuten lässt, ist MAP aber nicht Teil des *Mycobacterium tuberculosis* Komplexes (MTBC), sondern wird genetisch dem *Mycobacterium avium* Komplex (MAC) zugeordnet (Thorel et al., 1990). Dieser besteht neben MAP und *Mycobacterium avium* subsp. *avium* u.a. noch aus *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* und *Mycobacterium intracellulare* (Busatto et al., 2019). Diese Subspezies ähneln sich untereinander sehr stark und sind oft weder phänotypisch noch serologisch voneinander unterscheidbar (Busatto et al., 2019). Trotz dieser genetischen Verwandtschaft unterscheidet sich MAP doch in einigen Punkten deutlich von den anderen Vertretern des MAC: Eine Besonderheit von MAP ist sein extrem langsames Wachstum (Generationszeit *in vitro* ein bis mehrere Tage) (Elguezabal et al., 2011). Dieses Wachstum ist *in vitro* außerdem abhängig von der Zugabe eines Eisen-Chelators namens Mycobaktin, welchen andere Mykobakterien selbst synthetisieren und sich dadurch auch außerhalb ihres Wirtes vermehren können (Barclayand Ratledge, 1983).

2.1.2 Zellwand und Tenazität

Bakterien der Gattung *Mycobacterium* zeichnen sich vor allem durch ihre besondere, lipidhaltige Zellwand aus, welche ihnen außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse, Desinfektionsmittel und antimikrobielle Wirkstoffe verleiht (Chiaradia et al., 2017). Der grundlegende Aufbau der Zellhülle ist für alle Mykobakterien gleich und stellt sich in drei großen Untereinheiten dar, der Außenschicht (outermost layer) oder Kapsel, der Zellwand und einer konventionellen Plasmamembran (Daffé et al., 2017). Die Zellwand lässt sich wiederum in ein inneres und ein äußeres Blatt unterteilen (Daffé et al., 2017). Das äußere Blatt besteht zum Großteil aus freien (d.h. nicht kovalent verankerten) Lipiden, wie Phospholipiden und Mycolaten mit Trehalose. Das innere Blatt hingegen zeigt den für Mykobakterien charakteristischen Aufbau aus langkettigen (bis C90) Fettsäuren, auch Mycolsäuren genannt, die mit Arabinogalactan verestert sind, welches seinerseits kovalent an Peptidoglycan gebunden ist (Daffé et al., 2017; Marrakchi et al., 2014). Diese Schicht ist für die hydrophoben Eigenschaften der Mykobakterien und ihre Säurefestigkeit essentiell (Chiaradia et al., 2017). Die äußerste Schicht der Mykobakterien ist gleichzeitig auch die variabelste und ist maßgeblich an deren Immunogenität und vor allem an deren Pathogenität beteiligt. So enthält die Kapsel von *Mycobacterium avium* und seinen Subspezies sogenannte Glycopeptidolipide (GPL), die als wesentlicher Pathogenitätsfaktor des MAC gelten (Busatto et al., 2019). Durch diesen charakteristischen, mehrschichtigen Zellwandaufbau sind Mykobakterien extrem resistent gegen Hitze, Kälte, UV-Strahlung und osmotischen Stress sowie gegen Behandlung mit Säuren und Laugen (Santos et al., 2015; Shin et al., 2008). Der hohe Grad an Hydrophobizität ihrer Zellwand führt zudem dazu, dass antimikrobielle Wirkstoffe nur schwer in die Zelle eindringen können, was Mykobakterien gegen die meisten herkömmlichen Antibiotika resistent macht (Brennan and Nikaido, 1995; Niederweis, 2003). Lipophilere Wirkstoffe, wie Makrolidantibiotika oder Tetrazykline, können leichter durch die Zellwand diffundieren (Brennan and Nikaido, 1995). Die Standardtherapie einer Infektion mit *M. avium* beim Menschen sieht daher eine Behandlung mit einem Makrolidantibiotikum wie Azithromycin oder Clarithromycin, in Kombination mit Ethambutol und Rifamycin, vor (Griffith et al., 2007).

2.1.3 Resistenz gegen Pasteurisierung

Ursprünglich zur Unschädlichmachung von *Mycobacterium tuberculosis* entwickelt und später für die Inaktivierung von *Coxiella burnetii* angepasst, stellt die Pasteurisierung eine effektive Methode zu Erhaltung der öffentlichen Gesundheit dar (Juffsand Deeth, 2007). Nach den Vorgaben des Codex Alimentarius wird dabei jedes Partikel der Milch 15 Sekunden auf 72°C oder 30 Minuten auf 63°C erhitzt (FAO/WHO, 2004). Trotz dieser Hitzebehandlung werden immer wieder lebende MAP in pasteurisierten Milchprodukten gefunden, was zu der Diskussion führte, ob MAP womöglich die kommerzielle Pasteurisierung überleben kann (Chiodiniand Hermon-Taylor, 1993; Gerrard et al., 2018; Grant et al., 1999; Paolicchi et al., 2012). Theorien für ein solches Überleben besagen, dass die häufig beobachtete Tendenz von MAP, Zellklumpen zu bilden, zu einer heterogenen Verteilung der Bakterien in der Milch führt, welche die Abtötung durch Pasteurisierungsmaßnahmen beeinflussen kann (Grant et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit ist, dass MAP in Milch intrazellulär in somatischen Zellen vorliegt und so vor der Pasteurisierung geschützt ist (Gerrard et al., 2018). Auch die Bildung einer sporenhähnlichen, hitzeresistenten Form wird diskutiert (Lamont et al., 2012a). Kritiker dieser Theorien bringen dagegen an, dass viele Versuche zur Hitzeinaktivierung von MAP unter unzureichenden Bedingungen durchgeführt wurden und dass für aussagekräftige Ergebnisse industrielle Standards verwendet werden müssen (Durchflusserhitzung mit turbulenter Strömung und ausreichender Haltezeit) (Cerfand Griffiths, 2000; Condron et al., 2015). Mit dieser Methodik gibt es Studien, die eine Inaktivierung von MAP erreichen (Lynch et al., 2007; Rademaker et al., 2007), aber auch ein Überleben von MAP unter diesen Konditionen wird beschrieben (Grant et al., 2002). Da die Prävalenz von MAP in pasteurisierter Milch sehr gering ist, kommt auch eine nachträgliche Kontamination der bereits hitzebehandelten Milch oder Fehlfunktionen der technischen Anlagen in Frage (Robertson et al., 2017). Auch wenn bis dato nicht endgültig geklärt werden konnte, warum, so ist doch unumstößlich, dass lebende MAP nachweislich in pasteurisierter Milch und daraus hergestellten Produkten vorhanden sein können und somit durch den Menschen aufgenommen werden können (Mullan, 2019).

2.2 Paratuberkulose

2.2.1 Pathogenese

„The Johne’s Disease causes death without estimation and is called a silent killer.“
(Eslami et al., 2019)

In Anbetracht der schweren klinischen Symptome der Johneschen Erkrankung erscheint diese Aussage erst einmal schwer nachvollziehbar. An Paratuberkulose erkrankte Kühe sind oft bis aufs Skelett abgemagert, dehydriert und leiden an schwerem, chronischen Durchfall (FLI, 2018). Jedoch liegt die wahre Gefahr dieser Erkrankung tatsächlich im Verborgenen und zwar in ihrer extrem langen und symptomlosen Inkubationszeit. Während klinisch erkrankte Tiere meist im adulten Alter sind (zwischen drei und sechs Jahren), so haben sie sich in der Regel bereits im Kälberalter infiziert (Windsor and Whittington, 2010). Der Hauptübertragungsweg ist die fäkal-orale Aufnahme von MAP (McAloon et al., 2019). Kälber können aber auch bereits intrauterin oder aerogen über Stallstaub infiziert werden (Eisenberg et al., 2011; Whittington and Windsor, 2009). Im Ileum gelangen die Mykobakterien dann über Enterozyten oder die M-Zellen der Peyer’schen Platten in die Submucosa, wo sie von Makrophagen aufgenommen werden (Bermudez et al., 2010; Momotani et al., 1988). Zusätzlich beeinflusst MAP die Integrität der Darmschranke durch Schwächung der Tight-Junctions, wodurch weitere Erreger parazellulär eindringen können (Bannantine and Bermudez, 2013). Nach der Aufnahme in die Enterozyten löst MAP dort eine Ansäuerung des Endosoms aus, was zu einer Ausschüttung von Interleukin-1 β (IL-1 β) führt (Lamont et al., 2012b). Dadurch werden Makrophagen zur Eintrittsstelle gelockt, welche die eingedrungenen MAP phagozytieren (Lamont et al., 2012b). Wie effektiv dieser Invasionsmechanismus ist, wird durch die Geschwindigkeit des Vorgangs deutlich. Bei einem Versuch zur artifizialen Infektion von Kälbern, bei dem 10ml einer MAP Suspension mit 10^7 - 10^8 cfu/ml chirurgisch direkt ins Ileum der Kälber eingebracht wurden, konnten bereits eine Stunde nach der Inokulation MAP in den regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden (Wu et al., 2007). Über die Interaktion von Glycopeptidolipiden (GPL) auf der Oberfläche von MAP mit Mannoserezeptoren der Makrophagen verhindert MAP dort die Bildung eines Phagolysosoms und kann so im Inneren der Makrophagen persistieren und sich dort vermehren (Shimada et al., 2006; Sweet et al., 2010). Im weiteren Verlauf unterdrückt MAP auch die proinflammatorische Immunantwort des Wirtes. So wurde

eine unterdrückte Genexpression für inflammatorische Zytokine wie die Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-12 sowie Interferon gamma (IFN γ) und Tumornekrosefaktor (TNF) nach MAP-Infektion nachgewiesen (Khare et al., 2012). Nach einer variablen Inkubationszeit kann eine erste Reaktion des Immunsystems auf die Infektion beobachtet werden. Diese auch als tuberkuloide Stadium bezeichnete Phase ist geprägt von einer zellmedierten Th1-Immunantwort mit IFN γ -mediierter Aktivierung von Makrophagen (Begg et al., 2018; Chiodini et al., 1984). Bovine PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) zeigten *in vitro* nach Aktivierung durch IFN γ erhöhte Produktion von NO (Stickstoffmonoxid) (Khalifeh et al., 2009), welches in Makrophagen eine wichtige Rolle in der Abtötung phagozytierter Erreger spielt (Chakravortty and Hensel, 2003). Dabei ist die Intensität dieser IFN γ -Immunantwort entscheidend für den weiteren Verlauf der Erkrankung. So zeigten in einem Infektionsversuch Kälber mit niedriger IFN γ -Ausschüttung stärkere histopathologische Veränderungen als solche mit viel IFN γ , bei denen sogar in einem Fall eine Regression der histopathologischen Veränderungen und somit offenbar eine Elimination der Erkrankung möglich war (Begg et al., 2018). Im Anschluss an die tuberkuloide Phase der Infektion folgt ein Shift, hin zu einer Th2-vermittelten Immunantwort (Begg et al., 2018). Diese auch leproide Stadium genannte Phase zeichnet sich durch eine vornehmlich humorale Immunantwort mit der Bildung großer Mengen von Antikörpern aus (Begg et al., 2018; Stabel et al., 2011). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Verlagerung des Schwerpunktes der Immunantwort sind komplex und konnten bislang nicht eindeutig geklärt werden (Koets et al., 2015). Die humorale Immunantwort ist allerdings nicht protektiv und verhindert nicht das Fortschreiten der Erkrankung und der pathologischen Veränderungen (Manning and Collins, 2001). Da gleichzeitig auch die protektive Th1-Antwort abnimmt, kommt es zu einer schnellen Ausbreitung der Infektion im Wirt und Manifestation der klinischen Erkrankung (Stabel, 2000).

2.2.2 Krankheitsverlauf (nach Whitlock und Buergelt 1996)

Traditionell wird der Verlauf der Johneschen Erkrankung in vier Stadien unterteilt (Whitlock and Buergelt, 1996):

- 1: Stille Infektion
- 2: Subklinische Infektion
- 3: Klinische Erkrankung
- 4: Fortgeschrittene klinische Erkrankung

Die Anfangsphase der MAP-Infektion wird auch als „stille Infektion“ bezeichnet (Whitlock and Buergelt, 1996). In diesem Stadium hat MAP zwar bereits die Darmschranke durchbrochen und wurde von Makrophagen aufgenommen, eine messbare Immunreaktion auf die Infektion hat aber noch nicht stattgefunden (Begg et al., 2018). Die einzige Methode, die Erreger während dieser stillen Infektion nachzuweisen, ist über die histologische Untersuchung von Gewebeproben, vor allem, da ein Nachweis von MAP DNA oder gar lebenden MAP im Kot der Tiere in diesem Stadium auch das Resultat einer „passiven Ausscheidung“ sein kann, bei der oral aufgenommene MAP wieder mit dem Kot ausgeschieden werden, ohne das Tier zu infizieren (Begg et al., 2018). Im Anschluss an die stille Phase folgt der Übergang zu einer subklinischen Infektion. Subklinisch infizierte Tiere zeigen immer noch keine klinischen Symptome, haben aber unter Umständen Antikörper gegen MAP oder eine nachweisbare zelluläre Immunantwort (Whitlock and Buergelt, 1996). Eine Ausscheidung von MAP über Kot und Milch ist möglich, jedoch würde wegen der stark intermittierenden Ausscheidung der Erreger und der nur sporadischen Antikörperbildung ein großer Teil der Tiere bei einer serologischen Untersuchung oder einer kulturellen Kotuntersuchung nicht als positiv eingestuft und deshalb übersehen werden (Begg et al., 2018). Diese Tiere gelten als der größte Risikofaktor in der Übertragung der Erkrankung, da sie zwar infektiöse Erreger über Kot und Milch ausscheiden können, aber in der Regel nicht als Ausscheider erkannt werden (McKenna et al., 2006). Das dritte Stadium der Erkrankung, die klinische Infektion tritt nach einer Inkubationszeit von 2-10 Jahren auf (Whitlock and Buergelt, 1996). Diese Tiere zeigen bereits erste Anzeichen der Erkrankung, wie Abmagerung bei erhaltener oder (selten) erhöhter Futteraufnahme, wobei auch erste intermittierende Durchfallepisoden zu beobachten sind (Whitlock and Buergelt, 1996). Blutproben der Tiere in diesem Stadium weisen bereits Auffälligkeiten auf und viele der Ausscheider

können mittels Kotuntersuchung oder serologischen Tests identifiziert werden (Tiwari et al., 2006). Nach 3-4 Monaten geht die Infektion schließlich in das Endstadium über (Tiwari et al., 2006). Hier bietet sich dann das oben beschriebene Bild der lethargischen, abgemagerten Kühe mit wässrigem Durchfall (Cocito et al., 1994). Am Ende einer klinischen Infektion mit MAP steht ausnahmslos immer der Tod des Tieres (Eslami et al., 2019). Die wirtschaftlichen Schäden der Paratuberkulose entstehen aber nicht nur aus klinisch erkrankten Tieren. Diese bilden nur die sprichwörtliche „Spitze des Eisbergs“ (Whitlock and Buerget, 1996). Auf ein Tier im Endstadium der Erkrankung kommen im selben Betrieb in der Regel 4-8 subklinisch infizierte Tiere und 10-14 Tiere mit einer stillen Infektion (Whitlock and Buerget, 1996). Die wirtschaftlichen Einbußen, die durch die jahrelange verminderte Milchleistung und das verzögerte Wachstum dieser Tiere entstehen, sind erheblich (Bates et al., 2018; Raizman et al., 2009). Nicht selten werden auch Tiere wegen dieser Kriterien ausgemustert und geschlachtet, ohne dass diese Verluste auf das Konto der Paratuberkulose geschrieben werden (Tiwari et al., 2006). Deshalb ist die Zahl der tatsächlichen Opfer von MAP nur schwer einzuschätzen, was es zurecht zu einem „lautloser Killer“ macht.

2.3 MAP beim Menschen

2.3.1 Wirtsspektrum

Obwohl hauptsächlich Rinder und andere Wiederkäuer an Paratuberkulose erkranken, so sind sie nicht die einzigen Spezies, die von einer MAP-Infektion betroffen sein können, auch wenn diese in jenen nicht immer eine Erkrankung auslösen muss. So wurde MAP unter anderem in verschiedenen domestizierten und wilden Wiederkäuerarten (Rotwild, Dammwild, Mufflons), Mäusen, Dachsen, Füchsen, Bären, Kaninchen, Wildschweinen, Ottern und diversen Marderarten nachgewiesen (Beard et al., 2001; Kopecna et al., 2008; Waddell et al., 2016a). Auch Infektionsversuche an Pferden zeigten eine Empfänglichkeit dieser Spezies für MAP-Infektionen (Pavlik et al., 2004). Auch wenn die Umbenennung von *Mycobacterium paratuberculosis* zu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* nicht auf der Infektion von Vögeln beruhte, sondern hauptsächlich auf der genetischen Verwandtschaft mit *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Thorel et al., 1990), konnte MAP mittlerweile auch in einigen Vogelarten, wie Spatzen, Möwen, Dohlen oder

Staren, nachgewiesen werden (Waddell et al., 2016a). Auch in nichtmenschlichen, freilebenden und in Gefangenschaft lebenden Primaten (Bärenmakaken und Rhesusmakaken) wurden bereits natürliche Infektionen mit MAP festgestellt sowie bei einem im Zoo von Chicago lebenden, erkrankten Mandrill (McClure et al., 1987; Singh et al., 2011; Zwick et al., 2002).

2.3.2 MAP und Morbus Crohn

Noch bevor Burrill Bernard Crohn seine Abhandlung über die regionale Ileitis verfasste, die später nach ihm benannt werden sollte (Crohn et al., 1932), fiel dem schottischen Chirurgen Thomas Kennedy Dalziel die Ähnlichkeiten der, damals noch „chronische intestinale Enteritis“ genannten menschlichen Erkrankung, mit der erst kurz zuvor beschriebenen Johneschen Erkrankung des Rindes auf (Dalziel, 1913; Johnes and Frothingham, 1895). Dalziel gelang es allerdings damals nicht, säurefeste Stäbchen im Darm der Patienten nachzuweisen und den Zusammenhang somit zu bestätigen. Auch heute noch ist ungeklärt, ob MAP tatsächlich der Erreger der inflammatory bowel diseases (IBD) ist, zu denen Morbus Crohn und ulzerative Kolitis zählen, ob MAP nur eine Rolle in deren Pathogenese spielt, aber nicht der alleinige Auslöser ist, oder aber ob MAP mit deren Entstehung überhaupt nichts zu tun hat. Das klinische Bild beider Erkrankungen ähnelt sich sehr, dennoch gibt es auch einige Unterschiede: So zeigt Paratuberkulose keine segmentale Lokalisation, ebenso fehlen einige der Komplikationen von Morbus Crohn (Fisteln, Fissuren, Blutungen, Stenosen, Adhäsionen, Perforationen und Abszessbildung) (Liverani et al., 2014).

Ein guter Ansatz, um die Kausalität einer Erkrankung durch ein Pathogen zu beurteilen, sind Kochs Postulate (Koch, 1882; Loeffler, 1884). Demnach ist ein Erreger ursächlich für eine Erkrankung, wenn er in jedem Fall der Erkrankung vorhanden ist, wenn er aus dem Patienten isoliert (1) und in Reinkultur angezüchtet werden kann (2). Weiterhin muss ein empfänglicher Patient, der mit Erregern aus dieser Reinkultur infiziert wird, dieselbe Erkrankung entwickeln wie der ursprüngliche Wirt (3), wobei es auch möglich sein muss, die Pathogene aus dem zweiten Wirt wieder isolieren zu können (4).

Zu (1) Nachweis in erkrankten Patienten:

Bull et al (2003) fanden MAP-DNA in über 90% der untersuchten Darmbiopsien von Crohn-Patienten. Untersuchte Biopsien gesunder Kontrollpatienten waren dagegen nur in 26% der Fälle positiv ($p=0,0002$) (Bull et al., 2003). Lebende MAP konnten

dabei nur aus 60% der Crohn-Patienten und 9% der Kontrollen kultiviert werden (MGIT-Röhrchen, Identifikation durch IS-900 PCR; $p=0,0019$) (Bull et al., 2003). Jeyanathan et al. (2017) untersuchten Paraffinschnitte aus Darmresektionen von Crohn-Patienten und Kontrollen. Dabei wurden MAP mikroskopisch in 59% der Crohn-Patienten und 14% der Kontrollpatienten nachgewiesen ($p=0,002$) (Jeyanathan et al., 2007). In einer aktuelleren Studie wurde die Assoziation von MAP mit IBD mittels verschiedener Assays untersucht und mit alters- und geschlechtsspezifischen Kontrollgruppen verglichen. Untersucht wurden Biopate von 22 Patienten mit Morbus Crohn und ebensovielen Kontrollpatienten mittels Kultur und qPCR (IS900 und F57). Als positiv wurden dabei nur Proben eingestuft, die in allen drei Assays positiv waren. Dabei waren die Biopate von 29% der Morbus Crohn Patienten und 0% der Kontrollpatienten positiv, wodurch sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,02$) ergibt (Timms et al., 2016). Auch aus dem Blut (Naser et al., 2004) und sogar der Muttermilch von IBD-Patienten (Naser et al., 2000) wurden bereits lebende MAP kultiviert.

Auch wenn viele Studien den Nachweis von MAP in Patienten mit Morbus Crohn beschreiben, kann MAP jedoch längst nicht in allen Patienten nachgewiesen werden. Allerdings ist der Nachweis von MAP im Patienten alles andere als einfach und den eingesetzten Nachweismethoden mangelt es an Sensitivität und Spezifität (siehe Kapitel 2.5). Ferner konnte MAP aber auch im Darm gesunder Menschen nachgewiesen werden. Dies könnte nun heißen, dass keine Kausalität, sondern nur eine Korrelation von MAP und Morbus Crohn vorliegt, wobei nicht sicher gesagt werden kann, ob MAP vermehrt zu Morbus Crohn führt oder ob Crohn-Patienten anfälliger für eine Besiedelung mit MAP sind (Liverani et al., 2014). Allerdings löst auch *Mycobacterium tuberculosis* nicht in allen infizierten Patienten eine Erkrankung aus. So sind weltweit geschätzte 1,7 Milliarden Menschen infiziert, doch nur in 5-10% der Fälle manifestiert sich eine Erkrankung (WHO, 2018).

Zu (2) Anzucht in Reinkultur:

Das zweite Postulat hat mittlerweile etwas an Bedeutung verloren, da es in manchen Fällen gar nicht erfüllt werden kann. Ein gutes Beispiel dafür ist *Mycobacterium leprae*, bei dem eine Anzucht in Reinkultur technisch gar nicht möglich ist (Gupta and Katoch, 1995). Nichtsdestotrotz gilt *Mycobacterium leprae* allgemein als Erreger der Lepra (Monot, 2005). Auch bei viralen Erkrankungen ist eine Anzucht des Erregers in der Regel nicht möglich. Zwar ist die Anzucht von MAP nicht unmöglich, jedoch mit

einigen Schwierigkeiten verbunden. Erschwerende Faktoren dabei sind zum einen das extrem langsame Wachstum von MAP und seine Abhängigkeit von einer organischen Eisenquelle (siehe Kapitel 2.1.1). Es wurde zudem beschrieben, dass MAP im Menschen teilweise mit veränderter oder ganz ohne Zellwand vorliegen kann, wodurch konventionelle Färbemethoden, wie die Ziehl Neelsen-Färbung und Phenyl-Auramin-Färbung, fehlschlagen und falsch-negative Ergebnisse liefern können (Sechi et al., 2005). Diese Schwierigkeiten führen zu einer verminderten Sensitivität der kulturellen Nachweismethoden. Der Nachweis von MAP-DNA mittels PCR verspricht weit höhere Sensitivität, jedoch kann damit keine Aussage über die Viabilität des Erregers getroffen werden (Butot et al., 2019). Die nachgewiesene DNA kann also von lebenden, aber auch von längst eliminierten MAP-Zellen stammen.

Zu (3) und (4) Reinfektion in einem empfänglichen Wirt und Reisolierung:

Da Infektionsversuche am Menschen natürlich aus moralischer und ethischer Sicht nicht in Frage kommen, gilt für viele Wissenschaftler das dritte Postulat weiterhin als nicht erfüllt (Over et al., 2011). Dies kann aber mittels eines Tierversuches umgangen werden, da nur von einer „empfänglichen Spezies“ die Rede ist. Van Kruiningen et al. infizierten bereits 1986 junge Ziegen mit MAP, die aus einem menschlichen Patienten isoliert worden waren. Die infizierten Ziegen erkrankten daraufhin an einer granulomatösen Ileitis ähnlich der des menschlichen Patienten (Van Kruiningen et al., 1986). Aus diesen Tieren konnte MAP ebenfalls wieder isoliert werden. Dadurch können das dritte und vierte Postulat als erfüllt angesehen werden. Ein weiteres Argument für die Rolle von MAP in Morbus Crohn ist, dass viele Patienten mit einem akuten Schub der Erkrankung Linderung und sogar eine Remission nach Behandlung mit antimykobakteriellen Wirkstoffen erfahren (Feller et al., 2010). RHB-104, eine vielversprechende Kombination aus Clarithromycin, Clofazimin und Rifabutin zeigte eine bakterizide Wirkung auf MAP-Zellen *in vitro*, wobei MAP-Zellen (16 Stämme aus klinischen Isolaten von Patienten mit Morbus Crohn) direkt mit RHB104 inkubiert wurden (Alcedo et al., 2016). In einer laufenden klinischen Studie zeigten mit RHB-104 behandelte Patienten ebenfalls signifikant erhöhte Remissionsraten im Vergleich zur Placebo-Gruppe (<https://www.empr.com/home/news/drugs-in-the-pipeline/anti-map-therapy-beneficial-in-phase-3-crohns-disease-trial/>; letzter Zugriff 22.08.2019).

Da MAP deutlich häufiger in Crohn-Patienten nachzuweisen ist als in gesunden Kontrollen, ist eine Korrelation nicht umstritten (Robertson et al., 2017). Allerdings

spricht der Nachweis von MAP in ebenjenen Kontrollen dafür, dass die Anwesenheit von MAP alleine nicht ausreichend ist um eine Erkrankung auszulösen. Ebenfalls ist unklar, ob MAP das „primum movens“ der Erkrankung ist oder ob der bereits entzündete Darm im Nachhinein vermehrt mit MAP besiedelt wird (Liverani et al., 2014). Laut dem aktuellen Stand der Wissenschaft ist Morbus Crohn das Ergebnis der komplexen Interaktion genetischer, immunologischer und umweltassoziierter Faktoren und kann in empfänglichen Patienten durch die Anwesenheit von Mikroorganismen getriggert werden (Robertson et al., 2017). Alle dieser Faktoren sind notwendig und keiner davon reicht aus, um, alleine betrachtet, die Ätiopathogenese zu erklären (Liverani et al., 2014). Eine Rolle von MAP in diesem Geschehen kann somit derzeit nicht eindeutig belegt, aber auch nicht ausgeschlossen werden.

2.3.3 Beteiligung an anderen Erkrankungen des Menschen

Nicht nur IBD steht im Fokus der MAP-Forscher, auch andere, meist als autoimmun eingestufte Erkrankungen des Menschen werden mittlerweile mit MAP in Verbindung gebracht. Der zugrundeliegende Gedanke dabei beruht auf der Fähigkeit von MAP zur molekularen Mimikry (Garg et al., 2018). Dabei ähneln manche Epitope eines Pathogens so sehr körpereigenen Epitopen, dass eine Kreuzreaktivität des Immunsystems zwischen dem Pathogen und körpereigenen Zellen entsteht. Diese Kreuzreaktivität kann dann zu Krankheitssymptomen führen, die als autoimmun bedingt eingestuft werden (Garg et al., 2018). Autoimmunerkrankungen, die bisher mit MAP in Verbindung gebracht wurden, sind Typ1 Diabetes (T1D), Hashimoto-Thyreoiditis (HT), multiple Sklerose (MS), rheumatoide Arthritis (RA) und Neuromyelitis optica (Bo et al., 2018; Garvey, 2018; Slavin et al., 2018). Autoimmunerkrankungen liegt in den meisten Fällen eine genetische Disposition zugrunde, die in Verbindung mit den entsprechenden Umwelteinflüssen (z.B. ein Pathogen) zur Ausbildung der Erkrankung führen kann (Kamradt et al., 2005). Die Rolle von MAP wird im Zusammenhang mit diesen Krankheiten also weniger als Erreger der Erkrankung gesehen, als vielmehr als möglicher triggernder Umweltfaktor (Garvey, 2018). Ein gutes Beispiel für eine genetische Disposition ist die Mutation des SLC11A1-Gens des Menschen, welches ein Membranprotein auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen codiert (Paccagnini et al., 2009).

Menschen mit dieser Mutation sind nicht nur anfälliger für Infektionen mit MAP, sondern erkranken auch häufiger an T1D, RA und HT (Paccagnini et al., 2009; Yang et al., 2000). Bei allen drei Erkrankungen wurden Kreuzreaktionen des Immunsystems mit dem MAP-Protein HSP65 beobachtet, welches Sequenzähnlichkeiten mit humanen Hitzeschock-Proteinen und der Glutamat-Dehydrogenase (GAD) der pankreatischen Inselzellen aufweist (D'Amore et al., 2010; Dow, 2012; Dowand Sechi, 2011). Ein weiteres wichtiges Ziel von Autoantikörpern in T1D und HT ist der Zink Transporter-8 (ZnT8), dieser kommt auf β -Zellen des Pankreas sowie auf follikulären und parafollikulären Epithelzellen der Schilddrüse vor und ähnelt dem MAP-Protein MAP3865c (Masala et al., 2015; Sechiand Dow, 2015).

In zwei auf Sardinien durchgeführten Studien konnte MAP-DNA im Blut von 63% der untersuchten Typ1 Diabetiker (im Vergleich zu 16% bei nicht-Diabetikern) nachgewiesen werden sowie ein Zellmembranprotein von MAP im Blut von 47% der Patienten mit T1D (verglichen mit 8% bei T2D und 13% bei gesunden Kontrollen) (Bitti et al., 2012; Rosu et al., 2009). In einer anderen Studie wurde der Nachweis von Antikörpern gegen HSP60 in 70% der untersuchten T1D Patienten beschrieben, verglichen mit nur 4% bei gesunden Kontrollen (Rani et al., 2010).

Sardinien gilt weltweit als Region mit der höchsten Inzidenz an autoimmuner MS, wobei MAP DNA (IS900 PCR) dort im Blut von 42% der untersuchten MS-Patienten, aber nur in 6,3% der gesunden Kontrollen nachgewiesen wurde (Cossu et al., 2011). Ebenso wurden erhöhte Titer an Antikörpern gegen das MAP-Protein HSP-70 in sardinischen MS-Patienten beschrieben, welches wiederum dem humanen HSP-70 ähnelt (Cossu et al., 2013). Auch in japanischen MS-Patienten konnten Antikörper gegen Mimikry-Epitope von MAP festgestellt werden (Cossu et al., 2016; Yokoyama et al., 2018).

Lange als eine schwere Verlaufsform von MS gehandelt, wird Neuromyelitis optica mittlerweile als eigenständige Erkrankung anerkannt (Zhong et al., 2018). Wie auch für MS und andere Autoimmunerkrankungen werden hier mehrere pathogene Mikroorganismen (u.a. *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* und das Epstein-Barr Virus) als mögliche auslösende Umweltfaktoren in Betracht gezogen (Zhong et al., 2018). Eine Studie mit Fokus auf MAP beschreibt erhöhte Antikörperbildung gegen ein MAP-Protein mit Ähnlichkeit zum humanen Myelin Basic Protein (MBP) und MBP selbst (44% vs. 5% (Kontrollgruppe) bzw. 50% vs. 2%

(Kontrollgruppe)) (Bo et al., 2018). Ebenso fanden Slavin et al. (2018) erhöhte Antikörpertiter gegen zwei sekretierte Antigene von MAP (Tyrosin-Phosphatase A und Proteinkinase G) in den Seren von Patienten mit MS und Neuromyelitis optica (Slavin et al., 2018).

Aber nicht nur Autoimmunerkrankungen werden mit MAP assoziiert, auch diversen Arten von Tumoren wird ein Zusammenhang mit MAP zugeschrieben, darunter kolorektale Karzinome, ösophageale Adenokarzinome und Glioblastome (Pierce, 2018a; Pierce, 2018b; Pierce, 2019). Die ersten beiden Annahmen basieren auf der Beobachtung, dass MAP im Rind Becherzellhyperplasie auslösen kann (Charavaryamath et al., 2013; Khare et al., 2009). Diese ist sowohl eine Vorstufe des kolorektalen Karzinoms, als auch eine Komplikation in Patienten mit Barrett-Ösophagus, wo Becherzellen durch eine metaplastische Umwandlung des ösophagealen Epithels, meist nach chronischer Refluxkrankheit, entstehen (Pierce, 2018a; Pierce, 2018b). Die Entartung dieser metaplastischen Becherzellen kann dann zur Bildung eines ösophagealen Adenokarzinoms führen (Pierce, 2018a). Laut einer Publikation ist MAP in der Lage, auch menschliche Becherzellen zu infizieren (Golan et al., 2009). Ebenso stellt das durch die Refluxkrankheit entstandene saure Milieu eine gute Nische für eine MAP Infektion dar (Pierce, 2018a). Ein Nachweis von MAP in Patienten mit Barrett-Ösophagus oder ösophagealem Adenokarzinom wurde jedoch bisher nicht beschrieben (Pierce, 2018a). Bei zwei Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden allerdings histologisch Mykobakterien des MAC als Zufallsbefund festgestellt (Pierce, 2018b).

Die Assoziation von MAP mit Glioblastomen wird hauptsächlich begründet durch die erhöhte Anzahl an diffusen Gliomen bei Landwirten, Baseball- und Tennisspielern (also Sportlern, die viel direkten Kontakt mit potenziell kontaminiertem Dreck und Staub haben) in ländlichen Gebieten mit hohem Anteil an Tierhaltung (Schafe und Rinder) und histopathologische Ähnlichkeit der Glioblastome mit MAP-Granulomen (Endothelzellproliferation und Bildung von „Pseudopalisaden“) (Pierce, 2019). Alle diese Theorien basieren bislang lediglich auf möglichen epidemiologischen und histopathologischen Zusammenhängen und wurden bisher nicht durch gezielte wissenschaftliche Untersuchungen bestätigt oder bewiesen.

Die Diskussion um die zoonotische Natur von MAP wird seit über hundert Jahren vehement geführt und gleicht einem „hundertjährigen Krieg“ (Sechiand Dow, 2015). Auch heute noch sind die Wissenschaftler sich darüber nicht einig (Eslami et al.,

2019). Es besteht jedoch ein Konsens darüber, dass MAP zumindest in einigen, genetisch disponierten Menschen eine Erkrankung auslösen kann und dass deshalb die Exposition des Menschen mit MAP möglichst gering gehalten werden sollte (Kuenstner et al., 2017).

2.4 Mögliche Übertragungswege

Dank seiner überragenden Tenazität können von infizierten Tieren ausgeschiedene MAP-Zellen lange Zeit in Gülle und auf kontaminierten Weiden überleben und werden somit oft durch Regenfälle weggespült und gelangen in größere Gewässer wie Flüsse oder Seen (Pickup et al., 2005; Pickup et al., 2006; Richardson et al., 2019). Untersuchungen haben gezeigt, dass MAP in Wasser und in Sedimenten mehrere Monate überleben kann (Whittington et al., 2005). Da eine zuverlässige Abtötung von MAP durch Dekontaminationsmaßnahmen für Trinkwasser nicht gewährleistet werden kann, stellt Trinkwasser eine wichtige mögliche Expositionsrouten für Mensch und Tier dar (Naser et al., 2014; Shin et al., 2008). Eine Möglichkeit der Übertragung von MAP auf den Menschen durch Aerosole in der Nähe von Flüssen und in der heimischen Dusche wird ebenfalls vermutet (Rhodes et al., 2014). Um einen definitiven Zusammenhang zwischen der Kontamination von Gewässern, dem Überleben von MAP im Trinkwasser und Infektionen des Menschen herzustellen, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig (Garvey, 2018).

2.4.1 MAP im Lebensmittel

Als Hauptübertragungsweg für MAP auf den Menschen gilt die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln (Waddell et al., 2016b). Hierbei liegt vor allem der Fokus auf kontaminierten Milchprodukten, wobei auch Fleisch, besonders das von alten Milchkühen, mit MAP belastet sein kann (Gill et al., 2011). Das Fleisch dieser Tiere wird besonders für die Herstellung von Wurstwaren verwendet, aufgrund seines hohen Gehalts an Myoglobin und Glycogen (Lorencova et al., 2019). Methoden für die Herstellung fermentierter Rohwurst (Teewurst) sind nicht ausreichend, um MAP zuverlässig abzutöten, weshalb der Konsum fermentierter roher Fleischprodukte einen möglichen Übertragungsweg von MAP auf den Menschen darstellt (Lorencova et al., 2019). Lebende MAP gelangen hauptsächlich über eine fäkale Kontamination der Milch durch mangelnde Melkhygiene in die Milch, aber auch direkte

Ausscheidung über die Milch von infizierten Tieren wurde beschrieben (Gerrard et al., 2018; Mullan, 2019; Sweeney et al., 1992). Das geschätzte Verhältnis von fäkaler Kontamination zu direkter Ausscheidung ist dabei 90% zu 10% (Rani et al., 2019). Dabei sind sowohl klinisch erkrankte als auch symptomlose Kühe an der Erregerausscheidung beteiligt (Streeter et al., 1995; Sweeney et al., 1992). Besonders subklinisch infizierte Tiere stellen ein nicht kalkulierbares Risiko dar, da sie mit herkömmlichen diagnostischen Mitteln häufig nicht erkannt werden und somit unbemerkt Erreger ausscheiden können (siehe Kapitel 2.2.2). Wie bereits erwähnt, können MAP, durch ihre extreme Widerstandsfähigkeit, den Prozess der Pasteurisierung überleben, was dazu führt, dass nicht nur Rohmilch, sondern auch pasteurisierte Konsummilch lebende MAP enthalten kann (siehe Kapitel 2.1.3). Neben Milch können auch Käse oder gefriergetrocknete Milchprodukte MAP enthalten. So wurden zum Beispiel bereits lebende MAP in Milchaustauscher für Kälber und in Säuglings-Milchpulver nachgewiesen (Botsaris et al., 2016; Ikonopoulou et al., 2005; Khol et al., 2017). Für die Erhaltung der öffentlichen Gesundheit ist es daher sinnvoll, die Aufnahme von MAP durch den Menschen durch Gewährleistung erregerfreier Lebensmittel zu minimieren (Kuenstner et al., 2017).

2.5 Nachweisverfahren im Lebensmittel

2.5.1 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der indirekte Nachweis von MAP in Milchproben über die Anwesenheit spezifischer Antikörper ist, aufgrund seiner leichten Durchführbarkeit und der kurzen Dauer, ein beliebtes Verfahren (Slana et al., 2008). Es wird unter anderem auch verwendet, um MAP-Infektionen in Beständen durch routinemäßige Untersuchung von Sammel- und Tankmilchproben nachzuweisen (Whittington et al., 2019). Dabei wird vorausgesetzt, dass bei einer Belastung der Milch mit MAP auch gleichzeitig große Mengen an Antikörpern gegen MAP in der Milch vorhanden sind. Zur Verbesserung der Spezifität werden die betreffenden Proben in der Regel mit einem *Mycobacterium phlei* enthaltenden Puffer vorinkubiert, um kreuzreaktive Antikörper zu eliminieren (Yokomizo et al., 1985). Die so vorbehandelten Proben werden dann auf mit MAP-Antigen beschichtete Platten gegeben und die gebundenen Antikörper mittels spezifischer enzymgekoppelter Sekundärantikörper detektiert. Ein positives Ergebnis wird dann aus der Intensität der Farbreaktion, im Vergleich mit je einem positiven und

einem negativen Kontrollstandard, berechnet. Die verwendeten Antigene sind dabei wenig standardisiert und bestehen zumeist aus krudem MAP-Zellextrakt, Lipoarabinomannan oder Oberflächenproteinen von MAP (Karuppusamy et al., 2019). Von den derzeit in Deutschland zugelassenen kommerziellen ELISA-Tests kam in einer vergleichenden Studie des Friedrich-Löffler-Instituts keiner auf eine Sensitivität von über 65%, sowohl in Milch als auch in Serumproben (FLI, 2012). Ein Vorteil dieser Methode ist ihre hohe Standardisierbarkeit, verbunden mit geringem Kosten- und Arbeitsaufwand (Slana et al., 2008). Gegen ihren Einsatz für die Detektion einer MAP-Kontamination in Milch spricht allerdings, dass MAP auch von Tieren im subklinischen Stadium der Erkrankung ausgeschieden werden kann, die jedoch noch keine humorale Immunantwort gegen MAP ausgebildet haben (Slana et al., 2008). Eine Untersuchung von Sammel- oder Tankmilchproben in einem Betrieb mit niedriger Prävalenz birgt daher ein hohes Risiko falsch-negativer Ergebnisse (Nielsen and Toft, 2014). Auch ein MAP-Eintrag in die Milch über fäkale Verunreinigungen kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden, da nur Antikörper gegen MAP festgestellt werden können und nicht der Erreger selbst. Ein positiver Antikörpertest muss ebenso nicht immer gleichbedeutend sein mit dem Vorhandensein von MAP, da Antikörperbildung und MAP-Ausscheidung zeitlich nicht zwingend assoziiert sind (Begg et al., 2018).

2.5.2 Kultur

Auch heute noch gilt die kulturelle Anzucht als die Goldstandardmethode, um lebende MAP im Lebensmittel nachzuweisen (OIE, 2018). Die Anzucht kann hierbei auf verschiedenen festen und flüssigen Nährmedien erfolgen. Die gebräuchlichsten davon sind Herold's Egg Yolk Medium (HEYM), ein auf Eidotter basierendes festes Nährmedium und das M7H9 Flüssigmedium (OIE, 2018). Beide Nährmedien müssen für die Kultivierung von MAP mit Mycobaktin J substituiert werden (Barclay and Ratledge, 1983). Die Bestätigung der Identität erfolgt dabei über die Mycobaktinabhängigkeit des Wachstums oder mittels PCR (FLI, 2018). Beim Nachweis von MAP im Lebensmittel haben kulturelle Verfahren jedoch mit einigen Schwierigkeiten zu kämpfen. So ist durch das extrem langsame Wachstum von MAP ein Ausschluss einer MAP-Kontamination in der Regel erst nach bis zu 16 Wochen möglich (Cocito et al., 1994), eine Zeitspanne, die für die Diagnostik im Lebensmittel nicht annehmbar ist. Eine weitere Hürde ist die ausgeprägte Begleitflora, die in vielen

Lebensmitteln und vor allem in Rohmilch vorliegt. Um überhaupt eine Aussage über das Vorhandensein von MAP treffen zu können, muss die Überwucherung der Nährmedien durch eine vorhergehende Dekontamination der Probe verhindert werden (OIE, 2018). Mittel der Wahl ist hierfür Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC), da es wenig schädlich für MAP ist und gleichzeitig zuverlässig andere Mikroorganismen abtötet (FLI, 2018). Doch auch wenn MAP die Behandlung mit HPC überlebt, senkt die chemische Dekontamination die Sensitivität des Nachweisverfahrens beträchtlich (Gao et al., 2005). Als Grund dafür wird vermutet, dass die MAP-Zellen subletal geschädigt werden und sich dadurch wesentlich schlechter kultivieren lassen (Gao et al., 2005; Grant and Rowe, 2004). Die Sensitivität kultureller Methoden ist sehr stark vom durchführenden Labor abhängig, weshalb positive Ergebnisse verschiedener Labors nur schwer reproduziert werden können (Slana et al., 2008).

2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Spätestens seit der kompletten Sequenzierung des MAP-Genoms (Li et al., 2005) hat sich der Nachweis MAP-spezifischer DNA-Sequenzen zu einem extrem nützlichen Werkzeug im Nachweis von MAP und als Bestätigung der Ergebnisse anderer Methoden entwickelt (Botsaris et al., 2013; Butot et al., 2019). Die wichtigste und gebräuchlichste dieser Sequenzen ist die Insertionssequenz IS900, welche in hoher Kopienzahl im MAP-Genom vorkommt (zwischen 16 und 20 Kopien pro MAP-Genom) (Green et al., 1989; Möbius et al., 2008; Moss et al., 1991). Diese hohe Abundanz macht IS900 zum mit Abstand sensitivsten Target für einen PCR-Nachweis von MAP (Möbius et al., 2008). Diese hohe Sensitivität geht jedoch auf Kosten der Spezifität. Mittlerweile ist bekannt, dass IS900 auch in anderen Mykobakterien außer MAP vorkommen kann (Englund et al., 2002). Das alternative Target F57 ist zwar wesentlich spezifischer, da es ausschließlich im MAP-Genom vorkommt, jedoch liegt es dort in nur einer einzigen Kopie vor und kommt daher in der PCR nicht an die Sensitivität von IS900 heran (Möbius et al., 2008; Poupart et al., 1993). Durch seine Natur als sog. single copy target kann F57 in der realtime-PCR zur exakten Quantifizierung von MAP verwendet werden, was bei IS900 durch seine variable Kopienzahl verhindert wird (Tasara and Stephan, 2005). Generell stellt der molekularbiologische Nachweis von MAP mittels PCR eine schnelle und sensitive Methode dar (Mullan, 2019). Doch auch diese Methode ist bei der Anwendung in Milch nicht ohne Nachteile. Zum Beispiel behindern in der Milch enthaltene

Substanzen wie Fett und Ca^{2+} -Ionen die PCR-Reaktionen und führen so zu verminderter Sensitivität (Bickley et al., 1996; Lantz et al., 1994). Der größte Nachteil dieser Methode ist aber, dass es mit ihr nicht möglich ist, lebende von toten MAP-Zellen zu unterscheiden, da rein die Anwesenheit von MAP-Genomen untersucht wird (Slana et al., 2008). So kann mittels PCR nicht eingeschätzt werden, ob die bei der Untersuchung pasteurisierter Milch gefundenen MAP durch die Behandlung abgetötet wurden, vom Immunsystem des Tieres eliminiert wurden oder ob sie noch eine Gefahr für den Verbraucher darstellen.

2.5.4 Phagen Assay

Phagenbasierte Nachweisverfahren für MAP bauen zumeist auf dem Funktionsprinzip des ursprünglich für *Mycobacterium tuberculosis* entwickelten, kommerziell erhältlichen FASTPlaqueTB Assays auf (Foddai et al., 2009). Dabei werden die in der Probe vorhandenen Mykobakterien künstlich mit dem Mykobakteriophagen D29 infiziert. Nachdem dieser in die Bakterienzelle aufgenommen wurde, wird die ganze Probe mit einem Viruzid behandelt, um überschüssige, extrazelluläre Phagen abzutöten. Die infizierten Mykobakterien werden anschließend zusammen mit einem Rasen aus schnellwachsenden Mykobakterien (meist *Mycobacterium smegmatis*) auf einer Platte ausgesät. Nach einer gewissen Inkubationszeit platzen die infizierten Bakterienzellen auf und die umliegenden Mykobakterien werden infiziert. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis sichtbare Plaques auf der Platte zu sehen sind, welche dann zur Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen Zellen ausgezählt werden können (Foddai et al., 2009). Da der D29 Phage auch andere Mykobakterien außer MAP infizieren kann, muss diese Methode mit einer vorhergehenden spezifischen Voranreicherung der MAP mittels magnetischer Separation (Foddai and Grant, 2017) oder einer Bestätigung der Identität der Plaques durch PCR (Botsaris et al., 2013) kombiniert werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Auch unvollständige Abtötung extrazellulärer Phagen kann ein Problem darstellen (Botsaris et al., 2013). Demnach ist es essentiell, den Assay im betreffenden Labor richtig zu etablieren und zu validieren und gute Kontrollen zu installieren (Robertson et al., 2017). Einzig zwei Arbeitsgruppen im UK setzen diesen Assay derzeit regelmäßig zu Forschungszwecken ein und haben die nötigen Kontrollen dafür etabliert (Mullan, 2019).

2.5.5 Vergleichende Evaluierung der verfügbaren Nachweismethoden

In einer 2019 veröffentlichten Studie wurde das diagnostische Potential der drei oben genannten Nachweisverfahren im direkten Vergleich anhand ISO Standards getestet (Butot et al., 2019). Dabei wurden je 360 gespikete Milchproben blind in zwei verschiedenen Labors untersucht. Verwendete Methoden waren die qPCR, (IS900 und f57), die Anzucht in Kultur und PMS-Phage (Phagenassay mit vorhergehender magnetischer Voranreicherung). Mit Sensitivitäten von 94% (IS900 qPCR), 76% (f57 qPCR) und 83% (kulturelle Anzucht auf HEYM Agar) schnitten die konventionellen Nachweismethoden dabei deutlich besser ab als der Nachweis via PMS-Phage Assay (40% Sensitivität). Ein Nebenbefund dieser Studie war auch, dass die Sensitivität der PCR deutlich sank, wenn sie in pasteurisierter Milch eingesetzt wurde (verglichen mit Rohmilch und Milchpulver). Eine mögliche Erklärung liegt in der Bildung von Fett-Mikrotröpfchen während der Erhitzung und Homogenisierung, die die DNA-Extraktion und Aufreinigung beeinträchtigen (Butot et al., 2019). Weiterhin muss erwähnt werden, dass die in dieser Studie verwendeten Proben künstlich mit laboradaptierten Stämmen von MAP kontaminiert wurden, welche im Vorfeld durch Filtration entklumpt worden waren. Es ist anzunehmen, dass die Sensitivität der Methoden in natürlich kontaminierten Milchproben deutlich geringer ausfallen würde. Für eine gute Vergleichbarkeit der Nachweissysteme ist diese hohe Standardisierbarkeit der Testbedingungen jedoch zwingend notwendig und sinnvoll.

Zusammenfassend ist keine der etablierten Methoden für den Nachweis lebender MAP in Milch ausreichend sensitiv, um eine MAP-Freiheit des Lebensmittels zu garantieren. Daher besteht dringend Bedarf an neuen Nachweismethoden oder der Verbesserung bereits bestehender Methoden.

2.6 Spezifische Voranreicherung von MAP aus Milch

Der Nachweis von MAP in Milchproben beinhaltet einige Hindernisse. Zwar werden MAP von klinisch erkrankten Tieren in großen Mengen ausgeschieden, die Erregerausscheidung subklinisch infizierter Tiere ist jedoch weitaus geringer (Sweeney et al., 1992). Hinzu kommt der Verdünnungseffekt durch die Milch gesunder Tiere, was dazu führt, dass MAP in Tank- oder Sammelmilchproben nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegt (Slana et al., 2009). Zusätzlich kommt es zu einer Minderung der Sensitivität durch die, in Milch sehr ausgeprägte, bakterielle Begleitflora und PCR-inhibitorische Substanzen (Bickley et al., 1996; Butot et al., 2019). Um die Sensitivität der eingesetzten Nachweismethoden zu erhöhen wurden daher in den letzten Jahren einige Methoden entwickelt, um MAP spezifisch aus Milch voranzureichern. So lässt sich nicht nur die Erregerkonzentration deutlich erhöhen, sondern auch störende Substanzen und Begleitflora können entfernt werden.

2.6.1 Immunomagnetische Separation (IMS)

Die Ersten, die den Einsatz immunomagnetischer Separation beim Nachweis von MAP beschrieben, waren Grant et al. (Grant et al., 1998). Das Funktionsprinzip dabei basiert auf paramagnetischen Partikeln (beads), an welche monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen MAP gekoppelt werden. Die in der Probe enthaltenen MAP binden dann an die beads und können über einen Magneten aus der Probe isoliert werden. So können MAP-Zellen spezifisch von der bakteriellen Begleitflora und inhibitorischen Substanzen separiert werden, wobei die MAP gleichzeitig in ein kleineres Volumen aufgenommen und aufkonzentriert werden können (Husakova et al., 2017). Die gebräuchlichste bead-Antikörper-Kombination für IMS sind polyklonale anti-MAP-Antikörper aus Kaninchen, die über anti-Kaninchen-IgG Antikörper (aus Schafen) an M280 Dynabeads gekoppelt sind (Husakova et al., 2017). Ein Nachteil in der Verwendung polyklonaler Antikörper ist deren niedrige Spezifität, die zur Mitanreicherung unspezifischer Begleitflora führt (Foddai et al., 2010). Monoklonale Antikörper sind generell spezifischer als Polyklonale, jedoch gereicht ihnen diese enge Spezifität auch zum Nachteil, da schon minimale Änderungen in der Struktur des Epitops (durch Glycosylierung, Denaturierung oder genetischen Polymorphismus) ihre Funktion erheblich einschränkt (Lipman et al., 2005). Sie

werden deshalb oft in Kombinationen mehrerer Antikörper eingesetzt um eine ausreichende Anreicherungseffizienz zu erreichen (O'Brien et al., 2016).

2.6.2 Peptid-medierte magnetische Separation (PMS)

Die Peptid-medierte magnetische Separation stützt sich, im Unterschied zur IMS, nicht auf Antikörper, sondern auf spezifisch an MAP bindende Peptide. Die am häufigsten eingesetzten Peptide dafür sind aMptD und aMp3 (Husakova et al., 2017). Sie wurden per Phagen-Display, mithilfe der Ph.D.-12 Phagenbibliothek identifiziert und binden spezifisch an die MAP Oberflächenproteine MptD und Mp3 (Stratmann et al., 2004; Stratmann et al., 2002). Ein weiteres MAP-bindendes Peptid (EEA402) wurde 2016 von O'Brien et al. identifiziert (O'Brien et al., 2016). Dieses zeigte jedoch eine sehr hohe Rate unspezifischer Anreicherung anderer Mykobakterien und sollte daher nicht in Kombination mit kulturellen oder phagenbasierten Nachweissystemen eingesetzt werden (O'Brien et al., 2016). Ein Vorteil MAP-bindender Peptide, im Vergleich zu mono- oder polyklonalen Antikörpern, ist ihr hoher, durch die chemische Synthese gewährleisteter, Reinheitsgrad (Stratmann et al., 2006). Eine Spezifität von 100% kann jedoch auch mit dieser Methode nicht erreicht werden, da bis zu 10% unspezifische Anreicherung, durch elektrostatische oder van der Waals Wechselwirkungen von Bakterien mit der Oberfläche der Beads, nicht verhindert werden kann (Foddai et al., 2010). Durch die enge Spezifität der MAP-bindenden Peptide kann die Anreicherung von MAP aber auch negativ beeinträchtigt werden, sodass erst durch die Kombination mehrerer Peptide in einem Assay eine ausreichend hohe Anreicherungseffizienz erreicht werden kann (Foddai et al., 2010). Für den Nachweis von MAP in Milch mittels PMS-Phage Technik wird standardmäßig eine 50:50 Mischung aus mit biotinyliertem aMptd und aMp3 gekoppelten MyOne Tosylactivated Dynabeads verwendet (O'Brien et al., 2018). Die Biotinylierung dient dabei der besseren räumlichen Ausrichtung des Peptids und bewirkt so eine bessere Anreicherungseffizienz (Foddai et al., 2010).

2.6.3 Lektinmedierte magnetische Separation (LMS)

Für den Nachweis von MAP wurde die lektinmedierte magnetische Separation unseres Wissens bisher noch nicht eingesetzt, dafür jedoch für eine Reihe anderer pathogener Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Toxoplasma gondii*, Hepatitis-A-Virus

und *Staphylococcus aureus* (Bicart-See et al., 2016; Harito et al., 2017a; Harito et al., 2017b; Ko et al., 2014).

Im Unterschied zu den bei der PMS verwendeten Peptiden binden Lektine nicht an Peptide, sondern an spezifische Oligosaccharide auf der Oberfläche der Erreger (Goldstein et al., 1980). Wie vorhergehend beschrieben (siehe Kapitel 2.1.2), beinhaltet die äußere Schicht der Mykobakterien aus dem *M. avium* Komplex sogenannte Glycopeptidolipide (GPLs). Diese werden weiter unterteilt in serotypspezifische GPLs (ssGPL) und nicht-serotypspezifische GPLs (nsGPL) (Busatto et al., 2019). Sie setzen sich zusammen aus einer Kohlenhydratkomponente, einer Kernstruktur aus einem Tripeptid-Aminoalkohol und einer langkettigen Fettsäure (Brennan and Goren, 1979; Laneelle and Asselineau, 1968). Für das humane Mannose-bindende Lektin (MBL) wurde bereits eine Bindung an *Mycobacterium avium* subsp. *avium* beschrieben (Polotsky et al., 1997). Allerdings bindet es auch an eine Vielzahl anderer Mikroorganismen (Seiler et al., 2019) und hat deshalb nicht die nötige Spezifität für eine Voranreicherung von MAP. Ebenfalls beschrieben wurde, dass ssGPLs auf Mykobakterien mit Mannoserezeptoren auf Makrophagen und mit Toll-Like Rezeptoren interagieren können (Horgen et al., 2000). Daraus resultierend stellten wir die Hypothese auf, dass Oligosaccharide auf der Oberfläche von MAP auch für andere Lektine als Angriffspunkt dienen können. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Eignung von 36 Pflanzen-Lektinen zur spezifischen Voranreicherung von MAP aus Milchproben ermittelt werden.

3 PUBLIKATION

Titel

„Characterization of plant lectins for their ability to isolate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk”

Autoren

Bernhard F. Hobmaier, Karina Lutterberg, Kristina J.H. Kleinwort, Ricarda Mayer, Sieglinde Hirmer, Barbara Amann, Christina Hölzel, Erwin P. Märtlbauer, Cornelia A. Deeg

Journal

Food Microbiology

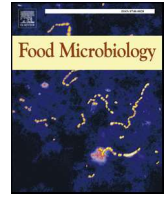
Status

Publiziert.

Food Microbiology (2019) 82: 231-239; doi: 10.1016/j.fm.2019.02.009

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.009>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018310219?via%3Dihub>



Characterization of plant lectins for their ability to isolate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk

Bernhard F. Hobmaier^a, Karina Lutterberg^a, Kristina J.H. Kleinwort^a, Ricarda Mayer^b, Sieglinde Hirmer^a, Barbara Amann^a, Christina Hölzel^{b,c}, Erwin P. Märtlbauer^b, Cornelia A. Deeg^{a,*}

^a Chair of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Veterinärstraße 13, D-80539, Munich, Germany

^b Chair of Hygiene and Technology of Milk, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, Schönleutnerstr 8, D-85764, Oberschleißheim, Germany

^c Institute of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, CAU Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 6, 24098 Kiel, Germany

1. Introduction

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the causative agent of paratuberculosis or Johne's disease, a chronic granulomatous enteritis in cattle and small ruminants, causing emaciation, decreased milk production and, in cattle, severe diarrhea (Arsenault et al., 2014). After infection, ruminants go through a long, asymptomatic subclinical phase, in which they cannot reliably be determined by standard diagnostic tests (Li et al., 2017). Apart from diseased animals, which can shed high numbers of MAP, animals in a subclinical stage of infection can also show intermittent shedding of MAP (Whitlock and Buegelt, 1996), which often remains undetected. Therefore, these subclinical animals play an important role in disease transmission and the contamination of milk, either by shedding MAP directly in milk (Sweeney et al., 1992) or by fecal contamination due to poor milking hygiene. Consumers can potentially be exposed to the pathogen through contaminated drinking-water and meat or dairy products obtained from infected ruminants (Gill et al., 2011). MAP, as well as other mycobacteria, has a very unique cell envelope, consisting of a plasma membrane, a thick cell wall, that contains large amounts of very long-chain fatty acids (mycolic acids), covalently bound to arabinogalactan and peptidoglycan, and an outermost layer. This cell envelope is a key element for the outstanding tenacity and drug-resistance of mycobacteria (Chiaradia et al., 2017). MAP was reported to survive many of the standard means of food decontamination (Chiodini and Hermon-Taylor, 1993; Grant et al., 2002). While the mycobacterial cell wall may play a role in this case, the specific mechanisms for its resistance to decontamination are still unclear (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). More recently it was suggested that MAP in raw milk is primarily located inside somatic cells and thus physically protected by the large mass of the host cell (Gerrard et al., 2018). Viable MAP were found in pasteurized milk (Gerrard et al., 2018) and in dried dairy products like powdered infant formula (Botsaris et al., 2016) by using a bacteriophage amplification assay

combined with PCR (phage-PCR). The zoonotic potential of MAP is still under discussion (Kuenstner et al., 2017). It could potentially play a role in inflammatory bowel diseases, like Crohn's disease and ulcerative colitis (Timms et al., 2016). Additionally, MAP infections could be involved in the pathogenesis of autoimmune diseases like type 1 diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and Hashimoto's thyroiditis (Garvey, 2018; Waddell et al., 2015). Although the causal link between MAP and these diseases is not proven, the possible association necessitates a reduction in human exposure through food to be implemented (Kuenstner et al., 2017). Therefore, a reliable, sensitive and time-saving method for the detection of MAP in food is vital. Especially for milk it is important that the detection method has the ability to differentiate viable MAP from non-viable MAP, which either entered the food chain already dead or were subsequently killed during pasteurization. The current gold standard for MAP detection is by cultivation (Slana et al., 2008), but when it comes to the detection of MAP in food, the method is limited, as it can only be deemed negative after weeks of incubation and still cannot guarantee negative status due to pre-culturing decontamination protocol (Sweeney et al., 2012). With faster methods, like PCR and qPCR one is able to detect small amounts of MAP DNA (Schonenbrucher et al., 2008; Soumya et al., 2009). However, PCR cannot distinguish viable from non-viable bacteria (Slana et al., 2008). Commonly used loci for PCR like IS900 and ISMap2 are known to share similar sequences with non-MAP mycobacteria, leading to the risk of false positive reactions if primers are not carefully designed (Englund et al., 2002; Park et al., 2018). Foddai and Grant (2017) described a phage assay as a fast method for the detection of living MAP in milk, but it must be combined with other methods (like magnetic separation or PCR), in order to achieve higher specificity (Foddai and Grant, 2017). Since the matrix for detection is milk, additional difficulties occur. In order to prevent overgrowing of plates with non-MAP microorganisms, culture from milk has to be combined with chemical decontamination, which leads to a decreased viability of MAP and reduces sensitivity of this test (Gao et al., 2005; Grant et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: Cornelia.Deeg@lmu.de (C.A. Deeg).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.009>

Received 2 November 2018; Received in revised form 13 February 2019; Accepted 13 February 2019

Available online 15 February 2019

0740-0020/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2003). High levels of fat and calcium ions in milk have an inhibitory effect on PCR sensitivity (Bickley et al., 1996; Lantz et al., 1994). For a sensitive and specific detection of MAP in milk, it is necessary to apply a specific separation and enrichment step prior to the final specific detection, in order to separate the MAP cells from the milk components. Specific separation not only gives the opportunity to remove inhibitory substances and non-target bacteria but also leads to highest possible concentrations of MAP in the sample. This enrichment of MAP, combined with simultaneous removal of inhibitory substances, leads to improved sensitivity and lower detection levels for the following detection method. Different approaches for the development of such methods were published, using either antibody or peptide coated paramagnetic beads (Foddai et al., 2010; Foddai and Grant, 2017; Husakova et al., 2017; O'Brien et al., 2016). In contrast to antibodies or MAP-binding peptides, plant lectins bind to specific glycoconjugates on the surface of MAP. It was recently shown that mannose binding lectin (MBL) is able to bind purified lipoarabinomannan (LAM) from *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) *in vitro* (Seiler et al., 2018). Mannosylated lipoarabinomannan (ManLAM) is present in the cell walls of several pathogenic mycobacteria, including MAP (Turner and Torrelles, 2018). It is an important virulence factor by reprogramming the immune response of the host, creating an anti-inflammatory environment (Mosaib et al., 2018). The mannose residues on ManLAM are a possible target for mannose specific plant lectins (Barre et al., 2001; Nakamura-Tsuruta et al., 2008). Therefore, the goal of this study was to identify lectins that detect MAP-specific glycosylations and could therefore be eligible for further development of a specific enrichment method of MAP from milk samples.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains and milk

The bacterial strains used in the experiments were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). In detail, *Streptococcus thermophilus* (DSM-20617), *Streptococcus uberis* (DSM-20569), *Streptococcus dysgalactiae* (DSM, 20,666), *Lactococcus lactis* (DSM, 20,481), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Escherichia coli* (ATCC 3739), *Acinetobacter lwoffii* (DSM 2403), *Bacillus cereus* (DSM 4312), *Enterococcus faecium* (DSM 2918), *Enterococcus faecalis* (DSM 2570), *Enterococcus durans* (ATCC 13,755), *Mycobacterium intracellulare* (DSM 43,223), *Mycobacterium terrae* (DSM 43,227), *Mycobacterium scrofulaceum* (DSM 43,992), *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (DSM 44,156), *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* (DSM44175), *Mycobacterium asiaticum* (DSM 44,297) and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (DSM 44,135) were used. Cows whole milk (1L, 3.5% fat) and low-fat milk (1L, 1.5% fat) were bought from the local supermarket. No-fat-dry-milk was purchased from Applichem (Darmstadt, Germany).

2.2. Lectins

A total of 36 plant lectins was tested for their binding efficiency with MAP and possible unwanted reactions with milk components and other, frequently occurring bacteria in this environment. The biotinylated and fluorescein labeled lectins were purchased from Biozol (Eching, Germany) and Linaris (Dossenheim, Germany). The following biotinylated lectins were used: *Aleuria aurantia* lectin (AAL, 2 mg/ml), *Agaricus bisporus* lectin (ABL, 2 mg/ml), *Amaranthus caudatus* lectin (ACL, 2 mg/ml), *Bauhinia purpurea* lectin (BPL, 2 mg/ml), Concanavalin A (ConA, 2 mg/ml), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA, 2 mg/ml), *Datura stramonium* lectin (DSL, 1 mg/ml), *Erythrina cristagalli* lectin (ECL, 1 mg/ml), *Galanthus nivalis* lectin (GNL, 2 mg/ml), *Griffonia simplicifolia* lectin I (GSL-I, 2 mg/ml), *Griffonia simplicifolia* lectin I Isolectin B4

(GSL-I-B4, 1 mg/ml), *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSL-II, 1 g/ml), *Hippeastrum hybrid* lectin (HHL, 2 mg/ml), Jacalin (JAC, 1 mg/ml), *Lens culinaris* agglutinin (LCA, 2 mg/ml), *Lycopersicon esculentum* (tomato) lectin (LEL, 1 mg/ml), *Lotus tetragonolobus* lectin (LTL, 2 mg/ml), *Maackia amurensis* lectin II (MAL-II, 1 mg/ml), *Maclura pomifera* lectin (MPL, 2 mg/ml), *Musa paradisiaca* (banana) lectin (BanLec, 2 mg/ml), *Narcissus pseudonarcissus* lectin (NPL, 2 mg/ml), *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin (PHA-E, 2 mg/ml), *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L, 2 mg/ml), Peanut agglutinin (PNA, 5 mg/ml), *Pisum sativum* agglutinin (PSA, 5 mg/ml), *Psophocarpus tetragonolobus* lectin (PTL, 2 mg/ml), *Ricinus communis* agglutinin I (RCA-I, 2 mg/ml), Soybean agglutinin (SBA, 2 mg/ml), *Sophora japonica* agglutinin (SJA, 2 mg/ml), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, 2 mg/ml), *Solanum tuberosum* (potato) lectin (STL, 1 mg/ml), *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I, 2 mg/ml), *Vicia villosa* lectin (VVA, 1 mg/ml), *Wisteria floribunda* lectin (WFL, 2 mg/ml), Wheat germ agglutinin (WGA, 2 mg/ml) and succinylated Wheat germ agglutinin (sWGA, 2 mg/ml). Additionally, fluorescein labeled Banana lectin (2 mg/ml), fluorescein labeled Concanavalin A (5 mg/ml) and fluorescein labeled *Lens culinaris* agglutinin (1 mg/ml) were used.

2.3. Sample preparation

Before coating to the plates for the direct binding assay, MAP, control bacteria and milk were lysed. Therefore, the samples were resuspended in lysis buffer (9M Urea, 2M Thiourea, 65 mM Dithioerythritol, 4% CHAPS). Cells were sonicated six times for 30 s to disrupt cell walls. Protein concentration was determined via Bradford protein assay (SERVA, Heidelberg, Germany).

2.4. Binding efficiency to MAP

For the comparison of the binding efficiency of the 36 lectins to MAP, direct binding assays were performed. Microtiter plates (Maxisorp, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) were coated with lysed MAP diluted to 5 µg/ml in carbonate coating buffer, pH 9.6. The plates were refrigerated overnight to facilitate antigen binding. After blocking with polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) dissolved in PBS-T buffer (pH 7.2) at 1% (w/v) for one hour at 37 °C, endogenous biotin was blocked with the streptavidin/biotin blocking kit (Biozol, Eching Germany). Subsequently, biotinylated lectins were added in a concentration of 1 µg/ml in PBS-T. After two hours at 37 °C, binding was detected with horseradish peroxidase conjugated streptavidin (Cell Signaling, Frankfurt, Germany) diluted 1/50,000 (v/v) in PBS-T for 30 min at 37 °C, followed by development with tetramethylbenzidine-solution (TMB) (Applichem, Darmstadt, Germany). The color development was stopped with 1M sulphuric acid and absorbance was determined at 450 nm (Sunrise microplate reader, Tecan, Crailsheim, Germany). Obtained optical densities led to the assorting of lectins into four groups. Group 1 (OD < 1) was named “low efficiency”, group 2 (OD ≥ 1.0 and < 1.5) “medium efficiency”, group 3 (OD ≥ 1.5 and < 2.0) “high efficiency” and group 4 (OD ≥ 2.0) “very high efficiency”. Lectins from the “low efficiency” group were eliminated from the study, while the lectins from the remaining groups were used in the subsequent experiments.

2.5. Binding to milk components

For the determination of adverse reactions with milk, duplicates of wells on an ELISA-plate were either coated with lysed MAP, whole milk (5 µg/ml), low-fat milk (5 µg/ml) or no-fat-dry-milk (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany, 5 µg/ml) and subsequently incubated with the respective lectin (1 µg/ml). Assays were performed as described (2.4.). The optical densities of the wells that were previously coated with milk (= OD (Sample)), were divided by the results of the MAP-coated wells (= OD (MAP)). The resulting quotient was named relative binding ratio.

$$\text{Binding ratio} = \frac{\text{OD}(\text{Sample})}{\text{OD}(\text{MAP})}$$

Lectins with higher optical densities in milk-coated wells compared to MAP-coated wells (ratio ≥ 1.0) were considered to bind milk better than MAP and were therefore eliminated as MAP enrichment candidates. Only lectins with medium (ratio < 1.0 and ≥ 0.5) and weak binding to milk (ratio < 0.5) were used for further experiments (Fig. 5).

2.6. Cross-reactivity to control bacteria

Cross-reactivity of lectins to control bacteria was tested with further assays. Lysates of twelve control bacteria (*Bacillus cereus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus uberis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and six environmental mycobacteria (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* and *Mycobacterium terrae*) were tested. They were diluted to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in bicarbonate buffer, pH 9.6. Bacteria were used in the same concentration as MAP which was included in the assays as positive control. As mentioned in section 2.5., resulting optical densities were divided by the optical densities of the respective lectin with MAP and expressed as a relative binding ratio. Cross reactions with a relative binding ratio higher than one were classified as “strong cross reactions”. Adverse reactions with binding ratios above 0.5 were named “minor cross reactions”. Lectins that showed high (more than ten strong cross reactions) and medium cross-reactivity (more than five strong cross reactions) were eliminated from the study (Fig. 5).

2.7. Immune-fluorescence microscopy of lectin binding to whole MAP cells

Binding to whole MAP cells was determined by fluorescence microscopy. MAP cells were washed off from Herrold's egg yolk medium, washed two times and resuspended in PBS (pH 7.4). To 10^9 CFU/ml MAP, 1 μg of fluorescein-labeled lectin was added and incubated over night at room temperature with gentle agitation. After three times washing with 200 μl TBS, the MAP-suspension was given into a 24 well plate and the plate was viewed with a Leica DMi8 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at $40\times$ magnification and fluorescence intensity was analyzed with Leica Application Suite X (LASX) software, version 1.1.4.1 (Leica microsystems, Wetzlar, Germany).

2.8. Inhibition of binding by mannose

To analyze the mannose dependency of respective lectin binding, MAP were incubated in TBS, containing 20% (w/v) α -D-mannose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), instead of pure TBS (negative control). After washing, pre-incubated samples were resuspended in 200 μl TBS and given into a well on a 24 well plate adjacent to a non-inhibited sample and viewed at $40\times$ magnification. Both samples (inhibited and non-inhibited) were compared under identical settings for the depiction of fluorescence intensity.

3. Results

3.1. Four lectins bound to MAP very effectively

Thirty-six plant lectins were tested for their ability to bind to MAP cell surface glycosylations. The lectins were ranked according to their achieved optical densities and subsequently divided into four groups: “low efficiency”, “medium efficiency”, “high efficiency” and “very high efficiency” of MAP binding (Table 1). Twenty of the 36 lectins did not bind well to MAP (OD < 1) and were allocated to the “low efficiency”

group: ABL, BPL, DBA, DSL, GNL, GSL-I, GSL-I-B4, GSL-II, HHL, MAL-II, MPL, NPL, PSA, SJA, SNA, STL, UEA-I, VVA, sWGA and WFL. The “medium efficiency” (OD ≥ 1.0 and < 1.5) group contained six lectins (JAC, PHA-E, PHA-L, PNA, PTL and WGA). Another six lectins (AAL, ACL, ECL, LTL, RCA-I and SBA) formed the “high efficiency” (OD ≥ 1.5 and < 2.0) group. Four lectins, namely *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Lycopersicon esculentum* lectin (LEL), *Musa paradisiaca* lectin (BanLec) and Concanavalin A (ConA) composed the group with very high efficiency (OD ≥ 2). Table 1 shows the 36 tested lectins ranked by their efficiency of binding MAP and their carbohydrate specificities. The twenty lectins from the “low efficiency” group were eliminated from further studies. Lectins from the “medium”, “high” and “very high efficiency” groups could possibly be used for MAP enrichment because of their binding intensity (see Table 1).

3.2. Unwanted binding of lectins to milk components

As the goal of this study was identification of a lectin suited to separate MAP from milk, it was important to exclude candidates with substantial binding to milk components. Therefore, the 16 lectins that remained after elimination of the “low efficiency” group (Fig. 5), were further tested to subsequently exclude those with strong adverse reactions to milk components. In general, none of the lectins showed considerable differences in its reaction with different kinds of milk, except for RCA-I which showed increased binding with decreasing fat content of the milk products. The lectins JAC, RCA-I, ECL and AAL showed strong reactions with milk (ratio ≥ 1) which therefore led to exclusion from enrichment candidates for MAP from milk (Fig. 1). LEL, LTL, WGA, ConA and ACL showed medium reactivity (ratio < 1.0 and ≥ 0.5), while PHA-E, PHA-L, PTL, SBA, LCA, BanLec and PNA showed no, or only weak (ratio < 0.5) adverse reactions with milk (Fig. 1). Those twelve lectins were selected for further experiments (Fig. 5).

3.3. Unspecific reactions with control bacteria that could interfere with detection in food

After elimination of lectins that bound MAP inefficiently and/or showed strong adverse reactions with milk components (ratio ≥ 1), twelve lectins remained (Fig. 5). To avoid non-specific reactions with other common bacteria occurring in milk, those twelve lectins were also tested for cross reactions with six environmental mycobacteria and twelve control bacteria that are frequently found in milk (causative agents of food infections, -intoxications and mastitis plus several bacteria of gut and skin microbiota). LTL was the most cross-reactive of the tested lectins, with strong cross reactions (ratio ≥ 1) with 16 of the 18 tested control bacteria (Fig. 2, panel A). PNA and AAL also expressed strong cross reactions with a variety of the control bacteria (Fig. 2, panels B and C). Cross-reactivity of PTL and LEL was almost equal, with eight major and five minor (ratio ≥ 0.5) cross reactions (panels D and E). PHA-E and PHA-L (panels F and G) showed six strong and several weaker cross reactions (five for PHA-E and eight for PHA-L); therefore, those seven lectins were subsequently eliminated from the candidates. LCA, SBA and ACL predominantly cross-reacted with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 2, panels H–J). Additionally, LCA and SBA expressed minor cross reactions with five (SBA) or six (LCA) control bacteria. Although ACL's cross-reactivity was weaker than LCA's and SBA's, it was still more pronounced than those of BanLec and ConA, which were the strongest binding lectins. ConA cross-reacted with most of the tested *Mycobacterium* spp. except for *Mycobacterium terrae*, but with none of the other tested bacteria (Fig. 2, panel K). BanLec only cross-reacted with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium asiaticum*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Mild cross reactions were observed to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Fig. 2, panel L). This made ConA and BanLec not only the lectins with the highest affinity for MAP, but also the most specific and therefore

Table 1

Evaluation of binding efficiency of tested lectins with MAP. Lectins were then sorted by their binding efficiency with MAP and categorized into four different groups. “low efficiency” (*), “medium efficiency” (**), “high efficiency” (***) and “very high efficiency” (****). The four lectins from the “very high efficiency”-group (*Lens culinaris* agglutinin, *Lycopersicon esculentum* lectin, *Musa paradisiaca* lectin, and Concanavalin A) could be possible candidates for MAP-enrichment.

Acronyme	Name	Binding to MAP	Specificity (manufacturer's specifications)
MAL-II	<i>Maackia amurensis</i> lectin II	–	Sialic acid in a α -2,3 linkage
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin	–	α -linked mannose oligosaccharides with an <i>N</i> -acetylchitobiose linked α -fucose residue included in the receptor sequence
BPL	<i>Bauhinia purpurea</i> lectin	*	Glycoconjugates containing galactosyl (β -1,3) <i>N</i> -acetylgalactosamine structures or terminal α -linked <i>N</i> -acetylgalactosamine
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	*	α -linked <i>N</i> -acetylgalactosamine
STL	<i>Solanum tuberosum</i> lectin	*	<i>N</i> -acetylglucosamine-oligomers and oligosaccharides containing <i>N</i> -acetylglucosamine and <i>N</i> -acetylmuramic acid
GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II	*	α - or β -linked <i>N</i> -acetylglucosamine residues on the nonreducing terminal of oligosaccharides
SJA	<i>Sophora japonica</i> agglutinin	*	Terminal <i>N</i> -acetylgalactosamine and galactose residues (preferential binding to β anomers)
MPL	<i>Maclura pomifera</i> lectin	*	α -linked <i>N</i> -acetylgalactosamine structures
DSL	<i>Datura stramonium</i> lectin	*	(β -1,4) linked <i>N</i> -acetylglucosamine oligomers, preferring chitobiose or chitotriose
HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i> lectin	*	(α -1,3) and (α -1,6) linked mannose structures
VVA	<i>Vicia villosa</i> lectin	*	Single α - <i>N</i> -acetylgalactosamine residues linked to serine or threonine in a polypeptide
WFA, WFL	<i>Wisteria floribunda</i> lectin	*	Carbohydrate structures terminating in <i>N</i> -acetylgalactosamine linked α or β to the 3 or 6 position of galactose
sWGA	succinylated Wheat germ agglutinin	*	Oligosaccharides containing terminal <i>N</i> -acetylglucosamine or chitobiose
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I	*	α - <i>N</i> -acetylgalactosamine residues
ABL	<i>Agaricus bisporus</i> lectin	*	Galactosyl (β -1,3) <i>N</i> -acetylgalactosamine, Thomsen-Friedenreich antigen
GSL-I-B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I Isolectin B4	*	α -galactose residues
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	*	Sialic acid attached to terminal galactose in (α -2,6) and to a lesser degree, (α -2,3) linkage inhibited by lactose and galactose
GNL	<i>Galanthus nivalis</i> lectin	*	Structures containing (α -1,3) mannose residues
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I	*	α -linked fucose residues
NPL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> lectin	*	α -linked mannose, preferring polymannose structures containing (α -1,6) linkages
PTL	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> lectin	**	Carbohydrate structures containing α -linked <i>N</i> -acetylgalactosamine
PNA	Peanut agglutinin	**	Galactosyl (β -1,3) <i>N</i> -acetylgalactosamine structures (T-Antigen)
WGA	Wheat germ agglutinin	**	Oligosaccharides containing terminal <i>N</i> -acetylglucosamine or chitobiose
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin	**	Terminal galactose, <i>N</i> -acetylglucosamine and mannose residues
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin	**	<i>N</i> -Glykans; GlcNAc und (β 1,6)-linked structures
JAC	Jacalin	**	Only O-glycosidically linked oligosaccharides, preferring galactosyl (β -1,3) <i>N</i> -acetylgalactosamine
ACL	<i>Amaranthus caudatus</i> lectin	***	Galactosyl (β -1,3) <i>N</i> -acetylgalactosamine structure
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> lectin	***	D-galactose and D-galactosides
SBA	Soybean agglutinin	***	Oligosaccharide structures with terminal α - or β -linked <i>N</i> -acetylgalactosamine or galactose residues
LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i> lectin	***	α -linked D-fucose containing oligosaccharides
RCA-I	<i>Ricinus communis</i> agglutinin I	***	β -galactose residues, with a preference for terminal sugars, lactose is a potent inhibitor
AAL	<i>Aleuria aurantia</i> lectin	***	Fucose linked (α – 1,6) to <i>N</i> -acetylglucosamine or fucose linked (α – 1,3) to <i>N</i> -acetylglucosamine
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin	****	Sequences containing α -linked mannose residues; α -linked fucose residues attached to the <i>N</i> -acetylchitobiose portion of the core oligosaccharide markedly enhance affinity
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin	****	<i>N</i> -acetylglucosamine oligomers, preferably trimers and tetramers
BanLec	<i>Musa paradisiaca</i> lectin	****	Internal α (1,3) glucosyl- and mannosyl- residues
ConA	Concanavalin A	****	α -linked mannose present as part of a “core oligosaccharide”

most suited for enrichment of MAP.

LCA, ConA and BanLec were the only three lectins that showed few unspecific reactions with milk and control bacteria and were simultaneously allocated in the group of lectins with “very high efficiency” in binding to MAP (see Table 2). Therefore, they were selected as the most promising candidates for the enrichment of MAP and used in further experiments as candidates for the enrichment of MAP from milk (Fig. 5). ACL and SBA also performed well in terms of adverse reactions with milk or control bacteria, but showed considerably lower binding efficiency than LCA, BanLec and ConA. It was also reported earlier that lactose has an inhibitory effect on the binding of SBA (Debray et al., 1981). Therefore, only LCA, BanLec and ConA were included in further experiments.

3.4. Lectin binding to whole MAP cells

For the development of a direct enrichment assay of MAP from milk, it is vital that the targeted structure of the lectins is accessible in whole MAP cells without further preparation of samples. To test if the antigen is on the cell surface and therefore directly accessible for the lectins, we next analyzed the binding of the three candidates (LCA, ConA and BanLec) to whole MAP cells in TBS. Respective lectins were positive in direct immunofluorescence, indicating their binding to whole MAP cells

(Fig. 3). From the three lectins tested, ConA had the most intense fluorescent staining. Further, co-incubation of MAP with ConA led to an obvious agglutination of MAP cells into clusters (Fig. 3).

3.5. Inhibition of binding by mannose

To investigate if the binding of the three lectin candidates was mannose dependent, we tested their binding to MAP in presence of mannose. LCA, ConA and BanLec bound considerably weaker when pre-incubated in a medium with 20% (w/v) α -D-mannose (Fig. 4). Binding of LCA was almost completely inhibited by mannose, whereas in the samples with ConA and BanLec, there was still some binding detectable. Probably, ConA and BanLec prefer more complex saccharides than LCA since their binding to MAP could not be completely inhibited by mannose.

4. Discussion

While milk from single cows can sometimes contain high numbers of MAP, milk samples from industrial-scale milk production facilities typically present only small MAP amounts (Slana et al., 2009; Sweeney et al., 1992). In order to develop a fast and specific detection method for MAP in milk, it is helpful to concentrate those few MAP into a

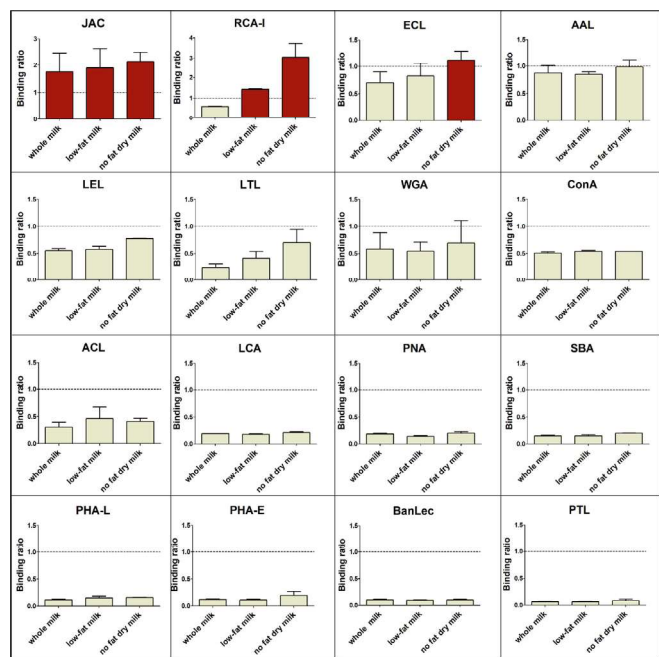


Fig. 1. Undesired binding of lectins to milk components: Reactivity with milk was determined via direct binding assay to MAP and different kinds of milk. The resulting optical densities were set in relation to the results obtained with MAP and displayed as a quotient (= relative binding ratio). JAC, RCA-I and ECL showed higher relative binding to milk than to MAP. AAL, LEL, LTL, WGA, ConA and ACL expressed moderate unspecific reactions, whereas PHA-E, PHA-L, PNA, SBA, LCA, BanLec and PTL only mildly reacted with milk.

smaller volume. Different methods for the separation and enrichment of MAP were published, using monoclonal or polyclonal antibodies or MAP-binding peptides (Foddai et al., 2010; Foddai and Grant, 2017; Husakova et al., 2017; O'Brien et al., 2016), but none is currently used in high-throughput commercial scale detection assays or replaced classical culture methods as the gold standard detection method. Lectins represent a different approach, targeting not proteins or peptides, but specific glycosylations on the cell wall of MAP. Lectins interact with carbohydrates non-covalently in a manner that is usually reversible and highly specific (Ambrosi et al., 2005). Their molecular size is much smaller than antibodies, allowing higher densities of carbohydrate sensing elements, leading to higher sensitivities and lower non-specific absorptions (Wang et al., 2012). Adding a lectin with an affinity for certain bacteria can also cause agglutination of respective bacteria into clusters (Raghu et al., 2017). In our study, we observed this agglutination after addition of ConA to whole MAP cells (Fig. 3). This clustering could potentially help in the enrichment, by making MAP more recoverable after centrifugation or by paramagnetic beads. In this study, we evaluated the suitability of plant lectins for the development of a specific pre-enrichment of MAP from milk. For this purpose, we analyzed the binding specificities of 36 plant lectins in regard to their binding efficiency to MAP and possible undesired reactions with milk or several control bacteria. In an initial screening assay, all 36 lectins were tested on MAP lysate. While investigating whole MAP cells in solution would probably have provided more detailed information about the binding of MAP to cell-surface structures, testing lysate gave us the opportunity to test as many lectins as possible in one single assay, enabling direct comparison of lectin results and minimizing inter-assay variation. Additionally, it allowed to test the binding of lectins to components of various control bacteria and semi-quantitative comparison of those results to MAP. This initial screening assay revealed very different binding efficiencies of the lectins to MAP. It was noticeable that particularly lectins with a mixed specificity for mannose and glucose (LCA, BanLec and ConA) or *N*-acetylglucosamine oligomers (LEL)

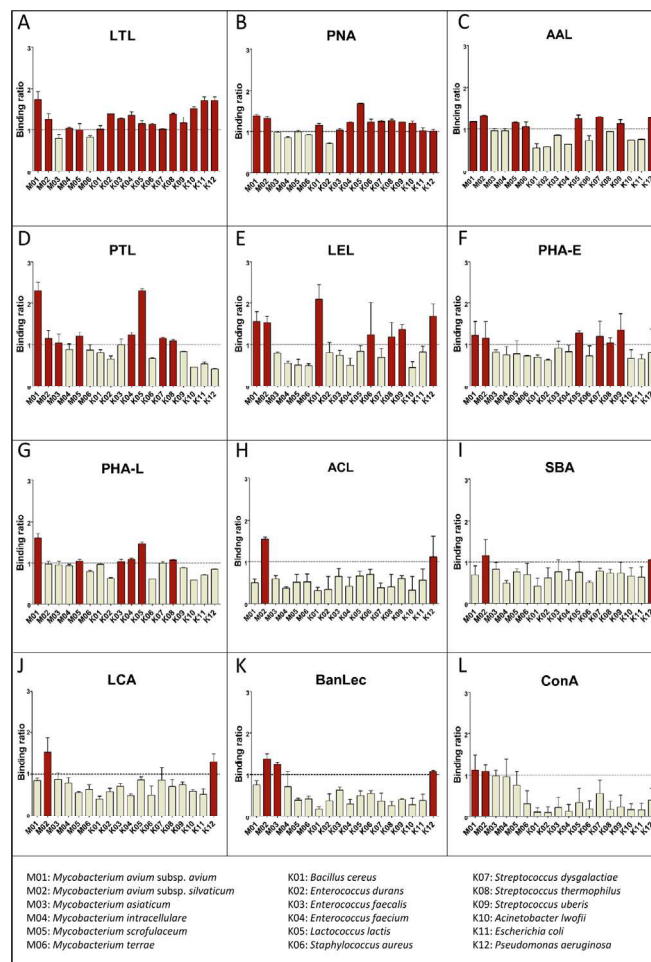


Fig. 2. Cross-reactivity of tested lectins with control bacteria: To determine possible cross reactions, the twelve remaining lectins were tested for their binding to MAP in comparison with six further *Mycobacterium* species and 12 bacteria, that are frequently found in milk. The resulting optical densities were set in relation to the results obtained with MAP and displayed as a quotient (= relative binding ratio). Bacteria that were bound more intense than MAP (ratio ≥ 1) were marked red. LTL (A) and PNA (B) cross-reacted with most of the control bacteria. AAL (C), PTL (D), LEL (E), PHA-E (F) and PHA-L (G) showed cross reactions with six or more of the control bacteria. ACL (H), SBA (I), LCA (J), BanLec (K) and ConA (L) had the least cross-reactivity. From the “very high efficiency group”, only cross reactions of LCA, ConA and BanLec were weak or absent. Therefore, those lectins were used in further experiments.

bound with very high efficiency, while other mannose specific lectins that had no specificity for glucose showed far less efficiency in MAP binding (HHL, GNL and NPL). This suggests that the cell surface glycosylation of MAP might be a more complex structure than just free mannose residues. The lectins that formed the group with the highest efficiency for binding MAP (LCA, LEL, BanLec and ConA) were all reported to bind different parts of complex or oligomannose-type *N*-glycans (Debray et al., 1981; Oguri, 2005). For example, LEL recognizes different sugar chain units in complex-type and oligomannose-type *N*-glycans (Oguri, 2005). Its primary binding site in complex-type *N*-glycans is *N*-acetylglucosamine, while the chitobiose core appears to be the binding site in oligomannose-type *N*-glycans (Oguri, 2005). LEL binds to glycoproteins containing tri- or more highly branched complex-type *N*-glycans, but only weakly to bi-antennary complex-type *N*-glycans, indicating that the tri-antennary structure with the C-2,4 branch may be essential for binding of LEL (Oguri, 2005). In our experiments, LEL had the third highest MAP-binding efficiency. Its relative binding to milk was around 50% compared to MAP. However, when tested for cross

Table 2

Screening overview of all tests: After evaluating the binding properties and cross reactions of the lectins, *Lens culinaris* agglutinin (LCA), Concanavalin A (ConA) and *Musa paradisiaca* lectin (BanLec), were selected as possible candidates for a bead based enrichment of MAP.

Acronyme	Name	Binding to MAP	Cross-reactivity with milk	Cross-reactivity with control bacteria	Binding to whole MAP cells
MAL-II	<i>Maackia amurensis</i> lectin II	–	+++	+	n.a.
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin	–	++	+	n.a.
BPL	<i>Bauhinia purpurea</i> lectin	*	++	+	n.a.
MPL	<i>Maclura pomifera</i> lectin	*	++	–	n.a.
ABL	<i>Agaricus bisporus</i> lectin	*	+	+	n.a.
DSL	<i>Datura stramonium</i> lectin	*	+	–	n.a.
VVA	<i>Vicia villosa</i> lectin	*	+	–	n.a.
GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II	*	+/-	+	n.a.
sWGA	succinylated Wheat germ agglutinin	*	+/-	+	n.a.
WFL	<i>Wisteria floribunda</i> lectin	*	+/-	+	n.a.
NPL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> lectin	*	–	+	n.a.
STL	<i>Solanum tuberosum</i> lectin	*	–	+	n.a.
HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i> lectin	*	–	+	n.a.
GSL-I-B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I isolectin B4	*	–	+	n.a.
GNL	<i>Galanthus nivalis</i> lectin	*	–	+/-	n.a.
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	*	–	–	n.a.
SJA	<i>Sophora japonica</i> agglutinin	*	–	–	n.a.
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin I	*	–	–	n.a.
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin I	*	–	–	n.a.
JAC	Jacalin	**	+	+/-	n.a.
SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin	**	+	–	n.a.
WGA	Wheat germ agglutinin	**	+/-	+/-	n.a.
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i> erythroagglutinin	**	–	+	n.a.
PTL	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> lectin	**	–	+/-	n.a.
PNA	Peanut agglutinin	**	–	+/-	n.a.
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin	**	–	+/-	n.a.
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> lectin	***	+	+	n.a.
RCA-I	<i>Ricinus communis</i> agglutinin I	***	+	+	n.a.
AAL	<i>Aleuria aurantia</i> lectin	***	+/-	+	n.a.
LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i> lectin	***	–	+	n.a.
ACL	<i>Amaranthus caudatus</i> lectin	***	–	–	n.a.
SBA	Soybean agglutinin	***	–	–	n.a.
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin	****	+/-	+	n.a.
ConA	Concanavalin A	****	+/-	–	+
LCA	<i>Lens culinaris</i> agglutinin	****	–	–	+
BanLec	<i>Musa paradisiaca</i> lectin	****	–	–	+

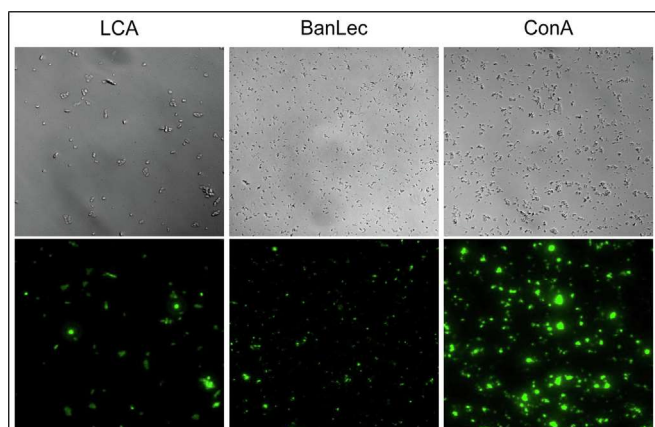


Fig. 3. Binding to whole MAP cells: To confirm binding under physiological conditions, whole MAP cells were incubated with fluorescein labeled *Lens culinaris* agglutinin (LCA), Concanavalin A (ConA) and *Musa paradisiaca* lectin (BanLec) (green). All three lectins were able to bind to the whole MAP cells.

reactions with other bacteria, it bound better to seven of the control bacteria (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus uberis* and *Pseudomonas aeruginosa*) than to MAP. Another five bacteria (*Mycobacterium asiaticum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*) were bound similar like MAP (ratio 0.75–1). This high cross-reactivity subsequently led to its exclusion, making LCA, ConA and BanLec the only remaining candidates. LCA and ConA are part of the legume lectin

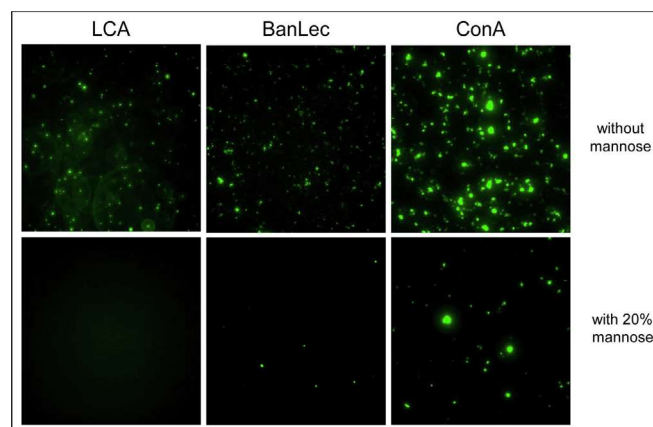


Fig. 4. Inhibition of lectin binding by mannose: To investigate the mannose dependency of the lectin binding, whole MAP cells were co-incubated with 20% (w/v) α -D-mannose and *Lens Culinaris* Agglutinin (LCA), Concanavalin A (ConA) and *Musa Paradisiaca* Lectin (BanLec) (green). Negative controls were only incubated with TBS. The binding of all three lectins was considerably inhibited by mannose.

family (Damme et al., 1998). Both have great affinity to the core structure of complex-type *N*-glycans, which consists of a trimannosidic core substituted by two *N*-acetyl- β -glucosaminyl residues (Debray et al., 1981). Binding of LCA is greatly enhanced by the presence of an (α 1-6)-linked fucose residue near the *N*-glycosidic linkage (Debray et al., 1981). LCA prefers bi-antennary *N*-acetylglucosaminic-type glycopeptides with galactose residues in a terminal non-reducing position, but

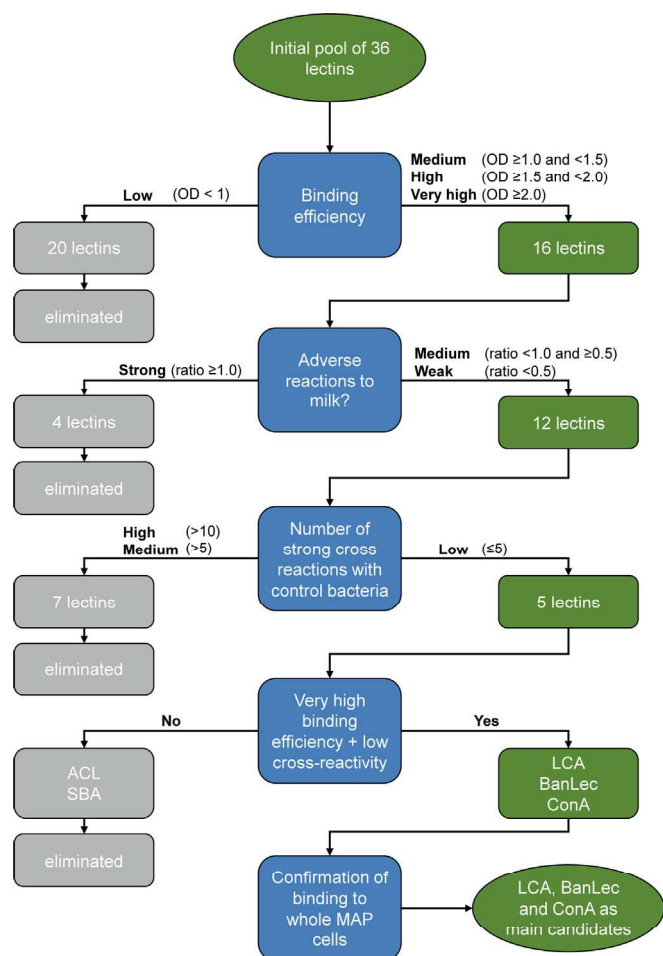


Fig. 5. Flow chart of the decision making process: After each screening experiment, lectins that did not meet the criteria were eliminated from the study (grey boxes), while the remaining lectins (green boxes) proceeded to the next experiment (blue boxes). From an initial pool of 36 lectins, 20 were removed after the first experiment due to low binding efficiency ($OD < 1$). The 16 remaining lectins were tested for unwanted reactions with milk. From this pool, the four lectins that showed strong adverse reactions to milk ($ratio \geq 1$) were eliminated and the 12 lectins with medium ($ratio < 1.0$ and ≥ 0.5) or weak reactions ($ratio < 0.5$) proceeded to the next experiment. Through cross-reactivity tests with 12 control bacteria and six mycobacteria, we excluded seven lectins, showing cross-reactivity with more than five control bacteria. From the five remaining lectins, only those assorted to the “very high efficiency” group in the first experiment were selected as candidates.

shows very little affinity for saccharides with mannose residues in a terminal non-reducing position. In our study it showed fivefold increased binding to MAP as compared to milk (Fig. 1). LCA showed two strong and several weaker cross reactions with control bacteria. Cross reactions centered around the tested *Mycobacterium* spp., *Streptococcus* spp. and *Lactococcus lactis*. LCA's weaker binding to MAP, compared to BanLec and ConA, and the high cross-reactivity with frequent milk contaminant bacteria made it not suitable for an enrichment of MAP from milk. Therefore, only ConA and BanLec were left as candidates. ConA is one of the longest known plant lectins and was used for the immobilization of different glycoconjugates, due to its very broad specificity for mannose and glucose residues (Saleemuddin and Husain, 1991). Dobos et al. (1996) used ConA to identify different patterns of α -mannose residues in O-glycosylations of the 45 kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* (Dobos et al., 1996). ConA specifically bound with high affinity to oligosaccharides which contain the trimannose structure $Man \alpha 1-6 (Man \alpha 1-3) Man$ (Ohyama et al., 1985). Unlike most other mannose specific lectins, ConA recognizes all three

sugar units of the N-linked glycan trimannoside core (Naismith and Field, 1996). This explains why ConA has a significantly higher affinity for N-linked glycosides than for sole mannose residues. In contrast to LCA, the presence of an ($\alpha 1-6$)-linked mannose residue in a terminal non-reducing position (hybrid-type) and glycopeptides where the ($\alpha 1-3$) and the ($\alpha 1-6$)-linked mannose is substituted by four additional α -linked mannose residues (oligomannosidic-type structure) enhanced ConA's affinity (Debray et al., 1981), making its affinity for oligomannose-type and hybrid-type N-glycans higher than for the bi-antennary complex-type structure (Cummings et al., 2017). Unlike LCA, affinity of ConA does not depend on the substitution of the N-acetylglucosamine residues involved in the N-glycosidic linkage by an ($\alpha 1-6$)-linked fucose (Debray et al., 1981). Despite its rather broad specificity, ConA showed less cross-reactivity in our study than LCA. Only the two other species from the *Mycobacterium avium* complex (*Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *silvaticum*) were bound more efficiently than MAP ($ratio \geq 1$). Three other *Mycobacterium* species (*Mycobacterium asiaticum*, *intracellulare* and *scrofulaceum*) were bound with similar efficiency ($ratio 0.75-1$). This suggests that ConA recognizes similar or identical glycoproteins that are preserved throughout different *Mycobacterium* species, but not in the rest of the tested control bacteria. The reactivity of ConA with milk was similar to LEL, meaning that it binds MAP two times more efficiently than milk. Due to its outstanding binding efficiency to MAP and its low adherence to frequently occurring milk flora, it may be suitable for an enrichment of MAP. However, its sensitivity could be disturbed by unspecific reactions with milk. Additionally, we will perform further experiments to clarify if the observed agglutination of MAP after addition of ConA (Fig. 3), still occurs in milk and if this clustering helps in the separation of MAP from milk. Besides the big family of legume lectins, there is another lectin family with a specificity for N-glycans, the family of mannose binding Jacalin-related lectins (mJRLs) (Nakamura-Tsuruta et al., 2008). In this family BanLec forms a special subgroup, due to its very specific binding preferences (Nakamura-Tsuruta et al., 2008). It predominantly binds to longer (Man7-Man9) oligomannose-type glycans containing ($\alpha 1-2$)-linked mannose. BanLec has very high affinity for the $Man\alpha 1-2Man\alpha 1-6Man\alpha 1-6-Man\beta$ structure of oligomannose-type glycans, but not to complex-type N-glycans (Nakamura-Tsuruta et al., 2008). Mannose-specific banana lectin (BanLec) is unique in its specificity for internal $\alpha 1,3$ linkages as well as $\beta 1,3$ linkages at the reducing termini of oligosaccharides (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). Out of the possible candidates for a MAP enrichment, BanLec showed the least undesired reactions with milk in our study, binding MAP ten times better than milk. Except for cross-reactions with *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium asiaticum* and *Pseudomonas aeruginosa*, its overall cross-reactivity with control bacteria was very low. Its low binding to milk and milk related microorganisms makes it a good candidate for the development of a specific extraction method for MAP from milk. However, minimal non-specific enrichment of non-MAP bacteria is to be expected. Apart from plant lectins, human mannose binding lectin (MBL) was reported to bind isolated lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* in buffer, blood and urine (Seiler et al., 2018). The authors of respective study suggested that MBL could have high diagnostic potential, as LAM is an important target for point-of-care detection methods for tuberculosis (Iskandar et al., 2017; Lawn, 2012). These methods rely mainly on the detection of LAM in urine of patients via sandwich-ELISA. To our knowledge, binding of MBL to whole bacterial cells of *Mycobacterium tuberculosis* was not described yet. However, MBL was shown to bind to whole cells of *Mycobacterium avium* (Polotsky et al., 1997) and therefore likely also binds whole MAP cells. While urine represents a rather sterile environment with very few contaminants, milk contains a variety of non-target bacteria and other interfering substances. MBL, however, binds to a very broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria, mycobacteria, viruses, fungi or pathogen associated molecular patterns (PAMPs) like Lipopolysaccharide endotoxin (LPS) or Lipoteichoic acid (LTA) (Seiler et al.,

2018). The very broad specificity of MBL for PAMPs makes it a formidable candidate for applications like diagnosis and treatment of sepsis (Cartwright et al., 2016; Kang et al., 2014). We did not test MBL in this study, as we focused on plant lectins and we expect MBL to show various cross reactions with different types of non-target bacteria in milk and milk itself. The macropattern-recognition of MBL relies on the three-dimensional orientation of several micropattern-recognition domains (Hoffmann et al., 1999). Those micropattern-recognition domains have a mixed affinity for glucose, fucose and mannose (Takahashi and Ezekowitz, 2005). In our study, we observed that lectins with a mixed mannose/glucose specificity (i.e. LCA, LEL, ConA and BanLec), achieved much higher binding efficiencies than lectins with a pure affinity for mannose residues. This indicates the presence of oligomannose and complex-type *N*-linked glycosylations on surface structures of MAP, therefore we will probably additionally screen MBL in the future. Both of them are recognized by ConA and LEL, while LCA only recognizes the complex-type and BanLec only the oligomannose-type *N*-glycans. The presence of *N*-linked glycosylations in MAP was already predicted on a genomic level (Rana et al., 2014), but to our knowledge, it was not verified on protein level to date. Our results confirm this prediction and they also prove presence of *N*-glycosylated glycoproteins on the outer cell membrane of MAP. A further specification of the glycan-structure on the cell membrane is given by the fact that LCA binds to MAP with high efficiency, whereas PSA does not. LCA and PSA are highly related legume lectins, with remarkable similarity in their binding preferences. Both share the affinity for branched complex-type *N*-glycans of the *N*-acetylglucosaminic type with a (α 1-6)-linked fucose residue linked to the core oligosaccharide. However, their relative affinities for some glycopeptides are different: LCA prefers terminal *N*-acetylglucosamine residues in glycopeptides, whereas PSA has more affinity for terminal mannose residues that would decrease the affinity of LCA (Kornfeld et al., 1981). The high affinity of LCA and LEL together with the low affinity of PSA indicate the presence of branched complex-type *N*-glycans of the *N*-acetylglucosaminic (LacNAc) type, where the terminal LacNAc is not modified, resulting in a terminal non-reducing galactose residue. Our primary goal was to find lectins that are highly specific for MAP-exclusive glycoproteins. Although we did not find a lectin that exclusively binds to MAP, we found two lectins that bind to MAP with high efficiency and specificity. While ConA may cause some problems due to binding to milk components, BanLec does not seem to bind milk at all. Its narrow sugar-specificity and its low binding to milk components to milk make it a good choice for further investigation.

5. Conclusion

Plant lectins offer many advantages in the detection of pathogens, due to higher possible coating densities in consequence of their small size and to the quickly occurring agglutination between lectins and bacteria (Wang et al., 2012). Our results show, that lectins are able to bind MAP-cells with high efficiency and specificity, and that milk components are bound to a lesser extent. Therefore, we see great potential in the use of lectins as bioreceptors and will investigate in further studies whether they can be used for the development of a new enrichment method of MAP in milk.

Declaration of interest

None.

Funding

The IGF Project 18388 N of the FEI was supported via AiF within the program for promoting the Industrial Collective Research (IGF) of the German Ministry of Economic Affairs and Energy (BMWi), based on a resolution of the German Parliament.

Acknowledgements

The authors would like to thank Claudia Guggenmos and Florian Gosselin for excellent technical support as well as Dr. Andrea Stockmaier-Didier and Dr. Roxane Degroote for critical discussions.

References

- Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G., 2005. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem.* 3, 1593–1608. <https://doi.org/10.1039/B414350G>.
- Arsenault, R.J., Maatnanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., Napper, S., 2014. From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Res.* 45, 54. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>.
- Barre, A., Bourne, Y., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Rougé, P., 2001. Mannose-binding plant lectins: different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie* 83, 645–651. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01315-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01315-3).
- Bickley, J., Short, J.K., McDowell, D.G., Parkes, H.C., 1996. Polymerase Chain Reaction (PCR) Detection of *Listeria Monocytogenes* in Diluted Milk and Reversal of PCR Inhibition Caused by Calcium Ions 22. pp. 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01131.x>.
- Botsaris, G., Swift, B.M., Slana, I., Liapi, M., Christodoulou, M., Hatzitofi, M., Christodoulou, V., Rees, C.E., 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* sub-species *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int. J. Food Microbiol.* 216, 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.011>.
- Cartwright, M., Rottman, M., Shapiro, N.I., Seiler, B., Lombardo, P., Gamini, N., Tomolonis, J., Watters, A.L., Waterhouse, A., Leslie, D., Bolgen, D., Graveline, A., Kang, J.H., Didar, T., Dimitrakakis, N., Cartwright, D., Super, M., Ingber, D.E., 2016. A broad-spectrum infection diagnostic that detects pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in whole blood. *EBioMedicine* 9, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.014>.
- Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., Tropis, M., Daffé, M., 2017. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* 7, 12807. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>.
- Chiodini, R.J., Hermon-Taylor, J., 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 629–631. <https://doi.org/10.1177/104063879300500424>.
- Cummings, R.D., Darvill, A.G., Etzler, M.E., et al., 2017. Glycan-recognizing probes as tools. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* [Internet], third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY) 2015–2017 (Chapter 48). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876827>.
- Damme, E.J.M.V., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P., 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 575–692. <https://doi.org/10.1080/07352689891304276>.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to *N*-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* 117, 41–51. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06300.x>.
- Dobos, K.M., Khoo, K.H., Swiderek, K.M., Brennan, P.J., Belisle, J.T., 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 178, 2498–2506. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2498-2506.1996>.
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K.-E., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 209, 267–271. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00552-9).
- Foddai, A., Elliott, C.T., Grant, I.R., 2010. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7550–7558. <https://doi.org/10.1128/AEM.01432-10>.
- Foddai, A.C., Grant, I.R., 2017. Sensitive and specific detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk by the peptide-mediated magnetic separation-phage assay. *J. Appl. Microbiol.* 122, 1357–1367. <https://doi.org/10.1111/jam.13425>.
- Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Mutharia, L., 2005. Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can. J. Vet. Res.* 69, 81–87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15971671/>.
- Garvey, M., 2018. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open Vet. J.* 8, 172–181. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i2.10>.
- Gavrovic-Jankulovic, M., Poulsen, K., Brckalo, T., Bobic, S., Lindner, B., Petersen, A., 2008. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 929–941. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.033>.
- Gerrard, Z.E., Swift, B.M.C., Botsaris, G., Davidson, R.S., Hutchings, M.R., Huxley, J.N., Rees, C.E.D., 2018. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail pasteurised milk. *Food Microbiol.* 74, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>.
- Gill, C.O., Saucier, L., Meadus, W.J., 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in

- dairy products, meat, and drinking water. *J. Food Protect.* 74, 480–499. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-301>.
- Grant, I.R., Hitchings, E.I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M.T., 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 602–607. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.602-607.2002>.
- Grant, I.R., Kirk, R.B., Hitchings, E., Rowe, M.T., 2003. Comparative evaluation of the MGITM and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk 95, 196–201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02003.x>.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A.B., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313. <http://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>.
- Husakova, M., Dziedzinska, R., Slana, I., 2017. Magnetic separation methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in various types of matrices: a review. *BioMed Res. Int.* 5869854. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5869854>.
- Iskandar, A., Nursiloningrum, E., Arthamin, M.Z., Olivianto, E., Chandrakusuma, M.S., 2017. The diagnostic value of urine lipoarabinomannan (LAM) antigen in childhood tuberculosis. *J. Clin. Diagn. Res. : J. Clin. Diagn. Res.* 11, EC32–EC35. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/20909.9542>.
- Kang, J.H., Super, M., Yung, C.W., Cooper, R.M., Domansky, K., Graveline, A.R., Mammoto, T., Berthet, J.B., Tobin, H., Cartwright, M.J., Watters, A.L., Rottman, M., Waterhouse, A., Mammoto, A., Gamin, N., Rodas, M.J., Kole, A., Jiang, A., Valentin, T.M., Diaz, A., Takahashi, K., Ingber, D.E., 2014. An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy. *Nat. Med.* 20, 1211–1216. <https://doi.org/10.1038/nm.3640>.
- Kornfeld, K., Reitman, M.L., Kornfeld, R., 1981. The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *J. Biol. Chem.* 256, 6633–6640. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7240233?dopt=Abstract>.
- Kuenstner, J.T., Naser, S., Chamberlin, W., Borody, T., Graham, D.Y., McNees, A., Hermon-Taylor, J., Hermon-Taylor, A., Dow, C.T., Thayer, W., Biesecker, J., Collins, M.T., Sechi, L.A., Singh, S.V., Zhang, P., Shafran, I., Weg, S., Telega, G., Rothstein, R., Oken, H., Schimpff, S., Bach, H., Bull, T., Grant, I., Ellingson, J., Dahmen, H., Lipton, J., Gupta, S., Chaubey, K., Singh, M., Agarwal, P., Kumar, A., Misri, J., Sohal, J., Dhama, K., Hemati, Z., Davis, W., Hier, M., Aitken, J., Pierce, E., Parrish, N., Goldberg, N., Kali, M., Bendre, S., Agrawal, G., Baldassano, R., Linn, P., Sweeney, R.W., Fecteau, M., Hofstaedter, C., Potlura, R., Timofeeva, O., Geier, S., John, K., Zayanni, N., Malaty, H.M., Kahlenborn, C., Kravitz, A., Bulfon, A., Daskalopoulos, G., Mitchell, H., Neilan, B., Timms, V., Cossu, D., Mameli, G., Angermeier, P., Jelic, T., Goethe, R., Juste, R.A., Kuenstner, L., 2017. The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Front Public Health* 5, 208. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00208>.
- Lantz, P.-G., Hahn-Hägerdal, B., Rådström, P., 1994. Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 384–389. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90166-X](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90166-X).
- Lawn, S.D., 2012. Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review. *BMC Infect. Dis.* 12, 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-103>.
- Li, L., Wagner, B., Freer, H., Schilling, M., Bannantine, J.P., Campo, J.J., Katani, R., Grohn, Y.T., Radzio-Basu, J., Kapur, V., 2017. Early detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle with multiplex-bead based immunoassays. *PLoS One* 12, e0189783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189783>.
- Mosaibab, T., Boiteux, S., Zulfiker, A.H.M., Wei, M.Q., Kiefel, M.J., Houston, T.A., 2018. A simple glycolipid mimic of the phosphatidylinositol mannoside core from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage cytokine production. *Chembiochem* 19, 1476–1481. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800150>.
- Naismith, J.H., Field, R.A., 1996. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 271, 972–976. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.972>.
- Nakamura-Tsuruta, S., Uchiyama, N., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., Totani, K., Ito, Y., Hirabayashi, J., 2008. Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography—an approach to functional classification. *FEBS J.* 275, 1227–1239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06282.x>.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010. Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *J. Food Protect.* 73, 1357–1397. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.7.1357>.
- O'Brien, L.M., Stewart, L.D., Strain, S.A., Grant, I.R., 2016. Novel monoclonal antibody and peptide binders for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their application for magnetic separation. *PLoS One* 11, e0147870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147870>.
- Oguri, S., 2005. Analysis of sugar chain-binding specificity of tomato lectin using lectin blot: recognition of high mannose-type N-glycans produced by plants and yeast. *Glycoconj. J.* 22, 453–461. <https://doi.org/10.1007/s10719-005-5329-4>.
- Ohyama, Y., Kasai, K., Nomoto, H., Inoue, Y., 1985. Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on a concanavalin A-sepharose column. A quantitative study of the binding specificity of the lectin. *J. Biol. Chem.* 260, 6882–6887. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3997852>.
- Park, H.T., Park, H.E., Jung, Y.H., Yoo, H.S., 2018. An ISMap02-like insertion sequence in *Mycobacterium* spp. interferes with specific detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 216, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.01.013>.
- Polotsky, V.Y., Belisle, J.T., Mikusova, K., Ezekowitz, R.A.B., Joiner, K.A., 1997. Interaction of human mannose-binding protein with *Mycobacterium avium*. *J. Infect. Dis.* 175, 1159–1168. <http://doi.org/10.1086/520354>.
- Rana, A., Rub, A., Akhter, Y., 2014. Proteome-scale identification of outer membrane proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a structure based combined hierarchical approach. *Mol. Biosyst.* 10, 2329–2337. <https://doi.org/10.1039/C4MB00234B>.
- Raghu, H., Kumar, N., Mayuri Arya, K., Sharma, P., 2017. Screening of lectins for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology & Experimentation* 5. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00150>.
- Saleemuddin, M., Husain, Q., 1991. Concanavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization—a review. *Enzym. Microb. Technol.* 13, 290–295. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90146-2).
- Schonenbrucher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bulte, M., 2008. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2751–2758. <https://doi.org/10.1128/AEM.02534-07>.
- Seiler, B.T., Cartwright, M., Dinis, A.L.M., Duffy, S., Lombardo, P., Cartwright, D., Super, E.H., Lanzaro, J., Dugas, K., Super, M., Ingber, D.E., 2018. Broad spectrum capture of clinical pathogens using engineered Fc-Mannose-Binding Lectin (FcMBL) enhanced by antibiotic treatment. *bioRxiv*, 387589. <https://doi.org/10.1101/387589>. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17447.1>.
- Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., Pavlik, I., 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Prev. Vet. Med.* 89, 223–226. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.02.020>.
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I., 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet. Med.* 53, 283–306.
- Soumya, M.P., Pillai, R.M., Antony, P.X., Mukhopadhyay, H.K., Rao, V.N., 2009. Comparison of faecal culture and IS900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faecal samples. *Vet. Res. Commun.* 33, 781. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9226-3>.
- Sweeney, R.W., Collins, M.T., Koets, A.P., McGuirk, S.M., Roussel, A.J., 2012. Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 1239–1250. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01019.x>.
- Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Rosenberger, A.E., 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30, 166–171. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01019.x>.
- Takahashi, K., Ezekowitz, R.A.B., 2005. The Role of the Mannose-Binding Lectin in Innate Immunity. *Clin. Infect. Dis.* 41, S440–S444. <http://doi.org/10.1086/431987>.
- Timms, V.J., Daskalopoulos, G., Mitchell, H.M., Neilan, B.A., 2016. The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* 11, e0148731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148731>.
- Turner, J., Torrelles, J.B., 2018. Mannose-capped lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Pathog Dis* 76. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty026>.
- Waddell, L.A., Rajic, A., Stark, K.D., Mc, E.S., 2015. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.* 143, 3135–3157. <https://doi.org/10.1017/S095026881500076X>.
- Wang, Y., Ye, Z., Ying, Y., 2012. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors* 12, 3449–3471. <https://doi.org/10.3390/s120303449>.
- Whitlock, R.H., Buerget, C., 1996. Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 12, 345–356. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30410-2).

5 DISKUSSION

Der weltweite Milchkonsum ist stetig im Steigen begriffen, Schätzungen zufolge werden im Jahr 2019 weltweit pro Kopf etwa 111,3 kg Milch im Jahr konsumiert werden (FAO, 2019). Dadurch steigt auch die potentielle Exposition des Menschen mit MAP, welche, durch Überleben der Pasteurisierung oder nachträgliche Kontamination der pasteurisierten Milch, immer wieder in Konsummilch und daraus hergestellten Milchprodukten gefunden werden können (Mullan, 2019; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010). Ferner stellt auch der gestiegene Konsum unpasteurisierter Rohmilch aus sogenannten Milchtankstellen ein Risiko dar, da dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit lebensmittelassoziierten Pathogenen deutlich erhöht wird (BfR, 2016). Solange eine mögliche Assoziation von MAP mit Erkrankungen des Menschen nicht ausgeschlossen werden kann, ist daher eine Minimierung der Exposition des Menschen, unter anderem durch Bereitstellung MAP-freier Lebensmittel, sinnvoll.

Obwohl klinisch erkrankte Kühe MAP in großen Mengen ausscheiden können, sind die Erregerkonzentrationen in großen Sammel- oder Tankmilchproben aus industriellen, milchverarbeitenden Betrieben in der Regel sehr klein (Ricchi et al., 2016; Slana et al., 2009; Sweeney et al., 1992). Aus diesem Grund müssen Nachweismethoden für MAP in solchen Milchproben nicht nur schnell und spezifisch sein, sondern auch sehr sensitiv. Ferner sollte zwischen lebenden, infektiösen Erregern und abgetöteten unterschieden werden können. Zusätzlich stellen die in der Milch vorhandene mikrobielle Hintergrundflora sowie Fett und PCR-Inhibitoren Herausforderungen für Sensitivität und Spezifität der gewählten Nachweismethode dar (Bickley et al., 1996; Gao et al., 2005; Grant et al., 2003; Lantz et al., 1994). Eine spezifische Voranreicherung von MAP, bei der sowohl die Erregerkonzentration erhöht, als auch inhibitorische Substanzen und Mikroorganismen eliminiert werden, ist daher hilfreich und sinnvoll. Ziel dieser Arbeit war es, eine Gruppe von 36 Pflanzenlektinen auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber MAP zu untersuchen und zu beurteilen, ob sie für die Entwicklung eines spezifischen Voranreicherungssystems geeignet sind. Dabei stellte sich heraus, dass Concanavalin A (ConA) und *Musa paradisiaca* Lektin (BanLec) eine starke Bindung mit MAP eingehen können und wenige bis keine unspezifischen Reaktionen mit Milchbestandteilen und typischer Milchbegleitflora zeigen. Die Bindung an intakte

MAP-Zellen sowie die Zuckerabhängigkeit der Bindung wurde via Immunfluoreszenz bestätigt.

In einem initialen Screening wurde die Bindungseffizienz aller 36 Lektine in einem direkten Bindungsassay auf MAP-Lysat vergleichend getestet. Anhand ihrer erreichten optischen Dichte (OD) wurden die Lektine daraufhin in vier Gruppen unterteilt: Keine/geringe Bindungseffizienz ($OD < 1$), mittlere Effizienz ($OD \geq 1$ und $< 1,5$), hohe Effizienz ($OD \geq 1,5$ und < 2) und sehr hohe Bindungseffizienz ($OD \geq 2$).

Von allen getesteten Lektinen waren *Lens culinaris* Agglutinin (LCA), *Lycopersicon esculentum* Lektin (LEL), *Musa Paradisiaca* Lektin (BanLec) und Concanavalin A (ConA) die einzigen mit einer sehr hohen Bindungseffizienz. Auffällig war dabei vor allem, dass Lektine mit einer gemischten Affinität für Glucose und Mannose (BanLec, ConA, LCA) oder N-Acetylglucosamin-Oligomere (LEL) eine hohe Effizienz erreichten, während andere, rein mannosespezifische Lektine, nur wenig effiziente Bindungen ausbildeten (HHL, GNL und NPL). Es ist bekannt, dass MAP über Mannoserezeptoren mit Makrophagen kommuniziert, zudem sind weitere mannosehaltige Strukturen auf der MAP-Oberfläche, wie z.B. ManLAM, beschrieben und charakterisiert (Sugden et al., 1987; Sweet et al., 2010). Daher wäre eine effizientere Bindung aller mannosespezifischen Lektine zu erwarten gewesen. Die Kohlenhydratbindungsregion von Lektinen setzt sich oft aus mehreren zuckerbindenden Untereinheiten zusammen, die untereinander eine positive Kooperativität ausbilden können, wenn ihre spezifischen Zucker in der richtigen räumlichen Konfiguration auftreten. Dies führt zu einer um ein Vielfaches verstärkten Bindung (Dos Santos Silva et al., 2019; Rini, 1995). Diese mehrfach verstärkte Bindung an spezifische längere Oligosaccharide, im Vergleich zu Mono- und Disacchariden, wurde auch für LCA, LEL, BanLec und ConA beschrieben (Debray et al., 1981; Nakamura-Tsuruta et al., 2008; Oguri, 2005). Es ist daher wahrscheinlich, dass auch hier die Bindung der Lektine mit sehr hoher Bindungseffizienz nicht allein auf einzelnen Zuckerresten basiert, sondern dass komplexere Oligosaccharide mit spezifischer Sequenz und räumlicher Struktur erkannt werden.

Den vier Lektinen aus der Gruppe mit sehr hoher Bindungseffizienz wird allen eine gemeinsame Affinität für verschiedene Typen von N-Glykanen vom komplexen oder Oligomannosetyp zugeschrieben. N-Glykane sind dadurch charakterisiert, dass sie über die Aminogruppe von Asparagin („N“ im 1-Buchstabencode) kovalent mit einem Protein oder Peptid verbunden sind. Der an Asparagin gebundene Zucker ist immer

ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc), an welches sich ein weiteres GlcNAc und drei Mannoseeinheiten anschließen. Das mittlere der drei Mannosemoleküle ist dabei über sein C1-Atom an das GlcNAc gebunden, während es mit den anderen beiden Mannoseeinheiten über C3 und C6 verbunden ist. Dadurch ergibt sich die Sequenz $\text{Man}(\alpha 1-3) [\text{Man}(\alpha 1-6)] \text{Man}(\beta 1-4) \text{GlcNAc}(\beta 1-4) \text{GlcNAc} \beta 1-\text{Asn}$ (Stanley et al., 2015). Je nach weiterer Modifikation der beiden äußeren Mannosemoleküle unterscheidet man drei Haupttypen der N-Glykane: Den Oligomannosetyp, den komplexen Typ und den Hybrid-Typ. Beim Oligomannosetyp werden beide terminalen Mannosemoleküle mit weiteren Mannoseeinheiten erweitert. Beim komplexen Typ werden, initiiert durch GlcNAc, sogenannte „Antennen“ gebildet, die durch Wiederholungen von N-Acetyllactosamin (LacNAc) verlängert werden können. Der Hybrid-Typ kombiniert die Eigenschaften der beiden anderen Typen, indem eines der Mannosemoleküle (das $(\alpha 1-6)$ -gebundene) mit Mannose erweitert wird, während das $(\alpha 1-3)$ -gebundene Mannosemolekül über ein bis zwei GlcNAc mit Antennen versehen wird (Stanley et al., 2015).

Das Tomatenlektin LEL zum Beispiel bindet an diverse Untereinheiten des komplexen und des Oligomannosetyps, dabei erkennt es in N-Glykanen vom komplexen Typ vorwiegend N-Acetyllactosamin (LacNAc), während es in solchen vom Oligomannosetyp an die Chitobiose (ein Dimer aus zwei $(\beta 1-4)$ verknüpften Glucosamin oder GlcNAc-Einheiten) der Kernstruktur bindet (Oguri, 2005). Bevorzugt bindet es jedoch stark verzweigte N-Glykane vom komplexen Typ mit drei oder mehr Ästen, wohingegen bi-antennäre Strukturen nur schwach gebunden werden. Das Vorhandensein einer drei-Antennen-Struktur scheint daher essentiell für seine Bindung zu sein (Oguri, 2005). In unserem Versuch erreichte LEL die dritthöchste Bindungseffizienz aller eingesetzten Lektine. Diese hochaffine Bindung deutet auf die Anwesenheit solcher tri-antennären komplexen N-Glykane hin.

ConA und LCA sind stark verwandte Lektine aus der Familie der Leguminosen-Lektine (Damme et al., 1998). Sie binden beide mit hoher Affinität an die Kernstruktur von N-Glykanen vom komplexen Typ – genauer, an die Trimannosestruktur, bei welcher die äußeren beiden Mannosereste jeweils mit N-Acetyl- β -Glucosaminresten substituiert sind (Debray et al., 1981). ConA erkennt dabei alle drei Mannoseeinheiten dieser Kernstruktur, was dazu führt, dass seine Affinität für N-Glykane weit höher ist als die für reine Mannosereste (Naismith and Field, 1996). Ein $(\alpha 1-6)$ -verknüpfter Fucoserest in der Nähe der N-glycosidischen Bindung erhöht

wiederum stark die Affinität von LCA, jedoch nicht die von ConA (Debray et al., 1981). LCA bindet präferentiell bi-antennäre Glycopeptide vom N-Acetyllactosamin-Typ mit Galactoseresten in terminaler, nicht-reduzierender Position, wohingegen es nur geringe Affinität für Mannosereste in selbiger Position aufweist (Debray and Montreuil, 1983; Kornfeld et al., 1981). Im Gegensatz dazu wird die Affinität von ConA durch einen (α 1-6)-verknüpften Mannoserest in terminaler, nicht-reduzierender Position (= Hybrid-Typ) noch erhöht, ebenso wie durch die Substitution der beiden äußeren (α 1-3)- bzw (α 1-6)-verknüpften Mannosereste mit vier weiteren (α 1-6)-Manoseeinheiten (= Oligomannosetyp) (Debray et al., 1981). Dadurch übersteigt die Affinität von ConA für N-Glykane vom Hybrid- oder Oligomannosetyp die für solche vom komplexen Typ (Cummings et al., 2017). Da ConA von allen Lektinen die höchste Bindungseffizienz zeigte, wird deutlich, dass neben N-Glykanen vom komplexen Typ (für die LEL und LCA hohe Affinität aufweisen) auch solche des Hybrid- oder Oligomannosetyps vorliegen müssen.

Zweitstärkstes Lektin im Screening war das aus der Familie der mannosebindenden Jacalin-artigen Lektine (mJRLs) stammende Bananenlektin. BanLec nimmt in dieser Familie aufgrund seiner sehr spezifischen Bindungseigenschaften eine Sonderstellung ein und bildet eine eigene Untergruppe (Nakamura-Tsuruta et al., 2008). Es bindet bevorzugt an lange N-Glykane vom Oligomannosetyp (7-9 Mannoseeinheiten) mit (α 1-2)-verknüpfter Mannose. Besondere Affinität bildet es dabei für die Struktur Man(α 1-2) Man(α 1-6) Man(α 1-6) Man β aus, die in N-Glykanen des Oligomannosetyps, jedoch nicht des komplexen Typs, vorkommt (Nakamura-Tsuruta et al., 2008). Einzigartig ist auch seine Vorliebe für interne (α 1-3)- und terminale (β 1-3)-Verknüpfungen am reduzierenden Terminus (Gavrovic-Jankulovic et al., 2008). Daher deutet die hocheffiziente Bindung von BanLec an MAP in unserer Studie stark auf die Anwesenheit von N-Glykanen des Oligomannosetyps auf MAP hin.

Weitere Aufschlüsse über die Struktur der Oligosaccharidkomponente der erkannten Glycopeptide ergeben sich aus der geringen Bindungseffizienz von *Pisum sativum* Agglutinin (PSA). PSA ist ein naher Verwandter von LCA mit nahezu identischer Kohlenhydratspezifität. Doch während LCA MAP mit sehr hoher Effizienz bindet, wurde PSA im Screening der Gruppe der Lektine mit geringer bis nicht vorhandener Bindungseffizienz zugeordnet. Wie LCA bindet es hochaffin an verzweigte N-Glykane vom komplexen Typ mit (α 1-6)-verknüpfter Fucose am Kernoligosaccharid (Kornfeld

et al., 1981). Doch während LCA terminale Galactosereste am nicht-reduzierenden Terminus bevorzugt, zieht PSA terminale Mannosereste vor, die wiederum die Affinität von LCA senken würden (Debrayand Montreuil, 1983; Kornfeld et al., 1981). Zieht man das, zusammen mit der Vorliebe von LEL für einen hohen Verzweigungsgrad und LacNAc, in Betracht, kann bei MAP auf die Anwesenheit verzweigter, komplexer N-Glykane vom N-Acetyllactosamin-Typ (LacNAc) geschlossen werden, bei denen das terminale LacNAc nicht modifiziert ist. Dadurch befinden sich Galactosereste in terminaler und nicht-reduzierender Position, was die Bindung von LCA verstärkt. Diese Zuckerspezifitäten der Lektine aus der Gruppe mit sehr hoher Bindungseffizienz weisen auf die Anwesenheit von N-Glykanen des komplexen oder Oligomannosetyps in der äußeren Zellwand von MAP hin. Ein solches Vorkommen wurde bereits auf genomischer Ebene vorhergesagt (Rana et al., 2014), jedoch unseres Wissens noch nicht auf Proteinebene bewiesen. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Vorhersage und beweisen somit erstmals das Vorkommen N-glycosylierter Glycopeptide auf der äußeren Zellmembran von MAP. Ferner beschreiben wir erstmalig eine vergleichende Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Vielfalt von Pflanzenlektinen an MAP.

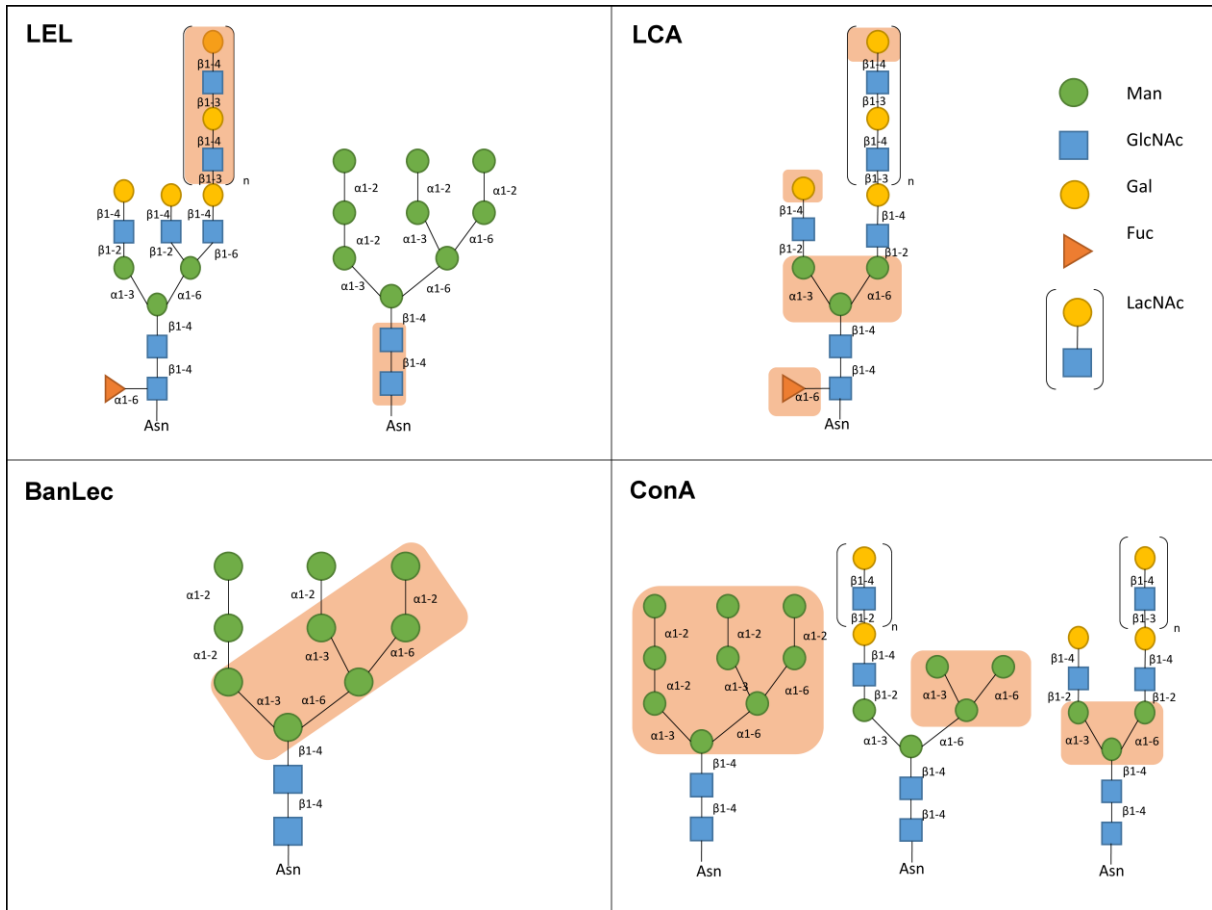


Abb. 1: Zuckerspezifität der Lektine aus der Gruppe mit sehr hoher Bindungseffizienz:

Schematische Darstellung der Bindungspräferenzen der Lektine *Lycopersicon esculentum* Lektin (LEL), *Lens culinaris* Agglutinin (LCA), *Musa paradisiaca* Lektin (BanLec) und Concanavalin A (ConA) bei der Bindung an N-Glykane vom komplexen, Hybrid- oder Oligomannosetyp. Rot hinterlegt sind die jeweils spezifisch gebundenen Zuckereinheiten. LEL bindet vorwiegend an N-Glykane vom komplexen Typ mit drei oder mehr Antennen (links) und dort vor allem an LacNAc. In N-Glykanen vom Oligomannosetyp (rechts) bindet es an die Chitobiose der Kernstruktur. LCA bindet, wie auch ConA, an die Trimannosestruktur des Kernoligosaccharids, bevorzugt bei biantennären komplexen N-Glykanen. Die Bindung wird verstärkt durch (α 1-6)-Fucosylierung des GlcNAc im Kern und terminale Galactosereste von LacNAc. Banlec erkennt in N-Glykanen vom Oligomannosetyp spezifisch die Struktur Man(α 1-2) Man(α 1-6) Man(α 1-6) Man β . Ebenso hat es eine Präferenz für interne (α 1-3)-Verknüpfungen. Die Bindung von ConA wird bei Glykanen vom Oligomannosetyp (links) durch weitere Mannosereste an der Grundstruktur verstärkt. In N-Glykanen vom Hybrid- (Mitte) und komplexen Typ (rechts) wird vor allem die Trimannosestruktur spezifisch gebunden.

Da der von uns verwendete direkte Bindungsassay auf MAP-Lysat keine Aussage über die Verfügbarkeit der gebundenen Antigene an der Zelloberfläche erlaubt, wurde die Bindung an die Oberfläche intakter MAP-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Verwendet wurden hierbei nur noch Lektine, die

keine starke Kreuzreaktivität mit Kontrollkeimen zeigten und gleichzeitig eine sehr hohe Bindungseffizienz im initialen Screening erzielt hatten (LCA, ConA und BanLec). Für alle drei Lektine konnte dabei ein positives Ergebnis erzielt werden. Die im Vergleich zu LCA und BanLec viel intensivere Fluoreszenz von ConA könnte darauf zurückzuführen sein, dass ConA sowohl an komplexe N-Glykane bindet, als auch an solche vom Hybrid- oder Oligomannosotyp, während LCA nur den komplexen und BanLec nur den Oligomannosotyp bindet. Dadurch ergeben sich für ConA deutlich mehr mögliche Bindungsstellen auf der MAP-Oberfläche, wodurch auch mehr fluoreszenzmarkierte ConA-Moleküle gebunden werden können.

Die Bindung von, mit Fluorescein (FITC) markiertem, ConA an Mykobakterien wurde bereits früher für *Mycobacterium fortituitum* und *Mycobacterium chelonae* nachgewiesen (Jackson et al., 1989), wurde aber bisher unserer Kenntnis nach noch nicht für MAP gezeigt. Auch die Färbung von MAP mit FITC-LCA und FITC-BanLec wurden in dieser Form noch nicht beschrieben.

Die Definition des Begriffs „Lektin“ nach Goldstein beschreibt Lektine als Proteine oder Glycoproteine mit mindestens zwei kohlenhydratbindenden Einheiten, die Zellen agglutinieren können und/oder Polysaccharide, Glycopeptide und Glycolipide präzipitieren können (Goldstein et al., 1980). Neuere Definitionen sehen Lektine eher als Gruppe von (Glyco-)Proteinen mit der Fähigkeit, Kohlenhydrate binden zu können. Davon ausgenommen sind zuckerspezifische Immunglobuline, Enzyme, die die Struktur des gebundenen Glykans verändern und Transport-/Sensormoleküle für freie Mono- bis Oligosaccharide (Gabijs et al., 2011). Auch wenn Goldsteins Definition nicht mehr ganz zeitgemäß ist, so beschreibt sie doch eine grundlegende Eigenschaft vieler Lektine, nämlich die Fähigkeit, Zellen agglutinieren zu können. Als Nebenbefund in unserem Versuch war zu beobachten, dass MAP-Zellen in der Anwesenheit von ConA eine deutliche Agglutinationstendenz zeigten (Fig. 3). Selbiges Phänomen war bei Inkubation mit den beiden anderen Lektinen nicht zu beobachten. Die Agglutination von MAP durch ConA ist keine neue Beobachtung. Schon 1936 beschrieben Sumner und Howell, dass eine Suspension des „Paratuberkulose-Organismus“ in Salzlösung durch Zugabe von ConA agglutiniert wird (Sumner and Howell, 1936). Auch für eine Vielzahl anderer Bakterien ist eine Agglutination mit ConA beschrieben (Davidson et al., 1982; Porter et al., 1998; Raghu et al., 2017), jedoch übersteigen die in diesen Studien verwendeten Lektinkonzentrationen die in unserer Studie eingesetzten um ein Vielfaches.

Athamna et al. analysierten 2006 das Agglutinationsverhalten von 18 *Mycobacterium* spp. in Anwesenheit von 23 Pflanzenlektinen. Dabei zeigte ConA mit einer minimalen Lektinkonzentration von 1,95µg/ml die mit Abstand niedrigste Minimalkonzentration aller getesteten Lektine für die Agglutination von *Mycobacterium avium* subsp. *avium* und *Mycobacterium intracellulare* (Athamna et al., 2006). MAP wurde in der betreffenden Studie nicht getestet, ebensowenig LCA und BanLec. In unserer Studie war eine Agglutination von MAP bereits bei einer Lektinkonzentration von 1µg/ml zu beobachten. Dass die mit 1µg/ml bewusst gering gewählte Konzentration der eingesetzten fluoreszenzmarkierten Lektine nur zu einer Agglutination der mit ConA inkubierten MAP führte und nicht zur Agglutination der mit LCA und BanLec inkubierten, kann mehrere Gründe haben: Zum einen wurde im initialen Screening schon deutlich, dass die Affinität von ConA für MAP ausgeprägter ist, als die von LCA und BanLec. Deshalb könnte für ConA mit 1µg/ml die minimale Lektinkonzentration für eine Agglutination bereits überschritten sein, während LCA und BanLec erst bei höheren Konzentrationen eine Agglutination herbeiführen würden. Um dies zu verifizieren, werden wir in Zukunft die Agglutinationstendenz von MAP mit steigender Lektinkonzentration untersuchen. Zum anderen liegt ConA, während LCA und BanLec beide als Dimer aufgebaut sind und somit zwei Kohlenhydratbindungsstellen besitzen, bei neutralem oder alkalischem pH als Tetramer vor. Somit ist die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Quervernetzungen unter MAP-Zellen für ConA wesentlich größer als für LCA und BanLec.

Die Bindung von Lektinen nicht nur an Zucker, sondern auch an hydrophobe Epitope ist wohlbekannt (Slifkinand Doyle, 1990). Zur Bestätigung der Zuckerabhängigkeit der Bindung der fluoreszenzmarkierten Lektine an MAP wurde deshalb die Inhibition der jeweiligen Bindung durch α -D-Mannose untersucht. Die Bindung von LCA an MAP konnte durch Inkubation in einer 20%igen (w/v) Mannoselösung fast vollständig inhibiert werden (Fig. 4). BanLec wurde in seiner Bindung zu MAP ebenfalls sehr stark inhibiert, jedoch waren im Gegensatz zu LCA immer noch vereinzelte Bindungen detektierbar. Die Inhibition der ConA-Bindung durch Mannose war wie bei LCA und BanLec deutlich sichtbar, jedoch waren im inhibierten Ansatz immer noch deutliche Bindungen vorhanden. Die Inhibierbarkeit durch Mannose zeigt, dass die Bindung der Lektine hauptsächlich über ihre jeweiligen spezifischen Oligosaccharide stattfindet und nicht über unspezifische Oberflächenwechselwirkungen. Die Restfluoreszenz im inhibierten Ansatz mit ConA kann mehrere Gründe haben: Zum

einen ist, durch die Vielzahl der möglichen Bindungsstellen für ConA, eine größere Anzahl von ConA-Molekülen auf der MAP-Oberfläche gebunden als bei LCA und BanLec, so dass bei gleicher Inhibierungseffizienz immer noch mehr Restfluoreszenz zu beobachten ist. Zum anderen führt die gesteigerte Agglutinationstendenz von MAP in der Anwesenheit von ConA zur Bildung von Zellhaufen. Fluoreszenzmarkiertes ConA, das im Inneren dieser Aggregate eingeschlossen ist, kommt vielleicht gar nicht mit dem inhibierenden Zucker in Kontakt und bleibt deshalb gebunden. Letztlich kommt auch eine höhere Affinität von ConA für sein spezifisches Ziel-Oligosaccharid als für isolierte Mannosereste in Frage. Dies soll in zukünftigen Studien durch Inhibition mit weiteren Zuckern überprüft werden, für die ConA eine höhere Affinität zeigt als für reine Mannose (z.B. α -Methyl-Mannopyranosid) bei gleichzeitiger mechanischer Auflösung der Zellaggregate (z.B. durch Ultraschall). Eine mögliche Inhibition der Lektinbindung könnte in einem Voranreicherungsschritt dahingehend genutzt werden, um gebundene MAP (z.B. auf einer lektinbeschichteten Säule) wieder zu eluieren.

Die Kohlenhydratfraktion von Milch besteht zum größten Teil aus Lactose (48 g/L), freien Oligosacchariden (0,05 g/L) und gebundenen Glykanen und Glykokonjugaten (Bode, 2012; Gopaland Gill, 2000). Um unspezifische Reaktionen mit Milchbestandteilen auszuschließen, wurden die Lektine mit mittlerer bis sehr hoher Bindungseffizienz im direkten Bindungsassay vergleichend auf MAP und drei verschiedenen Milcharten getestet. Dabei wurden vier Lektine (JAC, RCA-I, ECL und AAL) mit starken unspezifischen Reaktionen mit Milch vom weiteren Verlauf der Studie ausgeschlossen (Fig. 1). Keines dieser Lektine teilte die Spezifität für N-Glykane der vier Lektine aus der Gruppe mit sehr hoher Bindungseffizienz. Jacalin bindet ausschließlich an O-Glykane und hat eine Vorliebe für Galactosyl (β 1-3) N-Acetylgalactosamin (Table 1). O-Glykane sind auf fast allen Milchproteinen vorhanden, unter anderem auf dem Glykomakropeptid (GMP) des Kappa-Kaseins und auf Lactoferrin (O'Riordan et al., 2014). ECL und RCA-I weisen ebenfalls eine Spezifität für Galactose, RCA-I sogar für Lactose auf. AAL dagegen bindet spezifisch an Fucose, welche (α 1-6) mit GlcNAc oder (α 1-6) mit LacNAc verknüpft ist (Table 1). Generell ist eine Spezifität für Galactose oder Lactose als nachteilig für den Einsatz in Milch anzusehen, da die Lactose in der Milch einen Inhibitor der Lektinbindung darstellen kann. Von den Lektinen mit sehr hoher Bindungseffizienz für MAP zeigten

vor allem LEL und ConA eine leicht erhöhte Affinität für Milchbestandteile (Binding Ratio $\geq 0,5$ und < 1). Dies mag an ihrer eher breit gefassten Spezifität für mehrere Unterarten der N-Glykane liegen, im Gegensatz zu BanLec und LCA, die beide nur jeweils eine Unterart binden. N-Glykane kommen in Milch hauptsächlich auf Lactoferrin, Immunglobulinen und Bestandteilen der Membran der Milchfetttröpfchen (MFGM) vor, jedoch nicht auf dem GMP (O'Riordan et al., 2014). Sie liegen in Kuhmilch oft in stark sialylierter Form vor (im Gegensatz zu humaner Milch, wo Fucosylierungen überwiegen) (Nwosu et al., 2012). Für Lektine, die wie ConA oder LEL hauptsächlich die Kernstrukturen der Glykane binden, ist demnach eine hohe Kreuzreaktivität zu erwarten. Überraschenderweise ist die Bindung an Milchbestandteile für LEL und ConA zwar leicht erhöht, jedoch immer noch bedeutend geringer (ca 50%) als ihre Bindung an MAP (Fig. 1). Im Gegensatz dazu zeigten LCA und BanLec keine oder nur geringe Wechselwirkungen mit Milch. Dies liegt vermutlich zum einen an ihrer schmäleren Spezifität für verzweigte, fucosylierte N-Glykane vom komplexen Typ (LCA) bzw. vom Oligomannosetyp (BanLec) und zum anderen am hohen Sialyierungsgrad der Milchglycopeptide, der die Affinität der beiden Lektine durch Blockierung der spezifisch gebundenen terminalen Galactose (LCA) oder Mannose (BanLec) vermindert. Möglicherweise deshalb band LCA in unserem Versuch um ein Vielfaches besser an MAP (Faktor 5) als an Milch und BanLec sogar um den Faktor 10 (Fig. 1).

Die Verwendung verschiedener Milchcharten mit unterschiedlichem Fettgehalt (Vollmilch, fettarme Milch und Magermilch) schien in den meisten Fällen keine Auswirkung auf die Bindungseigenschaften der Lektine an Milchkomponenten zu haben. Die Ausnahme bildete RCA-I, dessen Reaktivität im Versuch mit sinkendem Fettgehalt der Milch immer weiter anstieg, was in abgeschwächter Form auch bei ECL, LTL und LEL zu beobachten war (Fig. 1). Ein möglicher Grund dafür ist, dass mit dem Fettgehalt der Milch auch der Anteil an MFGM-assoziierten Glycopeptiden und vor allem Glycolipiden sinkt, da ca. 70% der Glycolipide in Milch mit der MFGM assoziiert sind (Newburg and Chaturvedi, 1992). Es besteht die Möglichkeit, dass Glycolipide während der Beschichtung nur unvollständig an die Oberfläche der Platte adsorbiert werden und im Zuge des Waschens und der Inkubation mit dem Lektin abgelöst werden. Wenn das betreffende Lektin eine hohe Affinität für Glycolipide hat, kann so seine Bindung an die adsorbierten Milchbestandteile kompetitiv inhibiert

werden. Dies würde eine Affinität von RCA-I, ECL, LTL und LEL für Glycolipide implizieren.

Da ein Hauptziel einer spezifischen Voranreicherung aus Milch die Entfernung der ausgeprägten mikrobiellen Hintergrundflora der Milch ist, müssen auch unspezifische Reaktionen der Lektine mit Milchkeimen ausgeschlossen werden. Nachdem Lektine mit starken Wechselwirkungen zu Milchbestandteilen eliminiert worden waren, wurden die verbleibenden 12 Lektine deshalb auf Kreuzreaktionen mit 12 verschiedenen Bakterien getestet, die häufig in Milch vorkommen (Erreger von Lebensmittelinfektionen, -intoxikationen und Mastitiden sowie verschiedene Keime der Haut- und Darmflora). Sieben der zwölf getesteten Lektine schieden aufgrund starker Kreuzreaktivität mit den Kontrollkeimen aus der Studie aus (LTL, PNA, WGA, PTL, LEL, PHA-E und PHA-L; Fig. 2 Panels A-G), darunter auch LEL, das im Screening die dritthöchste Bindungseffizienz aller getesteten Lektine erreicht hatte. Es zeigte fünf starke (Binding ratio ≥ 1) und vier moderate Kreuzreaktionen (Binding ratio $\geq 0,75$) und schied somit als möglicher Kandidat für weitere Versuche aus (Fig. 2, Panel E). ACL, SBA und LCA zeigten nur starke Kreuzreaktionen mit *Pseudomonas aeruginosa*, jedoch waren insbesondere bei SBA und LCA moderate Kreuzreaktionen (Binding Ratio $\geq 0,75$) mit drei und leichte Kreuzreaktionen (Binding Ratio $\geq 0,5$) mit sieben (SBA) bzw. fünf (LCA) der anderen Kontrollkeime zu beobachten. Ein ähnliches Bild bot sich auch bei ACL, weswegen alle drei Lektine nur eingeschränkt für eine spezifische Voranreicherung geeignet sind (Fig. 2, Panel H-J). An dieser Stelle möchten wir den Leser darauf hinweisen, dass in Fig. 2 Panel C fälschlicherweise statt dem Kreuzreaktivitätsprofil von WGA das von AAL abgebildet ist, welches ja bereits wegen seiner starken Bindung an Milchbestandteile eliminiert wurde. WGA zeigte zwei starke Kreuzreaktionen mit *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie fünf weitere moderate sowie drei leichte Kreuzreaktionen und schied deshalb als stark kreuzreaktives Lektin aus der Studie aus.

BanLec reagierte stark mit *Pseudomonas aeruginosa* (Binding ratio ≥ 1) und leicht mit *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* und *Staphylococcus aureus*. (Binding Ratio $\geq 0,5$ und $< 0,75$) kreuz. ConA hingegen zeigte ausschließlich eine leichte Kreuzreaktion mit *Streptococcus dysgalactiae* (Binding Ratio ca. 0,57).

Eine unspezifische Anreicherung von nicht-MAP Mykobakterien stellt besonders für Phagen-Assays eine Gefahr dar, da der verwendete Mykobakteriophage D29 nicht

spezifisch für MAP ist, sondern auch andere Mykobakterien infizieren kann (Rybniker, 2006). Deshalb wurden auch Kreuzreaktionen der Lektine mit sechs weiteren Mykobakterien getestet, darunter drei Mitglieder des MAC (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, und *Mycobacterium intracellulare*).

Die Mykobakterien des MAC stehen in extrem naher Verwandtschaft untereinander und sind oft weder morphologisch noch serologisch unterscheidbar (Busatto et al., 2019). Diese Verwandtschaft wird auch deutlich durch die starke Kreuzreaktivität der Lektine zwischen diesen Spezies. Acht der zwölf getesteten Lektine zeigten starke Kreuzreaktionen zu *Mycobacterium avium* subsp. *avium* und sogar elf von zwölf Lektinen mit *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Kreuzreaktivität gegenüber *Mycobacterium intracellulare* war weniger stark ausgeprägt, aber immer noch deutlich vorhanden (ein Lektin mit starker und sieben mit moderater Kreuzreaktivität). Vor allem die Kreuzreaktivität von ConA war in unserer Studie fokussiert auf die getesteten *Mycobacterium* Spezies. Dabei waren vor allem nahe mit MAP verwandte Mykobakterien wie *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium asiaticum* und *Mycobacterium scrofulaceum* dominierend. *Mycobacterium terrae* ist, von den hier verwendeten Mykobakterien, auf dem phylogenetischen Baum am weitesten vom MAC und somit auch MAP entfernt (Tortoli, 2003). Das wird auch deutlich durch die im Vergleich zu den anderen getesteten Mykobakterien stark verminderte Bindung von ConA an *Mycobacterium terrae* (Fig. 2, Panel K). Im Gegensatz zu ConA traten starke Kreuzreaktionen mit Mykobakterien bei BanLec in unserer Studie nur in Verbindung mit *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*, und *Mycobacterium asiaticum* auf (Fig. 2, Panel L), während *Mycobacterium avium* subsp. *avium* moderate und *Mycobacterium intracellulare* nur leichte Kreuzreaktionen hervorriefen. Die Interaktion von ConA mit pathogenen Mikroorganismen ist gut charakterisiert, nicht zuletzt dadurch, dass es eines der am längsten bekannten Lektine überhaupt ist (Saleemuddin and Husain, 1991; Sumner, 1919). Goldstein und Misaki (1970) führten die Agglutination von Mykobakterien mit ConA auf dessen Bindung an terminale D-Arabinofuranosylreste von Arabinogalactan zurück (Goldstein and Misaki, 1970). Unsere Ergebnisse unterstützen diese These, da deutlich wird, dass ConA an ein in Mykobakterien stark konserviertes Oligosaccharid binden muss. Abgesehen von mykobakteriellen Zellwandbestandteilen wird ConA außerdem eine

Bindung an Teichonsäuren und LPS zugeschrieben, die typische Bestandteile der Zellwände grampositiver und gramnegativer Bakterien sind (Archibald and Coapes, 1971; Doyle and Birdsell, 1972; Doyle et al., 1968; Goldstein and Staub, 1970). Diese Beobachtung widerspricht nicht unseren Ergebnissen, jedoch wird in unserer Studie deutlich, dass die Interaktion von ConA mit Mykobakterien deutlich stärker ist als die mit anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Es ist daher davon auszugehen, dass die Bindung von ConA an Teichonsäuren und LPS über die Interaktion mit einzelnen Zuckerresten vermittelt ist, wohingegen in Mykobakterien offenbar ein komplexeres Oligosaccharid hochaffin gebunden wird.

BanLec wurde erstmals 1990 von Koshte et al. aus der Banane (*Musa paradisiaca*) isoliert und charakterisiert (Koshte et al., 1990). Deshalb gibt es noch nicht so viele detaillierte Beschreibungen seiner Bindung an Mikroorganismen wie bei ConA, welches als eines der am längsten bekannten und am besten erforschten Lektine gilt (Herman et al., 2019; Saleemuddin and Husain, 1991; Sumner, 1919; Sumner and Howell, 1936).

Es wurde beschrieben, dass BanLec (aus *Musa acuminata*) in der Lage ist, an das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) zu binden und so seinen Zelleintritt zu verhindern (Swanson et al., 2010). Außerdem bindet BanLec (*Musa acuminata*) an Mannan in der Zellwand von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Mo et al., 2001). Für rekombinantes BanLec (*Musa paradisiaca*) wurde eine Bindung an das Kapsidprotein des Tabakmosaikvirus und daraus resultierende Verhinderung der Infektion beschrieben (Liu et al., 2014). Eine Bindung von BanLec an Mykobakterien wurde unserer Kenntnis nach bisher aber nicht beschrieben. Die im Vergleich zu ConA weniger stark ausgeprägte Kreuzreaktivität von BanLec mit Mykobakterien spricht dafür, dass das von BanLec gebundene Oligosaccharid weniger konserviert ist als das von ConA. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass die von ConA erkannte Kernstruktur Teil verschiedener Glycosylierungen sein kann, wogegen die Spezifität von BanLec keine solche Variabilität der Zielstruktur erlaubt. Der Prozess der N-Glycosylierung in Bakterien wurde erstmals Anfang dieses Jahrhunderts für *Camphylobacter jejuni* beschrieben (Young, 2002). Seitdem wurden auch N-Glykane auf einigen weiteren Bakterienspezies, unter anderem bei *Helicobacter* spp., *Actinobacillus* spp. und *Pseudomonas* spp., entdeckt (Schäffer and Messner, 2016). In unserer Studie zeigten LEL, LCA und BanLec starke Kreuzreaktionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und unterstützen somit diese Beobachtungen. Im Falle

von ConA war allerdings keine Kreuzreaktivität mit *Pseudomonas aeruginosa* zu beobachten.

Auch wenn Mykobakterien nicht die einzigen Bakterien sind, welche N-Glycosylierungen ausbilden können, impliziert die bevorzugte Bindung von ConA und BanLec an Mykobakterien im Vergleich zu den anderen Kontrollkeimen aber, dass die spezifischen Zieloligosaccharide für diese beiden Lektine in Mykobakterien entweder mengenmäßig höher abundant sind oder sie in einer Art und Weise vorliegen, die die Bindungseffizienz von ConA und BanLec im Vergleich zu den Kontrollkeimen erhöht. Dieses Kreuzreaktivitätsprofil macht ConA und BanLec nicht nur zu den Lektinen mit der höchsten Bindungseffizienz für MAP, sondern auch zu den spezifischsten in dieser Studie. Eine ausschließliche Spezifität für MAP lag allerdings nicht vor. Dies kann beim Einsatz dieser Lektine in der Voranreicherung von MAP aus Milch zur geringgradigen unspezifischen Mitanreicherung anderer Mykobakterien führen, was einen nachfolgenden Nachweis über Kultur oder Phagen-Assay erschwert. Eine solche geringgradige, unspezifische Anreicherung (ca. 10%) ist aber bei allen Anreicherungsverfahren zu erwarten, die auf magnetischen beads basieren, da sich Bakterien ungeachtet der spezifischen Bindungsmoleküle über elektrostatische oder van der Waals Wechselwirkungen an die Oberfläche der magnetischen Beads anlagern können (Foddai et al., 2010). Besonders Mykobakterien des MAC sind für Oberflächenanlagerung und Biofilmbildung bekannt (Busatto et al., 2019). Über Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen auf der Oberfläche der Beads, z.B. durch Magermilchpulver, kann die unspezifische Anreicherung zwar reduziert, jedoch nicht ganz verhindert werden und ist außerdem mit einer Minderung der Sensitivität verbunden (Foddai et al., 2010). Eine Voranreicherung von MAP, egal ob mittels Lektinen oder anderen MAP-bindenden Molekülen, wird daher wahrscheinlich nie eine Spezifität von 100% erreichen, weshalb diese im nächsten Schritt durch ein spezifisches Nachweissystem sichergestellt werden muss.

Die breitere Spezifität von Lektinen könnte jedoch auch Vorteile bieten: Es ist bekannt, dass die Oberflächenstruktur von MAP nicht immer gleich ist. MAP beispielsweise, die aus dem Darm von Menschen isoliert wurden, weisen oft keine oder stark veränderte Zellwände auf (Chiodini et al., 1986; Schwartz et al., 2000; Sechi et al., 2005). Außerdem konnte festgestellt werden, dass MAP, die in Kontakt

mit Milch kommen, die Zusammensetzung ihres Zellwandlipidprofils ändern können und mehr zellinvasions-assoziierte Gene exprimieren (Alonso-Hearn et al., 2010). *In vitro* Experimente zeigten, dass MAP einen Monolayer aus MDBK-Zellen in deutlich höherer Zahl und in kürzerer Zeit durchqueren konnten, wenn sie vorhergehend in Milch inkubiert wurden (Bermudez et al., 2010). Demnach ist es wahrscheinlich, dass auch andere Oberflächenantigene (vor allem solche für die Interaktion mit Enterozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen) in Milch differentiell exprimiert sind. Zuletzt dürfen auch MAP-Endosporen oder in Dormanz befindliche Bakterien nicht vergessen werden (Lamont et al., 2012a; Whittington et al., 2004). Diese Vielfalt der möglichen Oberflächenkonfigurationen von MAP erschwert den Einsatz von hochspezifischen Bindemolekülen für die Anreicherung, da MAP mit veränderter Oberfläche möglicherweise nicht immer zuverlässig gebunden werden. Dies wird auch dadurch deutlich, dass die etablierte PMS-Methode mit aMptD und aMp3 nur durch die Kombination zweier MAP-bindender Moleküle eine ausreichend hohe Anreicherungseffizienz erreicht (Foddai et al., 2010). Hierbei könnte sich die breitere Spezifität der Lektine als Vorteil erweisen.

Protokolle für den Nachweis von MAP in Milch beinhalten oft einen Zentrifugationsschritt zur initialen Aufkonzentrierung von MAP. Dabei liegen laut Grant et al (1998) ca. 69,4% der MAP im Pellet vor und weitere 13% und 17,6% in der Rahmschicht und der Molke (Grant et al., 1998). Andere Autoren fanden deutlich mehr MAP in der Rahmschicht als im Pellet (Gao et al., 2005). Viele aktuelle Protokolle sehen daher ein Poolen von Pellet und Rahmschicht nach der Zentrifugation für die weitere Verwendung vor (Butot et al., 2019). MAP, die sich möglicherweise in der wässrigen Phase befanden, werden somit verworfen und nicht detektiert. Eine vorhergehende Agglutination der MAP durch Zugabe eines Lektins könnte den Anteil der im Pellet sedimentierten MAP und dadurch auch die Gesamtausbeute erhöhen. Ob sich die erhöhte Agglutinationstendenz von MAP in Anwesenheit von ConA für eine erleichterte Voranreicherung von MAP mittels Zentrifugation oder magnetischen Beads nutzbar machen lässt, soll in weiteren Studien geklärt werden.

Der Aufbau vieler Lektine als Di- oder Tetramer bietet auch Vorteile für die Anwendung in einem Voranreicherungsverfahren, da dadurch eine höhere Abundanz an Kohlenhydratbindungsstellen auf der festen Phase (Bead, Säule o.ä.) erreicht werden kann. Für die MAP-bindenden Peptide aMptD und aMp3 ist bekannt, dass

die räumliche Orientierung ihrer Bindungsstelle eine entscheidende Bedeutung für die Effizienz der Anreicherung hat (Foddai et al., 2010). Durch den oligomeren Aufbau der Lektine ist eine größere Variabilität der räumlichen Ausrichtung der Bindungsstellen möglich, was einen positiven Einfluss auf die Bindung an MAP haben könnte.

Als Methode für die vergleichende Charakterisierung der Lektinbindung an MAP wurde in unserer Studie ein Screening im direkten Bindungsassay auf MAP-Lysat gewählt. Dieses Format bringt einige Vor- und Nachteile mit sich: Ein Vorteil dieser Lektin-ELISA (ELLeCISA) Technik besteht darin, dass alle getesteten Lektine im selben Assay im direkten Vergleich getestet werden konnten, ohne Interassayvarianzen in Kauf nehmen zu müssen. Dabei kann die Bindungseffizienz der einzelnen Lektine durch die Stärke der Farbreaktion und die resultierende optische Dichte direkt miteinander verglichen werden. Ein ganz ähnliches Prinzip verwendeten zum Beispiel O'Brien et al. (2016), um verschiedene monoklonale Antikörper und MAP-bindende Peptide auf ihre Eignung für eine Anreicherung von MAP aus Milch zu screenen. Indikativ für eine Bindung an MAP war hierbei ebenfalls eine erhöhte optische Dichte ($OD > 1$). Im Unterschied zu unserem Versuch wurden allerdings ganze, bestrahlte MAP-Zellen für die Beschichtung der Platten verwendet („whole cell antigen“, WCA), um eine Bindung an Oberflächenstrukturen der MAP sicherzustellen (O'Brien et al., 2016). Diese Herangehensweise bietet zwar den Vorteil einer erhaltenen Oberflächenstruktur der MAP-Zellen, jedoch ist eine homogene Verteilung der MAP in den einzelnen Dellen und vor allem eine konstante MAP-Konzentration in verschiedenen Dellen der Platte nur schwer sicherzustellen, da MAP die starke Tendenz zeigt, sich zu Klumpen zusammenzulagern (Kralik et al., 2012). Das erschwert zum einen die genaue Quantifizierung der eingesetzten MAP-Zellen (Marquetoux et al., 2019), zum anderen kann eine gleichmäßige Verteilung der MAP in der Suspension und folglich auch auf der Platte nicht sichergestellt werden. Die Verwendung von Lysat hingegen bietet eine viel homogenere Verteilung der Antigene und dadurch eine geringere Intraassay-Varianz und höhere Vergleichbarkeit, jedoch auf Kosten einer intakten Oberflächenstruktur. Es kann somit in unserem Screening keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Lektine an Strukturen auf der MAP-Oberfläche oder an intrazelluläre Strukturen binden, weshalb eine nachfolgende Bestätigung der Oberflächenspezifität durch

Fluoreszenzmikroskopie erfolgen musste. Ebenfalls möglich ist, dass während des Lysierens mittels Ultraschall und durch eventuelle denaturierende Eigenschaften des Lysepuffers die native Struktur einiger Lektin-Bindungsstellen zerstört wurde. Es ist also nicht auszuschließen, dass vereinzelt falsch-negative Ergebnisse entstanden sind und manche Lektine höhere Bindungseffizienzen mit intakten MAP-Zellen gezeigt hätten.

Bei der Untersuchung der Kreuzreaktivität der Lektine mit Kontrollkeimen kann durch die Verwendung lysierter Bakterien die Beschichtung der Platten auf eine Proteinmenge von 5µg/ml für alle getesteten Kontrollkeime normalisiert werden. Dadurch ergibt sich eine direkte semiquantitative Vergleichbarkeit der Bindungseffizienz der Lektine an die verschiedenen Keime. Reaktionen mit Kontrollkeimen konnten so in direkte Relation zu MAP gesetzt werden und als relative Bindungsstärke ausgedrückt werden (Fig. 2). Wie bereits erwähnt, wird in unserem Assay nicht die Lokalisation der gebundenen Antigene berücksichtigt, weshalb diese Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die Bindung von intakten Bakterienzellen übertragbar sind. Allerdings ist davon auszugehen, dass ein Bakterium, das in unserer Studie eine geringe relative Bindungsstärke im Vergleich zu MAP aufweist, auch unter anderen Bedingungen schlechter gebunden wird. Das vergleichende Screening auf Kreuzreaktionen im ELISA gab uns die Möglichkeit, eine Vielzahl von Lektinen auf Kreuzreaktionen mit einer weiten Palette von Kontrollkeimen zu testen und dadurch stark kreuzreaktive Lektine zu eliminieren. Die Kreuzreaktivität der Lektine, die am Ende als Kandidaten für eine Anreicherung von MAP ausgewählt wurden, muss in weiteren Studien unter den Bedingungen des geplanten Einsatzes (intakte Bakterienzellen in Milch) weiter charakterisiert werden. Auch für die Identifizierung von monoklonalen Antikörpern und Peptidbindern für die Anreicherung von MAP wird standardmäßig die Kreuzreaktivität mit anderen Mykobakterien und Milchflora getestet, jedoch erfolgt dies meistens über die Quantifizierung unspezifischer Anreicherung dieser Bakterien im fertigen magnetischen Separationsassay (Foddai et al., 2010; O'Brien et al., 2016). Dabei können Unsicherheitsfaktoren wie Kultivierbarkeit und Klumpung der Mykobakterien oder unspezifische Anreicherung durch Bindung der Bakterien an die Oberfläche der Beads eine genaue Aussage über die Art der unspezifischen Reaktionen mit den Kontrollkeimen erschweren. Steward et al. (2012) beschreibt einen kompetitiven ELISA für die Beurteilung von Kreuzreaktionen von generierten Antikörpern und

Peptid-Bindemolekülen (Stewart et al., 2012). Dabei werden die zu untersuchenden Bakterien in Suspension in mit WCA oder EEA (mit Ethanol extrahierte Membranantigene) beschichtete Dellen auf der Platte gegeben und dann die Abschwächung der Bindung an das Zielantigen im Vergleich zu Dellen ohne Bakterien beurteilt. Aber auch hier kann eine Zusammenlagerung der zu testenden Mykobakterien, durch die damit einhergehende Verringerung der Oberfläche der Bakterien, fälschlicherweise den Eindruck nicht vorhandener oder gering ausgeprägter Kreuzreaktivität erwecken.

Weitere Herangehensweisen für die Charakterisierung von Lektinen für den Einsatz in einer spezifischen Voranreicherung anderer Mikroorganismen stützen sich auf die makroskopische Beurteilung der Agglutination des betreffenden Keims durch die Lektine oder Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Lektinen (Harito et al., 2016; Raghu et al., 2017). Da native MAP-Zellen schon per se eine Tendenz zur Autoagglutination aufweisen (Kralik et al., 2012), kann eine auf Agglutination basierende Methode bei MAP nur schwer angewandt werden. Außerdem sind die Ergebnisse dieser Methoden oft schwer reproduzierbar und können nicht ohne weiteres semiquantitativ miteinander verglichen werden. Ebenso ist eine Charakterisierung mittels Fluoreszenz schwer und hauptsächlich subjektiv quantifizierbar, weshalb sie in unserer Studie nur zur Bestätigung der Bindung an intakte MAP-Zellen eingesetzt wurde.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von MAP-Lysat ist auch die direkte Vergleichbarkeit mit anderen Substanzen wie zum Beispiel Milchproteinen. Bei der Verwendung von WCA wird die Beschichtung der einzelnen Dellen anhand der eingesetzten Zellzahl pro ml standardisiert (O'Brien et al., 2016), wohingegen in unserem Assay eine genormte Proteinkonzentration verwendet wurde (5µg/ml). Somit ist der direkte Vergleich mit einer äquivalenten Menge an Milchproteinen leichter als bei der Verwendung intakter MAP-Zellen. Die inhibitorischen Auswirkungen löslicher Kohlenhydrate wie Lactose oder freier Oligosaccharide konnten in diesem Assay allerdings nicht beurteilt werden, da diese während der Beschichtung der Platte nicht adsorbiert werden. Das heißt, obwohl ein Lektin in diesem Assay keine gesteigerte Reaktivität mit den adsorbierten Milchbestandteilen aufwies, kann dennoch beim Einsatz in Milch eine Kreuzreaktion mit löslichen Kohlenhydraten (z.B. Lactose) auftreten, die in unserem Assay nicht detektiert werden konnte. Unser Assay diente vor allem dazu, die Auswahl an Lektinen

einzuengen, indem Lektine aussortiert wurden, die definitiv Kreuzreaktionen mit Milch zeigen würden. Spätere starke Kreuzreaktionen mit Lactose sind für LEL, LCA, BanLec und ConA also nicht definitiv auszuschließen, jedoch weist keines dieser Lektine eine Spezifität für Lactose auf, weshalb dies wenig wahrscheinlich ist.

In unserer Studie wurde ein stark laboradaptierter MAP-Stamm verwendet. Dies bot den Vorteil, dass wir auf diese Weise schnell eine große Zahl Lektine unter standardisierten Bedingungen testen konnten. Für weitere Studien, in denen die Anreicherung von MAP mittels der in dieser Studie identifizierten Kandidaten ConA und BanLec untersucht werden soll, müssen selbstverständlich auch andere MAP-Stämme mit einbezogen werden, sowie Versuche, sowohl mit artifiziell, als auch mit natürlich kontaminierter Milch durchgeführt werden. Hierfür stehen uns bereits Milchproben von infizierten Kühen aus einem Bestand mit Paratuberkulose zur Verfügung. Außerdem werden wir die Bindung der Lektine an MAP, die verschiedenen Stressoren ausgesetzt wurden, fluoreszenzmikroskopisch testen, um festzustellen, ob eine dadurch eventuell veränderte Oberflächenszusammensetzung die Bindung der Lektine beeinflusst.

Insgesamt 36 Lektine wurden in unserer Studie auf ihre Bindungseigenschaften bezüglich MAP, Milch und milchassoziierter Bakterien und Mykobakterien getestet.

Davon schieden 20 im initialen Screening aufgrund unzureichender Bindungseffizienz aus. Vier der verbliebenen Lektine zeigten unspezifische Reaktionen mit Milchbestandteilen und wurden deshalb im zweiten Versuch eliminiert. Hohe Kreuzreaktivität mit Milchkeimen und Mykobakterien im dritten Versuch waren der Grund für das Ausscheiden sieben weiterer Lektine. Von den fünf verbliebenen wurden schließlich die drei Lektine mit der höchsten Bindungseffizienz (LCA, ConA und BanLec) als Kandidaten für die Entwicklung eines Voranreicherungsverfahrens für MAP aus Milch ausgewählt und ihre Bindung an intakte MAP-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

LCA ist von den drei Kandidaten das Lektin mit der niedrigsten Bindungseffizienz, außerdem zeigte es mit zwei starken (Binding ratio ≥ 1) und sechs moderaten Kreuzreaktionen (Binding ratio $\geq 0,75$) deutlich mehr Kreuzreaktivität als ConA und BanLec (Fig. 2, Panel J) und ist somit deutlich weniger für den Einsatz als MAP bindendes Molekül in einer Voranreicherung geeignet. ConA erreichte im initialen Screening die höchste Bindungseffizienz aller getesteten Lektine. Bis auf

Kreuzreaktionen mit fünf der sechs eingesetzten Mykobakterien zeigte es mit keinem weiteren getesteten Kontrollkeim eine Reaktion, die seine Bindung an MAP übertrifft (Binding ratio ≥ 1) oder ihr gleichkommt (Binding ratio $\geq 0,75$). Jedoch waren leichte unspezifische Reaktionen mit Milchbestandteilen zu beobachten (Binding ratio ca. 0,5). Dies könnte zu Einschränkungen seiner Einsetzbarkeit in Milch führen, was wir in weiteren Studien näher untersuchen werden. Im Gegensatz dazu war die Bindung von BanLec an MAP zehnmal höher als seine Reaktion mit Milchbestandteilen (Binding ratio ca. 0,1). Zudem besitzt es von den drei Kandidaten die am wenigsten ausgeprägte Kreuzreaktivität mit drei starken und einer moderaten Kreuzreaktion. Im Screening war BanLec nach ConA das Lektin mit der zweithöchsten Bindungseffizienz. Diese starke Bindung an MAP, gepaart mit seiner hohen Spezifität und geringen Bindung an Milchbestandteile, machen BanLec zu einem vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen und letztendlich die Entwicklung eines spezifischen Voranreicherungsverfahrens.

Wir sehen in der Verwendung von Lektinen für die spezifische Voranreicherung von MAP aus Milch große Chancen und Vorteile: Unsere Studie hat ergeben, dass die Lektine ConA und BanLec eine starke Bindung mit MAP eingehen können und dass diese Bindung nicht oder wenig von der komplexen Matrix Milch beeinträchtigt wird. Die Spezifität der Lektine, die etwas breiter gefasst ist als die beispielsweise von monoklonalen Antikörpern oder MAP-bindenden Proteinen, kann vorteilhaft sein im Hinblick auf die Variabilität der Oberfläche von MAP in Milch. Sie wird aber vermutlich auch zu einer geringen unspezifischen Anreicherung von Begleitflora führen, die allerdings auch mit keiner anderen bisher etablierten Methode verhindert werden kann (Foddai et al., 2010). Durch auf diese Weise mitangereicherte Mikroorganismen kann die Performance von kulturellen und phagenbasierten Nachweisverfahren beeinträchtigt werden. Für den molekularbiologischen Nachweis von MAP mittels PCR ist eine hundertprozentige Spezifität der Anreicherung jedoch nicht essentiell. Somit könnte eine Kombination von lektinmediierter Voranreicherung und PCR eine deutliche Verbesserung der Sensitivität zur Folge haben.

In Zukunft werden wir die Eignung von ConA und BanLec für die Voranreicherung von MAP noch weiter charakterisieren. Dazu wurden bereits erste Versuche mit biotinyliertem ConA und BanLec, gekoppelt an MyOne Streptavidin T1 beads (ThermoFisher), gemacht. Wir konnten bisher bereits Anreicherungseffizienzen für MAP in PBS-T von bis zu 90% (BanLec) erreichen (nicht publizierte Daten). Die

unspezifische Anreicherung anderer Mykobakterien in PBS-T lag bei 27% (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*) und 44% (*Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*). Darauf aufbauend sollen noch weitere Versuche in Milch folgen sowie die Bestimmung der unspezifischen Anreicherung anderer lebender Kontrollkeime in Milch. Auch Versuche bezüglich Anreicherung aus natürlich infizierter Milch und Agglutination von MAP mit Lektinen in verschiedenen Konzentrationen sind geplant, ebenso wie das Screening weiterer Mannose/Glucose-spezifischer Lektine wie BanLec aus *Musa acuminata* und das erst kürzlich beschriebene und noch nicht kommerziell erhältliche Litchi-Lektin (*Litchi chinensis*) (Bose et al., 2016).

6 ZUSAMMENFASSUNG

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, der Erreger der Paratuberkulose oder Johnsenchen Erkrankung beim Wiederkäuer steht seit langer Zeit in Verdacht an der Entstehung von Erkrankungen des Menschen wie Morbus Crohn und ulzerativer Colitis beteiligt zu sein. Vor allem der Konsum von Milch stellt eine mögliche Übertragungsrouten auf den Menschen dar, da MAP, durch seine außergewöhnliche Widerstandsfähigkeit, den Prozess der Pasteurisierung überleben kann. Daher ist es notwendig, MAP in Milch schnell, sensitiv und spezifisch nachweisen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, 36 Pflanzenlektine auf ihre Eignung im Rahmen einer spezifischen Voranreicherung von MAP aus Milchproben zu testen um somit Sensitivität und Spezifität der etablierten Nachweismethoden zu verbessern.

Die Lektine wurden im direkten Bindungsassay auf MAP-Lysat auf ihre Bindungseffizienz bezüglich MAP getestet sowie bezüglich Kreuzreaktionen mit Milchbestandteilen, mikrobieller Milchflora und mit nicht-MAP Mykobakterien. Die Bindung an intakte MAP-Zellen, sowie die Zuckerabhängigkeit der Bindung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Mannose-vermittelter Inhibition der Fluoreszenz bestätigt.

Vier der 36 Lektine banden MAP mit sehr hoher Bindungseffizienz, sechs mit hoher und weitere sechs mit mittlerer Bindungseffizienz. Von diesen 16 Kandidaten wurden vier aufgrund hoher Kreuzreaktivität mit Milch und sieben aufgrund hoher Kreuzreaktivität mit Milchkeimen und Mykobakterien eliminiert. Aus der Gruppe der verbliebenen fünf Lektine wurden *Lens culinaris* Agglutinin (LCA), Concanavalin A (ConA) und *Musa paradisiaca* Lektin (BanLec) als mögliche Kandidaten für eine Anreicherung identifiziert und ihre Bindung an intakte MAP-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

ConA und BanLec, zwei Lektine mit einer Spezifität für N-Glykane vom komplexen oder vom Oligomannosetyp, wurden als die vielversprechendsten Kandidaten für eine spezifische Voranreicherung von MAP ausgewählt. Beide Lektine banden MAP im Screening mit sehr hoher Effizienz und zeigten auch bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zuverlässige Bindung an intakte MAP-Zellen, die durch Inkubation mit 20% α -D-Mannose inhibiert werden konnte. Diese Ergebnisse weisen auf die Anwesenheit von N-Glykosylierungen vom komplexen und vom Oligomannosetyp auf der MAP-Oberfläche hin. Bei der Untersuchung auf

Kreuzreaktionen mit Milchbestandteilen zeigten beide Lektine höhere Affinität für MAP als für Milchbestandteile (Faktor 2 bei ConA und Faktor 10 bei BanLec). Für ConA konnten keine Kreuzreaktionen mit Milchflora festgestellt werden, dafür zeigte es aber starke Kreuzreaktionen mit den meisten der getesteten Mykobakterien, insbesondere *Mycobacterium avium* subsp. *avium* und *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Zusätzlich führte die Inkubation intakter MAP-Zellen mit ConA zu einer deutlichen Agglutination von MAP. BanLec kreuzreagierte hingegen nur stark mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* und *Mycobacterium asiaticum*. Aufgrund dieser Kreuzreaktivität muss bei ConA und BanLec mit minimaler unspezifischer Anreicherung von nicht-MAP Mykobakterien gerechnet werden. Diese unspezifische Anreicherung ist jedoch auch für alle anderen Anreicherungsverfahren unvermeidbar, aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit der festen Phase, auf der die MAP-bindenden Moleküle eingesetzt werden.

Unseren Ergebnissen zufolge, könnten ConA und BanLec gut für die Entwicklung eines Voranreicherungsverfahrens von MAP aus Milch geeignet sein. Die Anwendbarkeit eines solchen Bead-basierten Anreicherungsverfahrens mit ConA und BanLec sowie Nachweisgrenzen und Spezifität sollen in weiteren Studien untersucht werden.

7 SUMMARY

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), the causative agent of paratuberculosis or Johne's Disease, has long been suspected for being involved in the development of human morbidity, especially Crohn's disease and ulcerative Colitis. Since MAP is able to survive pasteurization due to its extraordinary tenacity, milk consumption in particular represents a possible route of transmission to humans. Thus, fast, sensitive and specific detection of MAP in milk is necessary.

The goal of the presented study was the evaluation of 36 plant lectins for their suitability in a specific pre-enrichment of MAP from milk samples, in order to increase the sensitivity and specificity of established detection methods.

Lectins were tested for their binding efficiency towards MAP and their cross reactivity with milk components, milk microbiota and with non-MAP mycobacteria in a direct binding assay on lysed MAP. Binding to intact MAP cells as well as sugar dependency of respective binding was confirmed via fluorescent microscopy and mannose-mediated inhibition of fluorescence.

Four of the 36 lectins were found to bind MAP with very high efficiency, six with high efficiency and another six with medium efficiency. From those 16 candidates, four were eliminated due to high cross reactivity with milk components and seven due to high cross reactivity with milk microbiota and non-MAP mycobacteria. From the remaining group of five lectins, *Lens culinaris* agglutinin (LCA), Concanavalin A (ConA) and *Musa paradisiaca* lectin (BanLec) were selected as possible enrichment candidates and their binding to intact MAP cells was evaluated via fluorescent microscopy.

ConA and BanLec, two lectins with a specificity for complex or oligomannose-type N-glycans, were selected as the most promising candidates for specific enrichment of MAP from milk. Both lectins showed very high binding efficiency in the initial screening and reliably bound to intact MAP cells as observed by fluorescent microscopy. Additionally, incubation with a 20% solution of α -D-Mannose led to inhibition of respective binding. These results suggest the existence of complex or oligomannose-type N-glycosylations on the surface of MAP cells. When tested for cross reactivity with milk components, both lectins expressed higher affinity for MAP than for milk (ConA twofold and BanLec tenfold). No cross reactions with milk microbiota could be observed for ConA. However, it expressed strong cross-reactivity

towards most of the tested mycobacteria, especially *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. Additionally, after incubation of intact MAP cells with ConA, distinct agglutination was observed. BanLec on the other hand only showed strong cross reactions with *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* and *Mycobacterium asiaticum*. Due to this cross-reactivity, minimal non-specific recovery of non-MAP mycobacteria has to be expected for both ConA and BanLec. This non-specific recovery however, is equally inevitable for every other enrichment method, due to non-specific surface interactions between microbiota and the solid phase on which the detection molecules are employed.

Our results suggest that ConA and BanLec could be well suited for the development of a pre-enrichment method for MAP from milk. Applicability of such a bead based enrichment method, as well as its specificity and detection limits will be assessed in future studies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Alcedo, K.P.; Thanigachalam, S.; Naser, S.A., 2016. RHB-104 triple antibiotics combination in culture is bactericidal and should be effective for treatment of Crohn's disease associated with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Gut Pathogens* 8 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0115-3>.

Alonso-Hearn, M.; Eckstein, T.M.; Sommer, S.; Bermudez, L.E., 2010. A *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LuxR regulates cell envelope and virulence. *Innate Immunity* 16 (4): 235-247. <http://doi.org/10.1177/1753425909339811>.

Archibald, A.R.; Coapes, H.E., 1971. The interaction of concanavalin A with teichoic acids and bacterial walls. *Biochemical Journal* 123 (4): 665-667. <https://doi.org/10.1042/bj1230665>.

Athamna, A.; Cohen, D.; Athamna, M.; Ofek, I.; Stavri, H., 2006. Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. *Journal of Microbiological Methods* 65 (2): 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.008>.

Bannantine, J.P.; Bermudez, L.E., 2013. No Holes Barred: Invasion of the Intestinal Mucosa by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 81 (11): 3960-3965. <https://doi.org/10.1128/iai.00575-13>.

Barclay, R.; Ratledge, C., 1983. Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis* and *M. avium*. *Journal of Bacteriology* 153 (3): 1138-1146. <https://j.b.asm.org/content/153/3/1138.short>.

Bates, A.; O'Brien, R.; Liggett, S.; Griffin, F., 2018. The effect of sub-clinical infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on milk production in a New Zealand dairy herd. *BMC Veterinary Research* 14 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1421-4>.

Beard, P.M.; Daniels, M.J.; Henderson, D.; Pirie, A.; Rudge, K.; Buxton, D.; Rhind, S.; Greig, A.; Hutchings, M.R.; McKendrick, I.; Stevenson, K.; Sharp, J.M., 2001. Paratuberculosis Infection of Nonruminant Wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4): 1517-1521. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.4.1517-1521.2001>.

Begg, D.J.; Plain, K.M.; De Silva, K.; Gurung, R.; Gunn, A.; Purdie, A.C.; Whittington, R.J., 2018. Immunopathological changes and apparent recovery from infection revealed in cattle in an experimental model of Johne's disease using a lyophilised culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 219: 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.029>.

Bermudez, L.E.; Petrofsky, M.; Sommer, S.; Barletta, R.G., 2010. Peyer's Patch-Deficient Mice Demonstrate That *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Translocates across the Mucosal Barrier via both M Cells and Enterocytes but Has Inefficient Dissemination. *Infection and Immunity* 78 (8): 3570-3577. <https://doi.org/10.1128/iai.01411-09>.

BfR, 2016. Rohmilch: Abkochen schützt vor Infektion mit *Campylobacter* - Stellungnahme Nr. 008/2016 des BfR vom 13. April 2016. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Germany. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/rohmilch-abkochen-schuetzt-vor-infektionen-mit-campylobacter.pdf>. zuletzt aufgerufen am 01. Oktober 2019

Bicart-See, A.; Rottman, M.; Cartwright, M.; Seiler, B.; Gamini, N.; Rodas, M.; Penary, M.; Giordano, G.; Oswald, E.; Super, M.; Ingber, D.E., 2016. Rapid Isolation of *Staphylococcus aureus* Pathogens from Infected Clinical Samples Using Magnetic Beads Coated with Fc-Mannose Binding Lectin. *PLoS One* 11 (6): e0156287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156287>.

Bickley, J.; Short, J.K.; McDowell, D.G.; Parkes, H.C., 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22 (2): 153-158. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01131.x>.

Bitti, M.L.; Masala, S.; Capasso, F.; Rapini, N.; Piccinini, S.; Angelini, F.; Pierantozzi, A.; Lidano, R.; Pietrosanti, S.; Paccagnini, D., 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in an Italian cohort of type 1 diabetes pediatric patients. *Clinical and Developmental Immunology* 2012: ID: 785262. <https://doi.org/10.1155/2012/785262>.

Bo, M.; Niegowska, M.; Arru, G.; Sechi, E.; Mariotto, S.; Mancinelli, C.; Farinazzo, A.; Alberti, D.; Gajofatto, A.; Ferrari, S.; Capra, R.; Monaco, S.; Sechi, G.; Sechi, L.A., 2018. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and myelin basic protein specific epitopes are highly recognized by sera from patients with Neuromyelitis optica spectrum disorder. *Journal of Neuroimmunology* 318: 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.02.013>.

Bode, L., 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22 (9): 1147-1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>.

Bose, P.P.; Bhattacharjee, S.; Singha, S.; Mandal, S.; Mondal, G.; Gupta, P.; Chatterjee, B.P., 2016. A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. *Biochemistry and Biophysics Reports* 6: 242-252. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.05.001>.

Botsaris, G.; Liapi, M.; Kakogiannis, C.; Dodd, C.E.R.; Rees, C.E.D., 2013. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk tank milk by combined phage-PCR assay: Evidence that plaque number is a good predictor of MAP. *International Journal of Food Microbiology* 164 (1): 76-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.023>.

Botsaris, G.; Swift, B.M.; Slana, I.; Liapi, M.; Christodoulou, M.; Hatzitofi, M.; Christodoulou, V.; Rees, C.E., 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and

confirmed by culture. *International Journal of Food Microbiology* 216: 91-94.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.011>.

Brennan, P.J.; Goren, M.B., 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum*-serocomplex. *Journal of Biological Chemistry* 254 (10): 4205-4211.
<http://www.jbc.org/content/254/10/4205.long>.

Brennan, P.J.; Nikaido, H., 1995. The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* 64 (1): 29-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>.

Bull, T.J.; McMinn, E.J.; Sidi-Boumedine, K.; Skull, A.; Durkin, D.; Neild, P.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Hermon-Taylor, J., 2003. Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (7): 2915-2923. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.2915-2923.2003>.

Busatto, C.; Vianna, J.S.; da Silva, L.V.; Ramis, I.B.; da Silva, P.E.A., 2019. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis* 114: 127-134.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.004>.

Butot, S.; Ricchi, M.; Sevilla, I.A.; Michot, L.; Molina, E.; Tello, M.; Russo, S.; Arrigoni, N.; Garrido, J.M.; Tomas, D., 2019. Estimation of Performance Characteristics of Analytical Methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Detection in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* 10: 509.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00509>.

Cerf, O.; Griffiths, M.W., 2000. *Mycobacterium paratuberculosis* heat resistance. *Letters in Applied Microbiology* 30 (4): 341-342. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00718.x>.

Chakravorty, D.; Hensel, M., 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 5 (7): 621-627.
[https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(03\)00096-0](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(03)00096-0).

Charavaryamath, C.; Gonzalez-Cano, P.; Fries, P.; Gomis, S.; Doig, K.; Scruten, E.; Potter, A.; Napper, S.; Griebel, P.J., 2013. Host Responses to Persistent *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Infection in Surgically Isolated Bovine Ileal Segments. *Clinical and Vaccine Immunology* 20 (2): 156.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00496-12>.

Chiaradia, L.; Lefebvre, C.; Parra, J.; Marcoux, J.; Burlet-Schiltz, O.; Etienne, G.; Tropis, M.; Daffé, M., 2017. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports* 7 (1): 12807. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>.

Chiodini, R.J.; Hermon-Taylor, J., 1993. The Thermal Resistance of *Mycobacterium Paratuberculosis* in Raw Milk under Conditions Simulating Pasteurization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5 (4): 629-631.
<https://doi.org/10.1177/104063879300500424>.

Chiodini, R.J.; Van Kruiningen, H.J.; Merkal, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *The Cornell Veterinarian* 74 (3): 218-262. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6375961>.

Chiodini, R.J.; Van Kruiningen, H.J.; Thayer, W.R.; Coutu, J.A., 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 24 (3): 357-363. <https://jcm.asm.org/content/24/3/357.short>.

Cocito, C.; Gilot, P.; Coene, M.; de Kesel, M.; Poupart, P.; Vannuffel, P., 1994. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* 7 (3): 328-345. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.3.328>.

Condron, R.; Farrokh, C.; Jordan, K.; McClure, P.; Ross, T.; Cerf, O., 2015. Guidelines for experimental design protocol and validation procedure for the measurement of heat resistance of microorganisms in milk. *International Journal of Food Microbiology* 192: 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.027>.

Cossu, D.; Cocco, E.; Paccagnini, D.; Masala, S.; Ahmed, N.; Frau, J.; Marrosu, M.G.; Sechi, L.A., 2011. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Multiple Sclerosis in Sardinian Patients. *PLoS One* 6 (4): e18482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018482>.

Cossu, D.; Masala, S.; Frau, J.; Cocco, E.; Marrosu, M.G.; Sechi, L.A., 2013. Anti *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* heat shock protein 70 antibodies in the sera of Sardinian patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 335 (1): 131-133. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.09.011>.

Cossu, D.; Yokoyama, K.; Sechi, L.A.; Otsubo, S.; Tomizawa, Y.; Momotani, E.; Hattori, N., 2016. Humoral response against host-mimetic homologous epitopes of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Japanese multiple sclerosis patients. *Scientific Reports* 6: 29227. <https://doi.org/10.1038/srep29227>.

Crohn, B.B.; Ginzburg, L.; Oppenheimer, G.D., 1932. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* 99 (16): 1323-1329. <https://doi.org/10.1001/jama.1932.02740680019005>.

Cummings, R.D.; Darvill, A.G.; Etzler, M.E.; Hahn, M.G., 2017. Glycan-recognizing probes as tools, in: Varki A, C.R., Esko JD, et al. (Ed.) *Essentials of Glycobiology* [Internet]. , 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453096/>.

D'Amore, M.; Lisi, S.; Sisto, M.; Cucci, L.; Dow, C.T., 2010. Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in an Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson-Rosenthal syndrome. *Journal of Medical Microbiology* 59 (1): 137-139. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013474-0>.

Daffé, M.; Quémard, A.; Marrakchi, H., 2017. Mycolic Acids: From Chemistry to Biology, in: Geiger, O. (Ed.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*. Springer International Publishing, Cham, Germany. ISBN: 978-3-319-43676-0. http://doi.org/10.1007/978-3-319-43676-0_18-1.

Dalziel, T.K., 1913. Chronic Interstitial Enteritis. *The British Medical Journal* 2 (2756): 1068-1070. <http://www.jstor.org/stable/25307529>.

Damme, E.J.M.V.; Peumans, W.J.; Barre, A.; Rougé, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17 (6): 575-692. <https://doi.org/10.1080/07352689891304276>.

Davidson, S.K.; Keller, K.F.; Doyle, R.J., 1982. Differentiation of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by lectins and plant agglutinins. *Journal of Clinical Microbiology* 15 (4): 547-553. <https://jcm.asm.org/content/15/4/547.short>.

Debray, H.; Decout, D.; Strecker, G.; Spik, G.; Montreuil, J., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry* 117 (1): 41-51. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06300.x>.

Debray, H.; Montreuil, J., 1983. Structural basis for the affinity of four insolubilized lectins, with a specificity for α -D-mannose, towards various glycopeptides with the N-glycosylamine linkage and related oligosaccharides. *Journal of Biosciences* 5 (1): 93-100. <https://doi.org/10.1007/BF02702979>.

Dos Santos Silva, P.M.; De Oliveira, W.F.; Albuquerque, P.B.S.; Dos Santos Correia, M.T.; Coelho, L.C.B.B., 2019. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. *International Journal of Biological Macromolecules* 140: 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.059>.

Dow, C.T., 2012. *M. paratuberculosis* Heat Shock Protein 65 and Human Diseases: Bridging Infection and Autoimmunity. *Autoimmune Diseases* 2012: 6 pages, Article ID 150824. <https://doi.org/10.1155/2012/150824>.

Dow, C.T.; Sechi, L.A., 2011. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes Mellitus – *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, in: Wagner, D. (Ed.) Type 1 Diabetes-Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. IntechOpen. ISBN: 978-953-307-362-0. <https://doi.org/10.5772/20614>.

Doyle, R.J.; Birdsell, D.C., 1972. Interaction of Concanavalin A with the Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 109 (2): 652-658. <https://jb.asm.org/node/78801.short>.

Doyle, R.J.; Woodside, E.E.; Fishel, C.W., 1968. Protein–polyelectrolyte interactions. The concanavalin A precipitin reaction with polyelectrolytes and polysaccharide derivatives. *Biochemical Journal* 106 (1): 35-40. <http://doi.org/10.1042/bj1060035>.

Eisenberg, S.W.; Koets, A.P.; Nielen, M.; Heederik, D.; Mortier, R.; De Buck, J.; Orsel, K., 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Research* 42 (1): 117. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-42-117>.

Elguezabal, N.; Bastida, F.; Sevilla, I.A.; González, N.; Molina, E.; Garrido, J.M.; Juste, R.A., 2011. Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth parameters: strain characterization and comparison of methods. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (24): 8615-8624. <http://doi.org/10.1128/AEM.05818-11>.

Englund, S.; Bölske, G.; Johansson, K.-E., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters* 209 (2): 267-271. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00552-9).

Eslami, M.; Shafiei, M.; Ghasemian, A.; Valizadeh, S.; Al-Marzoqi, A.H.; Shokouhi Mostafavi, S.K.; Nojoomi, F.; Mirforoughi, S.A., 2019. *Mycobacterium avium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex and related subspecies as causative agents of zoonotic and occupational diseases. *Journal of Cellular Physiology* 234 (8): 12415-12421. <https://doi.org/10.1002/jcp.28076>.

FAO, 2019. Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets, 1st ed. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy. ISBN: 978-92-5-131448-7. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA4526EN>.

FAO/WHO, 2004. Code of hygienic practice for milk and milk products (CAC/RCP 57-2004), in, Codex alimentarius - milk and milk products, 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization, Rome, Italy. ISBN: 978-92-5-105837-4. <http://www.fao.org/3/a-i2085e.pdf>.

Feller, M.; Huwiler, K.; Schoepfer, A.; Shang, A.; Furrer, H.; Egger, M., 2010. Long-Term Antibiotic Treatment for Crohn's Disease: Systematic Review and Meta-Analysis of Placebo-Controlled Trials. *Clinical Infectious Diseases* 50 (4): 473-480. <https://doi.org/10.1086/649923>.

FLI, 2012. Testcharakteristika der zugelassenen ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beim Rind gemessen an den Referenzpanels Serum und Milch des NRL, Stand 12-2012. Friedrich Löffler Institut - Referenzlabor für Paratuberkulose, Jena, Germany. https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IMP/Information_NRL_Paratuberkulose.pdf. zuletzt aufgerufen am 01. Oktober 2019

FLI, 2018. Paratuberkulose, in: Amtliche Methodensammlung : Meldepflichtige Tierkrankheiten. Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald - Insel Riems. https://www.openagrar.de/receive/openagrar_mods_00006124

Foddai, A.; Elliott, C.T.; Grant, I.R., 2009. Optimization of a Phage Amplification Assay To Permit Accurate Enumeration of Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12): 3896-3902. <http://doi.org/10.1128/aem.00294-09>.

Foddai, A.; Elliott, C.T.; Grant, I.R., 2010. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

cells. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (22): 7550-7558.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01432-10>.

Foddai, A.C.; Grant, I.R., 2017. Sensitive and specific detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk by the peptide-mediated magnetic separation-phage assay. *Journal of Applied Microbiology* 122 (5): 1357-1367. <https://doi.org/10.1111/jam.13425>.

Gabius, H.-J.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Romero, A.; Solís, D., 2011. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences* 36 (6): 298-313. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.01.005>.

Gao, A.; Odumeru, J.; Raymond, M.; Mutharia, L., 2005. Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: Effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69 (2): 81-87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1142174/>.

Garg, A.; Kumari, B.; Singhal, N.; Kumar, M., 2018. Using molecular-mimicry-inducing pathways of pathogens as novel drug targets. *Drug Discovery Today* 24 (9): 1943-1952. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644618302563>.

Garvey, M., 2018. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety. *Open Veterinary Journal* 8 (2): 172-181. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i2.10>.

Gavrovic-Jankulovic, M.; Poulsen, K.; Brckalo, T.; Bobic, S.; Lindner, B.; Petersen, A., 2008. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (5): 929-941.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.033>.

Gerrard, Z.E.; Swift, B.M.C.; Botsaris, G.; Davidson, R.S.; Hutchings, M.R.; Huxley, J.N.; Rees, C.E.D., 2018. Survival of *Mycobacterium avium* subspecies in retail pasteurised milk. *Food Microbiology* 74: 57-63.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>.

Gill, C.O.; Saucier, L.; Meadus, W.J., 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *Journal of Food Protection* 74 (3): 480-499. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-301>.

Golan, L.; Livneh-Kol, A.; Gonen, E.; Yagel, S.; Rosenshine, I.; N, 2009. *Mycobacterium avium paratuberculosis* Invades Human Small-Intestinal Goblet Cells and Elicits Inflammation. *The Journal of Infectious Diseases* 199 (3): 350-354.
<https://doi.org/10.1086/596033>.

Goldstein, I.J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N., 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285: 66. <https://doi.org/10.1038/285066b0>.

- Goldstein, I.J.; Misaki, A., 1970.** Interaction of Concanavalin A with an Arabinogalactan from the Cell Wall of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology* 103 (2): 422-425. <https://jlb.asm.org/node/59075.short>.
- Goldstein, I.J.; Staub, A.M., 1970.** Interaction of concanavalin A with polysaccharides of salmonellae. *Immunochemistry* 7 (3): 315-318. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(70\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0019-2791(70)90170-9).
- Gopal, P.K.; Gill, H.S., 2000.** Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition* 84 (S1). <https://doi.org/10.1017/s0007114500002270>.
- Grant, I.R.; Ball, H.J.; Rowe, M.T., 1998.** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (9): 3153-3158. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106703/pdf/am003153.pdf>.
- Grant, I.R.; Ball, H.J.; Rowe, M.T., 1999.** Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72°C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Letters in Applied Microbiology* 28 (6): 461-465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00557.x>.
- Grant, I.R.; Hitchings, E.I.; McCartney, A.; Ferguson, F.; Rowe, M.T., 2002.** Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization on the Viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in Naturally Infected Cows' Milk. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 602-607. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.602-607.2002>.
- Grant, I.R.; Kirk, R.B.; Hitchings, E.; Rowe, M.T., 2003.** Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Journal of Applied Microbiology* 95 (1): 196-201. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02003.x>.
- Grant, I.R.; Rowe, M.T., 2004.** Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Letters in Applied Microbiology* 38 (4): 283-288. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01498.x>.
- Grant, I.R.; Williams, A.G.; Rowe, M.T.; Muir, D.D., 2005.** Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 2853-2861. <https://doi.org/10.1128/aem.71.6.2853-2861.2005>.
- Green, E.P.; Tizard, M.L.V.; Moss, M.T.; Thompson, J.; Winterbourne, D.J.; McFadden, J.J.; Hermon-Taylor, J., 1989.** Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Research* 17 (22): 9063-9073. <https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9063>.

Griffith, D.E.; Aksamit, T.; Brown-Elliott, B.A.; Catanzaro, A.; Daley, C.; Gordin, F.; Holland, S.M.; Horsburgh, R.; Huitt, G.; Iademarco, M.F.; Iseman, M.; Olivier, K.; Ruoss, S.; Von Reyn, C.F.; Wallace, R.J.; Winthrop, K., 2007. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175 (4): 367-416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571st>.

Gupta, U.; Katoch, V., 1995. Animal models in leprosy. *Indian Journal of Medical Microbiology* 13 (2): 57-67. <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=1995;volume=13;issue=2;spage=57;epage=64;aulast=Gupta;type=0>.

Harito, J.B.; Campbell, A.T.; Prestrud, K.W.; Dubey, J.P.; Robertson, L.J., 2016. Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. *Experimental Parasitology* 165: 88-94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.022>.

Harito, J.B.; Campbell, A.T.; Tysnes, K.R.; Dubey, J.P.; Robertson, L.J., 2017a. Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Research* 114: 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.044>.

Harito, J.B.; Campbell, A.T.; Tysnes, K.R.; Robertson, L.J., 2017b. Use of lectin-magnetic separation (LMS) for detecting *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental water samples. *Water Research* 127: 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.012>.

Herman, K.; Weiss, M.; Lekka, M.; Ptak, A., 2019. How Complex Is the Concanavalin A–Carboxypeptidase Y Interaction? *ACS Chemical Biology* 14 (7): 1611-1618. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00337>.

Hess, S.; Rambukkana, A., 2019. Cell Biology of Intracellular Adaptation of *Mycobacterium leprae* in the Peripheral Nervous System. *Microbiology Spectrum* 7 (4): BAI-0020-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0020-2019>.

Horgen, L.; Barrow, E.L.W.; Barrow, W.W.; Rastogi, N., 2000. Exposure of human peripheral blood mononuclear cells to total lipids and serovar-specific glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* serovars 4 and 8 results in inhibition of TH1-type responses. *Microbial Pathogenesis* 29 (1): 9-16. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0358>.

Husakova, M.; Dziedzinska, R.; Slana, I., 2017. Magnetic Separation Methods for the Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Various Types of Matrices: A Review. *BioMed Research International* 2017: 5869854. <https://doi.org/10.1155/2017/5869854>.

Ikonomopoulos, J.; Pavlik, I.; Bartos, M.; Svastova, P.; Ayele, W.Y.; Roubal, P.; Lukas, J.; Cook, N.; Gazouli, M., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Retail Cheeses from Greece and the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8934-8936. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.8934-8936.2005>.

Jackson, M.; Chan, R.; Matoba, A.Y.; Robin, B., 1989. The Use of Fluorescein-Conjugated Lectins for Visualizing Atypical Mycobacteria. *JAMA Ophthalmology* 107 (8): 1206-1209. <https://doi.org/10.1001/archopht.1989.01070020272037>.

Jeyanathan, M.; Boutros-Tadros, O.; Radhi, J.; Semret, M.; Bitton, A.; Behr, M.A., 2007. Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes and Infection* 9 (14): 1567-1573. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.001>.

Johne, H.; Frothingham, L., 1895. Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch. Z. Tiermed. Pathol* 21: 438-454.

Juffs, H.S.; Deeth, H., 2007. Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products. Food Standards Australia New Zealand, Canberra, Australia. ISBN: 0642345554. <https://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/Documents/Scientific%20Evaluation.pdf>.

Kamradt, T.; Göggel, R.; Erb, K.J., 2005. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends in Immunology* 26 (5): 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.03.009>.

Karuppusamy, S.; Kirby, G.M.; Mutharia, L.; Tripathi, B.N., 2019. An update on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens and their role in the diagnosis of Johne's disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (8): 120. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2691-0>.

Khalifeh, M.S.; Al-Majali, A.M.; Stabel, J.R., 2009. Role of nitric oxide production in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 131 (1): 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.03.020>.

Khare, S.; Lawhon, S.D.; Drake, K.L.; Nunes, J.E.S.; Figueiredo, J.F.; Rossetti, C.A.; Gull, T.; Everts, R.E.; Lewin, H.A.; Galindo, C.L.; Garner, H.R.; Adams, L.G., 2012. Systems Biology Analysis of Gene Expression during In Vivo *Mycobacterium avium paratuberculosis* Enteric Colonization Reveals Role for Immune Tolerance. *PLoS One* 7 (8): e42127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042127>.

Khare, S.; Nunes, J.S.; Figueiredo, J.F.; Lawhon, S.D.; Rossetti, C.A.; Gull, T.; Rice-Ficht, A.C.; Adams, L.G., 2009. Early Phase Morphological Lesions and Transcriptional Responses of Bovine Ileum Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology* 46 (4): 717-728. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0187-G-FL>.

Khol, J.L.; Braun, A.L.; Slana, I.; Kralik, P.; Wittek, T., 2017. Testing of milk replacers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR and bacterial culture as a possible source for Johne's disease (paratuberculosis) in calves. *Preventive Veterinary Medicine* 144: 53-56. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.013>.

- Ko, S.M.; Kwon, J.; Vaidya, B.; Choi, J.S.; Lee, H.M.; Oh, M.J.; Bae, H.J.; Cho, S.Y.; Oh, K.S.; Kim, D., 2014. Development of lectin-linked immunomagnetic separation for the detection of hepatitis a virus. *Viruses* 6 (3): 1037-1048. <https://doi.org/10.3390/v6031037>.
- Koch, R., 1882. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 19: 221-230. <http://dx.doi.org/10.25646/5088>.
- Koets, A.P.; Eda, S.; Sreevatsan, S., 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Veterinary Research* 46 (1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0185-0>.
- Kopecna, M.; Trcka, I.; Lamka, J.; Moravkova, M.; Koubek, P.; Heroldova, M.; Mrlik, V.; Kralova, A.; Pavlik, I., 2008. The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. *Veterinarni medicina* 53 (8): 420-426. <https://doi.org/10.17221/1931-VETMED>.
- Kornfeld, K.; Reitman, M.L.; Kornfeld, R., 1981. The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant. *Journal of Biological Chemistry* 256 (13): 6633-6640. <http://www.jbc.org/content/256/13/6633.abstract>.
- Koshte, V.L.; Van Dijk, W.; Van Der Stelt, M.E.; Aalberse, R.C., 1990. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiaca* (banana). *Biochemical Journal* 272 (3): 721-726. <https://doi.org/10.1042/bj2720721>.
- Kralik, P.; Beran, V.; Pavlik, I., 2012. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. *BMC Research Notes* 5 (1): 114. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-114>.
- Kuenstner, J.T.; Naser, S.; Chamberlin, W.; Borody, T.; Graham, D.Y.; McNees, A.; Hermon-Taylor, J.; Hermon-Taylor, A.; Dow, C.T.; Thayer, W.; Biesecker, J.; Collins, M.T.; Sechi, L.A.; Singh, S.V.; Zhang, P.; Shafran, I.; Weg, S.; Telega, G.; Rothstein, R.; Oken, H.; Schimpff, S.; Bach, H.; Bull, T.; Grant, I.; Ellingson, J.; Dahmen, H.; Lipton, J.; Gupta, S.; Chaubey, K.; Singh, M.; Agarwal, P.; Kumar, A.; Misri, J.; Sohal, J.; Dhama, K.; Hemati, Z.; Davis, W.; Hier, M.; Aitken, J.; Pierce, E.; Parrish, N.; Goldberg, N.; Kali, M.; Bendre, S.; Agrawal, G.; Baldassano, R.; Linn, P.; Sweeney, R.W.; Fecteau, M.; Hofstaedter, C.; Potula, R.; Timofeeva, O.; Geier, S.; John, K.; Zayanni, N.; Malaty, H.M.; Kahlenborn, C.; Kravitz, A.; Bulfon, A.; Daskalopoulos, G.; Mitchell, H.; Neilan, B.; Timms, V.; Cossu, D.; Mameli, G.; Angermeier, P.; Jelic, T.; Goethe, R.; Juste, R.A.; Kuenstner, L., 2017. The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) Conference 2017. *Frontiers in Public Health* 5: 208. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00208>.
- Lamont, E.A.; Bannantine, J.P.; Armien, A.; Ariyakumar, D.S.; Sreevatsan, S., 2012a. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Cultures. *PLoS One* 7 (1): e30648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030648>.

- Lamont, E.A.; O'Grady, S.M.; Davis, W.C.; Eckstein, T.; Sreevatsan, S., 2012b.** Infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Results in Rapid Interleukin-1 β Release and Macrophage Transepithelial Migration. *Infection and Immunity* 80 (9): 3225-3235. <https://doi.org/10.1128/iai.06322-11>.
- Laneelle, G.; Asselineau, J., 1968.** Structure d'un glycoside de peptidolipide isole d'une mycobacterie. *European Journal of Biochemistry* 5 (4): 487-491. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00396.x>.
- Lantz, P.-G.; Hahn-Hägerdal, B.; Rådström, P., 1994.** Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends in Food Science & Technology* 5 (12): 384-389. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90166-X](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90166-X).
- Li, L.; Bannantine, J.P.; Zhang, Q.; Amonsin, A.; May, B.J.; Alt, D.; Banerji, N.; Kanjilal, S.; Kapur, V., 2005.** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (35): 12344-12349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505662102>.
- Lipman, N.S.; Jackson, L.R.; Trudel, L.J.; Weis-Garcia, F., 2005.** Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal* 46 (3): 258-268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>.
- Liu, X.-Y.; Li, H.; Zhang, W., 2014.** The lectin from *Musa paradisiaca* binds with the capsid protein of tobacco mosaic virus and prevents viral infection. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 28 (3): 408-416. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.925317>.
- Liverani, E.; Scaioli, E.; Cardamone, C.; Dal Monte, P.; Belluzzi, A., 2014.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World Journal of Gastroenterology* 20 (36): 13060-13070. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.13060>.
- Loeffler, F., 1884.** Untersuchung über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe, in, *Mitteilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte*, Berlin, Germany. <https://archive.org/details/39002010412584.med.yale.edu>.
- Lorencova, A.; Babak, V.; Kralova, A.; Borilova, G., 2019.** Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw fermented sausages during production and storage. *Meat Science* 155: 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.04.023>.
- Lynch, D.; Jordan, K.N.; Kelly, P.M.; Freyne, T.; Murphy, P.M., 2007.** Heat sensitivity of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurization conditions. *International Journal of Dairy Technology* 60 (2): 98-104. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00317.x>.

- Manning, E.; Collins, M., 2001.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (OIE)* 20 (1): 133-150. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.20.1.1275>.
- Marquetoux, N.; Ridler, A.; Heuer, C.; Wilson, P., 2019.** What counts? A review of in vitro methods for the enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 230: 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.011>.
- Marrakchi, H.; Lanéelle, M.-A.; Daffé, M., 2014.** Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chemistry & Biology* 21 (1): 67-85. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.11.011>.
- Masala, S.; Cossu, D.; Piccinini, S.; Rapini, N.; Mameli, G.; Manca Bitti, M.L.; Sechi, L.A., 2015.** Proinsulin and MAP3865c homologous epitopes are a target of antibody response in new-onset type 1 diabetes children from continental Italy. *Pediatric Diabetes* 16 (3): 189-195. <https://doi.org/10.1111/pedi.12269>.
- McAloon, C.G.; Roche, S.; Ritter, C.; Barkema, H.W.; Whyte, P.; More, S.J.; O'Grady, L.; Green, M.J.; Doherty, M.L., 2019.** A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *The Veterinary Journal* 246: 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010>.
- McClure, H.M.; Chiodini, R.J.; Anderson, D.C.; Swenson, R.B.; Thayer, W.R.; Coutu, J.A., 1987.** *Mycobacterium paratuberculosis* Infection in a Colony of Stumptail Macaques (*Macaca arctoides*). *The Journal of Infectious Diseases* 155 (5): 1011-1019. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.1011>.
- McKenna, S.L.B.; Keefe, G.P.; Tiwari, A.; VanLeeuwen, J.; Barkema, H.W., 2006.** Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne* 47 (11): 1089-1099. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17147140>.
- Mo, H.; Winter, H.C.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J.; Misaki, A.; Goldstein, I.J., 2001.** Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. *European Journal of Biochemistry* 268 (9): 2609-2615. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02148.x>.
- Möbius, P.; Hotzel, H.; Raßbach, A.; Köhler, H., 2008.** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 126 (4): 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.016>.
- Momotani, E.; Whipple, D.L.; Thiermann, A.B.; Cheville, N.F., 1988.** Role of M Cells and Macrophages in the Entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into Domes of Ileal Peyer's Patches in Calves. *Veterinary Pathology* 25 (2): 131-137. <https://doi.org/10.1177/030098588802500205>.
- Monot, M., 2005.** On the Origin of Leprosy. *Science* 308 (5724): 1040-1042. <https://doi.org/10.1126/science/1109759>.

- Moss, M.T.; Green, E.P.; Tizard, M.L.; Malik, Z.P.; Hermon-Taylor, J., 1991.** Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut* 32 (4): 395-398. <https://doi.org/10.1136/gut.32.4.395>.
- Mullan, W.M.A., 2019.** Are we closer to understanding why viable cells of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are still being reported in pasteurised milk? *International Journal of Dairy Technology* 72 (3): 332-344. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12617>.
- Naismith, J.H.; Field, R.A., 1996.** Structural Basis of Trimannoside Recognition by Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* 271 (2): 972-976. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.972>.
- Nakamura-Tsuruta, S.; Uchiyama, N.; Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.; Totani, K.; Ito, Y.; Hirabayashi, J., 2008.** Analysis of the sugar-binding specificity of mannose-binding-type Jacalin-related lectins by frontal affinity chromatography--an approach to functional classification. *FEBS Journal* 275 (6): 1227-1239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06282.x>.
- Naser, S.A.; Ghobrial, G.; Romero, C.; Valentine, J.F., 2004.** Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet* 364 (9439): 1039-1044. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17058-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17058-x).
- Naser, S.A.; Sagrarsingh, S.R.; Naser, A.S.; Thanigachalam, S., 2014.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World Journal of Gastroenterology* 20 (23): 7403-7415. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7403>.
- Naser, S.A.; Schwartz, D.; Shafran, I., 2000.** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *The American journal of gastroenterology* 95 (4): 1094-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2000.01954.x>.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010.** Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *Journal of Food Protection* 73 (7): 1357-1397. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.7.1357>.
- Newburg, D.S.; Chaturvedi, P., 1992.** Neutral glycolipids of human and bovine milk. *Lipids* 27 (11): 923-927. <https://doi.org/10.1007/bf02535874>.
- Niederweis, M., 2003.** Mycobacterial porins - new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology* 49 (5): 1167-1177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03662.x>.
- Nielsen, S.S.; Toft, N., 2014.** Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Preventive Veterinary Medicine* 113 (1): 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.10.013>.

- Nwosu, C.C.; Aldredge, D.L.; Lee, H.; Lerno, L.A.; Zivkovic, A.M.; German, J.B.; Lebrilla, C.B., 2012.** Comparison of the Human and Bovine Milk N-Glycome via High-Performance Microfluidic Chip Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* 11 (5): 2912-2924. <https://doi.org/10.1021/pr300008u>.
- O'Brien, L.M.; McAloon, C.G.; Stewart, L.D.; Strain, S.A.J.; Grant, I.R., 2018.** Diagnostic potential of the peptide-mediated magnetic separation (PMS)-phage assay and PMS-culture to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk samples. *Transboundary and Emerging Diseases* 65 (3): 719-726. <https://doi.org/10.1111/tbed.12794>.
- O'Brien, L.M.; Stewart, L.D.; Strain, S.A.; Grant, I.R., 2016.** Novel Monoclonal Antibody and Peptide Binders for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Their Application for Magnetic Separation. *PLoS One* 11 (1): e0147870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147870>.
- O'Riordan, N.; Kane, M.; Joshi, L.; Hickey, R.M., 2014.** Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* 24 (3): 220-236. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt162>.
- Oguri, S., 2005.** Analysis of sugar chain-binding specificity of tomato lectin using lectin blot: recognition of high mannose-type N-glycans produced by plants and yeast. *Glycoconjugate Journal* 22 (7): 453-461. <https://doi.org/10.1007/s10719-005-5329-4>.
- OIE, 2018.** Paratuberculosis, in: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (2018), 8th ed. Office international des epizooties, Paris, France. Chapter 3.1.15, pp. 544 - 559. ISBN: 978-92-95108-18-9. <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>.
- Over, K.; Crandall, P.G.; O'Bryan, C.A.; Ricke, S.C., 2011.** Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: a Review. *Critical Reviews in Microbiology* 37 (2): 141-156. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532480>.
- Paccagnini, D.; Sieswerda, L.; Rosu, V.; Masala, S.; Pacifico, A.; Gazouli, M.; Ikononopoulos, J.; Ahmed, N.; Zanetti, S.; Sechi, L.A., 2009.** Linking Chronic Infection and Autoimmune Diseases: *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*, SLC11A1 Polymorphisms and Type-1 Diabetes Mellitus. *PLoS One* 4 (9): e7109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007109>.
- Paolicchi, F.; Cirone, K.; Morsella, C.; Gioffré, A., 2012.** First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from commercial pasteurized milk in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3): 1034-1037. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000300028>.
- Pavlik, I.; Jahn, P.; Dvorska, L.; Bartos, M.; Novotny, L.; Halouzka, R., 2004.** Mycobacterial infections in horses: a review of the literature. *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)* 49: 427-440. <https://doi.org/10.17221/5733-VETMED>.

- Pickup, R.W.; Rhodes, G.; Arnott, S.; Sidi-Boumedine, K.; Bull, T.J.; Weightman, A.; Hurley, M.; Hermon-Taylor, J., 2005.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Catchment Area and Water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and Its Potential Relationship to Clustering of Crohn's Disease Cases in the City of Cardiff. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4): 2130-2139. <https://doi.org/10.1128/aem.71.4.2130-2139.2005>.
- Pickup, R.W.; Rhodes, G.; Bull, T.J.; Arnott, S.; Sidi-Boumedine, K.; Hurley, M.; Hermon-Taylor, J., 2006.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Lake Catchments, in River Water Abstracted for Domestic Use, and in Effluent from Domestic Sewage Treatment Works: Diverse Opportunities for Environmental Cycling and Human Exposure. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6): 4067-4077. <https://doi.org/10.1128/aem.02490-05>.
- Pierce, E., 2018a.** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and goblet cells: are Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma zoonotic infectious diseases? *Journal of Infectiology* 1 (3): 23-26. <https://www.infectiologyjournal.com/articles/emmycobacterium-aviumem-subspecies-paratuberculosis-and-goblet-cells-are-barretts-esophagus-and-esophageal-adenocarcinoma-zoonotic.html>.
- Pierce, E.S., 2018b.** Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis...and colorectal cancer? *Infectious Agents and Cancer* 13: 1. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3>.
- Pierce, E.S., 2019.** Baseballs, tennis balls, livestock farm manure, the IDH1 mutation, endothelial cell proliferation and hypoxic pseudopalisading (granulomatous) necrosis: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the epidemiology, cellular metabolism and histology. *Open Veterinary Journal* 9 (1): 5. <https://doi.org/10.4314/ovj.v9i1.2>.
- Polotsky, V.Y.; Belisle, J.T.; Mikusova, K.; Ezekowitz, R.A.B.; Joiner, K.A., 1997.** Interaction of Human Mannose-Binding Protein with *Mycobacterium avium*. *The Journal of Infectious Diseases* 175 (5): 1159-1168. <http://doi.org/10.1086/520354>.
- Porter, J.; Robinson, J.; Pickup, R.; Edwards, C., 1998.** An evaluation of lectin-mediated magnetic bead cell sorting for the targeted separation of enteric bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 84 (5): 722-732. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00403.x>.
- Poupart, P.; Coene, M.; Van Heuverswyn, H.; Cocito, C., 1993.** Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (6): 1601-1605. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315002>.
- Rademaker, J.L.W.; Vissers, M.M.M.; Te Giffel, M.C., 2007.** Effective Heat Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Raw Milk Contaminated with Naturally Infected Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (13): 4185-4190. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.00326-07>.

- Raghu, H.; Kumar, N.; Mayuri; Arya, K.; Sharma, P., 2017.** Screening of Lectins for Specific Detection of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Microbiology & Experimentation* 5 (3): 00150. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00150>.
- Raizman, E.A.; Fetrow, J.P.; Wells, S.J., 2009.** Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *Journal of Dairy Science* 92 (10): 4929-4936. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2133>.
- Rana, A.; Rub, A.; Akhter, Y., 2014.** Proteome-scale identification of outer membrane proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a structure based combined hierarchical approach. *Molecular BioSystems* 10 (9): 2329-2337. <https://doi.org/10.1039/C4MB00234B>.
- Rani, P.; Sechi, L.A.; Ahmed, N., 2010.** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a trigger of type-1 diabetes: destination Sardinia, or beyond? *Gut Pathogens* 2 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-2-1>.
- Rani, S.; Beaver, A.; Schukken, Y.H.; Pradhan, A.K., 2019.** Modeling the effects of infection status and hygiene practices on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* contamination in bulk tank milk. *Food Control* 104: 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.031>.
- Rhodes, G.; Richardson, H.; Hermon-Taylor, J.; Weightman, A.; Higham, A.; Pickup, R., 2014.** *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*: Human Exposure through Environmental and Domestic Aerosols. *Pathogens* 3 (3): 577-595. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030577>.
- Ricchi, M.; Savi, R.; Bolzoni, L.; Pongolini, S.; Grant, I.R.; De Cicco, C.; Cerutti, G.; Cammi, G.; Garbarino, C.A.; Arrigoni, N., 2016.** Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* load in raw bulk tank milk in Emilia-Romagna Region (Italy) by qPCR. *MicrobiologyOpen* 5 (4): 551-559. <https://doi.org/10.1002/mbo3.350>.
- Richardson, H.; Rhodes, G.; Henrys, P.; Sedda, L.; Weightman, A.J.; Pickup, R.W., 2019.** Presence of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* Monitored Over Varying Temporal and Spatial Scales in River Catchments: Persistent Routes for Human Exposure. *Microorganisms* 7 (5): 136. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050136>.
- Rini, J.M., 1995.** Lectin Structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 24 (1): 551-577. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.24.060195.003003>.
- Robertson, R.E.; Cerf, O.; Condrón, R.J.; Donaghy, J.A.; Heggum, C.; Jordan, K., 2017.** Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* poses a food safety risk with pasteurised dairy products. *International Dairy Journal* 73: 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.009>.
- Rogall, T.; Wolters, J.; Flohr, T.; Bottger, E.C., 1990.** Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (4): 323-330. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-323>.

- Rosu, V.; Ahmed, N.; Paccagnini, D.; Gerlach, G.; Fadda, G.; Hasnain, S.E.; Zanetti, S.; Sechi, L.A., 2009.** Specific Immunoassays Confirm Association of *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* with Type-1 but Not Type-2 Diabetes Mellitus. *PLoS One* 4 (2): e4386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004386>.
- Runyon, E.H., 1959.** Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America* 43 (1): 273-290. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1).
- Rybniker, J., 2006.** Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis* - application for identification and susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology* 55 (1): 37-42. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46238-0>.
- Saleemuddin, M.; Husain, Q., 1991.** Concanavalin A: A useful ligand for glycoenzyme immobilization—A review. *Enzyme and Microbial Technology* 13 (4): 290-295. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90146-2](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90146-2).
- Santos, R.; De Carvalho, C.C.C.R.; Stevenson, A.; Grant, I.R.; Hallsworth, J.E., 2015.** Extraordinary solute-stress tolerance contributes to the environmental tenacity of mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports* 7 (5): 746-764. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12306>.
- Schäffer, C.; Messner, P., 2016.** Emerging facets of prokaryotic glycosylation. *FEMS Microbiology Reviews* 41 (1): 49-91. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw036>.
- Schwartz, D.; Shafran, I.; Romero, C.; Piromalli, C.; Biggerstaff, J.; Naser, N.; Chamberlin, W.; Naser, S.A., 2000.** Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clinical Microbiology and Infection* 6 (6): 303-307. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00093.x>.
- Sechi, L.A.; Dow, C.T., 2015.** *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn's Disease. *Frontiers in immunology* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00096>.
- Sechi, L.A.; Scanu, A.M.; Molicotti, P.; Cannas, S.; Mura, M.; Dettori, G.; Fadda, G.; Zanetti, S., 2005.** Detection and isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *The American journal of gastroenterology* 100 (7): 1529-1536. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984976>.
- Seiler, B.T.; Cartwright, M.; Dinis, A.L.M.; Duffy, S.; Lombardo, P.; Cartwright, D.; Super, E.H.; Lanzaro, J.; Dugas, K.; Super, M.; Ingber, D.E., 2019.** Broad spectrum capture of clinical pathogens using engineered Fc-Mannose-Binding Lectin (FcMBL) enhanced by antibiotic treatment [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 8: 108. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17447.1>.
- Shimada, K.-I.; Takimoto, H.; Yano, I.; Kumazawa, Y., 2006.** Involvement of Mannose Receptor in Glycopeptidolipid-Mediated Inhibition of Phagosome-Lysosome

Fusion. *Microbiology and Immunology* 50 (3): 243-251. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03782.x>.

Shin, G.A.; Lee, J.K.; Freeman, R.; Cangelosi, G.A., 2008. Inactivation of *Mycobacterium avium* Complex by UV Irradiation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (22): 7067-7069. <https://doi.org/10.1128/aem.00457-08>.

Singh, S.V.; Singh, A.V.; Singh, P.K.; Kumar, A.; Singh, B., 2011. Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free living non-human primate (Rhesus macaques) from North India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34 (3): 267-271. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.12.004>.

Slana, I.; Liapi, M.; Moravkova, M.; Kralova, A.; Pavlik, I., 2009. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-time PCR. *Preventive Veterinary Medicine* 89 (3): 223-226. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.02.020>.

Slana, I.; Paolicchi, F.; Janstova, B.; Navratilova, P.; Pavlik, I., 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Veterinari medicina* 53 (6): 283. <https://doi.org/10.17221/1859-VETMED>.

Slavin, Y.N.; Bo, M.; Caggiu, E.; Sechi, G.; Arru, G.; Bach, H.; Sechi, L.A., 2018. High levels of antibodies against PtpA and PknG secreted by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* are present in neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 323: 49-52. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.07.007>.

Slifkin, M.; Doyle, R.J., 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 3 (3): 197-218. <https://doi.org/10.1128/cmr.3.3.197>.

Stabel, J., 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology* 77 (3-4): 465-473. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00331-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00331-x).

Stabel, J.R.; Waters, W.R.; Bannantine, J.P.; Lyashchenko, K., 2011. Mediation of Host Immune Responses after Immunization of Neonatal Calves with a Heat-Killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology* 18 (12): 2079-2089. <https://doi.org/10.1128/cvi.05421-11>.

Stanley, P.; Taniguchi, N.; Aebi, M., 2015. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology* [Internet], 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Chapter 9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/>.

Stewart, L.D.; McNair, J.; McCallan, L.; Thompson, S.; Kulakov, L.A.; Grant, I.R., 2012. Production and Evaluation of Antibodies and Phage Display-Derived Peptide Ligands for Immunomagnetic Separation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (5): 1598-1605. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.05747-11>.

- Stratmann, J.; Dohmann, K.; Heinzmann, J.; Gerlach, G.-F., 2006.** Peptide aMptD-Mediated Capture PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bulk Milk Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8): 5150-5158. <https://doi.org/10.1128/AEM.00590-06>.
- Stratmann, J.; Strommenger, B.; Goethe, R.; Dohmann, K.; Gerlach, G.F.; Stevenson, K.; Li, L.L.; Zhang, Q.; Kapur, V.; Bull, T.J., 2004.** A 38-Kilobase Pathogenicity Island Specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Encodes Cell Surface Proteins Expressed in the Host. *Infection and Immunity* 72 (3): 1265-1274. <https://doi.org/10.1128/iai.72.3.1265-1274.2004>.
- Stratmann, J.; Strommenger, B.; Stevenson, K.; Gerlach, G.-F., 2002.** Development of a Peptide-Mediated Capture PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4244-4250. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4244-4250.2002>.
- Streeter, R.N.; Hoffsis, G.F.; Bech-Nielsen, S.; Shulaw, W.P.; Rings, D.M., 1995.** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *American Journal of Veterinary Research* 56 (10): 1322-1324. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8928949>.
- Sugden, E.A.; Samagh, B.S.; Bundle, D.R.; Duncan, J.R., 1987.** Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 55 (3): 762-770. <https://iai.asm.org/content/55/3/762.long>.
- Sumner, J.B., 1919.** THE GLOBULINS OF THE JACK BEAN, CANAVALIA ENSIFORMIS. *Journal of Biological Chemistry* 37 (1): 137-142. <http://www.jbc.org/content/37/1/137.short>.
- Sumner, J.B.; Howell, S.F., 1936.** Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *Journal of Bacteriology* 32 (2): 227-237. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16559945>.
- Swanson, M.D.; Winter, H.C.; Goldstein, I.J.; Markovitz, D.M., 2010.** A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. *Journal of Biological Chemistry* 285 (12): 8646-8655. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.034926>.
- Sweeney, R.W.; Whitlock, R.H.; Rosenberger, A.E., 1992.** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (1): 166-171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265014/>.
- Sweet, L.; Singh, P.P.; Azad, A.K.; Rajaram, M.V.S.; Schlesinger, L.S.; Schorey, J.S., 2010.** Mannose Receptor-Dependent Delay in Phagosome Maturation by *Mycobacterium avium* Glycopeptidolipids. *Infection and Immunity* 78 (1): 518-526. <https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00257-09>.
- Tasara, T.; Stephan, R., 2005.** Development of an F57 Sequence-Based Real-Time PCR Assay for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk.

Applied and Environmental Microbiology 71 (10): 5957-5968.
<https://doi.org/10.1128/aem.71.10.5957-5968.2005>.

Thorel, M.F.; Krichevsky, M.; Vincent Levy-Frebault, V., 1990. Numerical Taxonomy of Mycobactin-Dependent Mycobacteria, Emended Description of *Mycobacterium avium*, and Description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (3): 254-260. <https://dx.doi.org/10.1099/00207713-40-3-254>.

Timms, V.J.; Daskalopoulos, G.; Mitchell, H.M.; Neilan, B.A., 2016. The Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* 11 (2): e0148731.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148731>.

Tiwari, A.; VanLeeuwen, J.A.; McKenna, S.L.B.; Keefe, G.P.; Barkema, H.W., 2006. Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 47 (9): 874-882.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1555680/>.

Tortoli, E., 2003. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (2): 319-354.
<https://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.2.319-354.2003>.

Twort, F.W.; Ingram, G.L.Y., 1913. Further Experiments with the *Mycobacterium Enteritidis Chronicae Pseudo-Tuberculosisæ Bovis*, Johne, and with Vaccines Prepared from this Micro-Organism. *The Veterinary Journal (1900)* 69 (1): 4-15.
[https://doi.org/10.1016/S0372-5545\(17\)65732-8](https://doi.org/10.1016/S0372-5545(17)65732-8).

Twort, F.W.; Ingram, G.L.Y.; Hill, L.E., 1912. A method for isolating and cultivating the *mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosisæ bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 84 (575): 517-542.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1912.0011>.

Van Kruiningen, H.J.; Chiodini, R.J.; Thayer, W.R.; Coutu, J.A.; Merkal, R.S.; Runnels, P.L., 1986. Experimental disease in infant goats induced by a Mycobacterium isolated from a patient with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* 31 (12): 1351-1360. <https://doi.org/10.1007/bf01299814>.

van Pittius, N.C.G.; Sampson, S.L.; Lee, H.; Kim, Y.; van Helden, P.D.; Warren, R.M., 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evolutionary Biology* 6 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-95>.

van Winden, V.J.C.; Houben, E.N.G.; Braunstein, M., 2019. Protein Export into and across the Atypical Diderm Cell Envelope of Mycobacteria. *Microbiology*

Spectrum 7 (4): GPP3-0043-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0043-2018>.

Waddell, L.; Rajić, A.; Stärk, K.; McEwen, S.A., 2016a. Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence. *Preventive Veterinary Medicine* 132: 32-48. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.08.003>.

Waddell, L.A.; Rajić, A.; Stärk, K.D.C.; McEwen, S.A., 2016b. The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses and Public Health* 63 (3): 212-222. <https://doi.org/10.1111/zph.12221>.

Whitlock, R.H.; Buergelt, C., 1996. Preclinical and Clinical Manifestations of Paratuberculosis (Including Pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 12 (2): 345-356. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30410-2).

Whittington, R.; Donat, K.; Weber, M.; Kelton, D.; Nielsen, S.; Eisenberg, S.; Arrigoni, N.; Juste, R.; Luis Sáez, J.; Dhand, N.; Santi, A.; Michel, A.; Barkema, H.; Kralik, P.; Kostoulas, P.; Citer, L.; Griffin, F.; Barwell, R.; Aparecida Scatamburlo Moreira, M.; de Waard, J., 2019. Control of paratuberculosis: who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Veterinary Research* 15: 198. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>.

Whittington, R.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A., 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Dam Water and Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5304-5308. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005>.

Whittington, R.J.; Marshall, D.J.; Nicholls, P.J.; Marsh, I.B.; Reddacliff, L.A., 2004. Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (5): 2989. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004>.

Whittington, R.J.; Windsor, P.A., 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal* 179 (1): 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>.

WHO, 2018. Global tuberculosis report 2018. World Health Organization, Geneva, Switzerland. ISBN 978-92-4-156564-6. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

Windsor, P.A.; Whittington, R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal* 184 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>.

Wu, C.W.; Livesey, M.; Schmoller, S.K.; Manning, E.J.; Steinberg, H.; Davis, W.C.; Hamilton, M.J.; Talaat, A.M., 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infection and Immunity* 75 (5): 2110-2119. <https://doi.org/10.1128/IAI.01739-06>.

Yang, Y.S.; Kim, S.J.; Kim, J.W.; Koh, E.M., 2000. NRAMP1 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Koreans. *Journal of Korean Medical Science* 15 (1): 83. <https://doi.org/10.3346/jkms.2000.15.1.83>.

Yokomizo, Y.; Yugi, H.; Merkal, R.S., 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 47 (1): 111-119. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.47.111>.

Yokoyama, K.; Cossu, D.; Hoshino, Y.; Tomizawa, Y.; Momotani, E.; Hattori, N., 2018. Anti-Mycobacterial Antibodies in Paired Cerebrospinal Fluid and Serum Samples from Japanese Patients with Multiple Sclerosis or Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Journal of Clinical Medicine* 7 (12): 522. <https://doi.org/10.3390/jcm7120522>.

Young, N.M., 2002. Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42530-42539. <https://doi.org/10.1074/jbc.m206114200>.

Zhong, X.; Zhou, Y.; Lu, T.; Wang, Z.; Fang, L.; Peng, L.; Kermode, A.G.; Qiu, W., 2018. Infections in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Journal of Clinical Neuroscience* 47: 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.10.005>.

Zwick, L.S.; Walsh, T.F.; Barbiers, R.; Collins, M.T.; Kinsel, M.J.; Murnane, R.D., 2002. Paratuberculosis in a Mandrill (*Papio Sphinx*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14 (4): 326-328. <https://doi.org/10.1177/104063870201400409>.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal bei all jenen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zu allererst gebührt ein ganz besonderer Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia Deeg. Vielen Dank für die außergewöhnliche Unterstützung, die guten Ratschläge und die schnellen Korrekturen. Es ist wirklich nicht selbstverständlich, als Doktorvater/-mutter das ganze Jahr über rund um die Uhr erreichbar zu sein und sich so engagiert und gewissenhaft um alle Fragen und Probleme der Doktoranden zu kümmern. Vielen Dank auch für die Möglichkeit an einem so spannenden Forschungsthema arbeiten zu können, das im Vergleich mit den sonstigen Projekten unserer Arbeitsgruppe doch etwas aus der Reihe fällt und für die Geduld, wenn die verteufelten MAPs mal wieder nicht so wollten wie wir es gerne gehabt hätten.

Mein Dank gilt auch dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer, für die gute Kooperation und die Bereitstellung der MAP sowie anderer Mykobakterien und Kontrollkeime. In diesem Zusammenhang auch ein besonderes Dankeschön an Frau Dr. Ricarda Mayer und Frau Dr. Elena Felzl, die immer dafür gesorgt haben, dass ich auch bei sehr kurzfristigen Anfragen immer mit frischen MAP versorgt wurde. Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau Dr. Andrea Stockmaier-Didier und ihrer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit bedanken und für die Betreuung während meines „Asyl“-Aufenthalts in Oberschleißheim.

Ein großes Dankeschön geht auch an unsere mittlerweile recht ansehnliche TA-Riege: Florian Gosselin, Claudia Guggenmos sowie die „gute Seele“ unseres Labors, Sieglinde Hirmer und unsere „Luxus-TA“ Barbara Amann. Nicht nur durch ihr umfangreiches und häufig verleugnetes Fachwissen, das schon viele scheinbar missglückte Experimente am Ende noch gerettet hat, sondern auch auf menschlicher und persönlicher Ebene sind sie eine große Bereicherung im Arbeitsalltag und sorgen für eine entspannte und angenehme Atmosphäre.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen bedanken: Claudia Barfüßer, Roxane Degroote, Isabella Giese, Lea

Lorenz, Karina Lutterberg, Kristina Kleinwort, Melanie Schauer, Franziska Stetter, Maria Weigand und Carmen Wiedemann. Ihr habt immer für gute Stimmung im Büro und im Labor gesorgt und jeden Tag zu einem schönen Erlebnis gemacht. Ob bei mittäglichen Sonnenbaden auf der Dachterrasse oder auf einem unserer vielen Ausflüge, durch euch wurde die Zeit hier erst zu dem was sie war, nämlich „soooo schön!“.

Besonders möchte ich mich nochmal bei unseren Schaf-Mamis Karina Lutterberg und Melanie Schauer bedanken, die Carmen und mich in unserer Anfangszeit unter ihre Fittiche genommen haben und uns alle wirklich wichtigen Aspekte der Laborarbeit beibrachten, nämlich, dass man um Punkt zwölf Hunger zu haben hat, dass eine Deadline eine Deadline eine Deadline eine Deadline ist, was der Unterschied zwischen einer A-Linie und einem Meerjungfrauenkleid ist und vor allem wer zum Teufel eigentlich Melanie Schauer ist.

Meiner Familie möchte ich auch danken dafür, dass sie immer hinter mir standen und sich, wenn es gut vorwärtsging, mit mir gefreut haben und mich, wenn es schlecht oder gar nicht voranging, unterstützt und motiviert haben. Danke auch, dass ihr mich (wenn auch vergeblich) immer wieder freundlich und geduldig darauf hingewiesen habt, dass posttranslationale Modifizierungen und chronisch entzündliche Darmerkrankungen vielleicht kein geeignetes Thema für den Esstisch oder Familienfeiern sind, ebensowenig wie Selfies mit abgehäuteten Kuhschädeln.

Außerdem noch ein herzliches Dankeschön an Ingrid Hobmaier, Johanna Deimel und Roxane Degroote für das bereitwillige und schnelle Korrekturlesen und das trotz unbekannter Materie und katastrophaler Kommasetzung meinerseits (wie man unschwer an diesem – nicht korrekturgelesenen – Abschnitt erkennen kann).