

**Aus dem Institut für molekulare Pathogenese  
des Friedrich-Loeffler-Instituts,  
Bundforschungsinstitut für Tiergesundheit, Standort Jena  
eingereicht über das  
Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Evaluierung der Säure-Basen-Homöostase  
während experimentell induzierter  
mykobakterieller Infektionen mit akutem und  
chronischem Verlauf bei Ziegen**

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

**vorgelegt von  
Stefanie Bassis, geb. Redlberger  
Tierärztin aus Zwettl (Österreich)**

**Berlin 2022  
Journal-Nr.: 4329**









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

eingereicht über das

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

**Evaluierung der Säure-Basen-Homöostase während experimentell induzierter  
mykobakterieller Infektionen mit akutem und chronischem Verlauf bei Ziegen**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von  
Stefanie Bassis, geb. Redlberger  
Tierärztin  
aus Zwettl (Österreich)

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4329

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. PD Dr. Kerstin Müller
Dritter Gutachter:	PD Dr. Karsten Donat

*Deskriptoren (nach CAB-Theasaurus):*

goats, mykobacteriaceae, *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, acid base equilibrium, blood sampling, blood gases

Tag der Promotion: 08.04.2022

„Wenn dein einziges Werkzeug ein Hammer ist, wirst du jedes Problem als Nagel betrachten.“

Mark Twain



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	4
2.1	Säure-Basen-Haushalt .....	4
2.1.1	Chemische und physikalische Grundlagen .....	4
2.1.2	Physiologische Grundlagen .....	5
2.1.3	Historischer Überblick zur Forschung im Bereich des Säure-Basen-Haushaltes .....	8
2.1.4	Henderson-Hasselbalch-Gleichung: Die „Bicarbonat-Gleichung“ .....	10
2.1.5	Die Basenabweichung .....	12
2.1.6	Die Anionenlücke .....	13
2.1.7	Das Modell der starken Ionen und das vereinfachte Modell der starken Ionen .....	14
2.1.8	Die sechs primären Störungen des Säure-Basen-Haushaltes nach Stewart .....	21
2.1.9	Vor- und Nachteile des „strong ion model“ .....	22
2.2	Infektionen mit <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> und <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> .....	24
2.2.1	Taxonomische Einordnung der Erreger .....	24
2.2.2	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	24
2.2.3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> .....	26
2.3	Aus dem Kenntnisstand der Literatur aufgezeigtes Wissensdefizit .....	28
3	Eigene Untersuchungen .....	29
3.1	Aufgabenstellung und allgemeiner Versuchsaufbau .....	29
3.2	Tiere, Material und Methoden .....	30
3.2.1	Behördliche Genehmigung der Tierversuchsvorhaben .....	30
3.2.2	Haltung, Fütterung und Gesundheitszustand der Tiere .....	30
3.2.3	Experimentelle Tierversuchsreihen und Studiendesign .....	31
3.2.4	Blutuntersuchungen und Ermittlung der Säure-Basen-Parameter .....	33

3.2.5	Euthanasie der Tiere und pathologische Untersuchung .....	35
4	Publikationen und Darlegung der persönlichen Beiträge .....	36
4.1	STUDIE I: Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.....	37
4.2	STUDIE II: Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> or <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .....	46
5	Diskussion.....	72
5.1	Validität und Relevanz der experimentellen Studien.....	73
5.1.1	Beurteilung des Tiermodells .....	73
5.1.2	Beurteilung der angewandten Analytik und der Berechnungen .....	74
5.1.3	Beurteilung des Studiendesigns .....	77
5.1.4	Physiologische Variabilität von Elektrolyten, Metaboliten und des SBH während des ersten Lebensjahres.....	78
5.1.5	Variabilität des SBH infolge einer Mykobakterien Infektion.....	82
5.1.6	Erkenntnisgewinn und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten.....	92
6	Zusammenfassung.....	94
7	Summary.....	96
8	Literaturverzeichnis .....	98
9	Anhang.....	123
10	Publikationsverzeichnis .....	144
10.1	Publikationen mit Peer-Review-Verfahren .....	144
10.2	Publizierte Abstracts.....	144
11	Danksagung.....	145
12	Interessenskonflikte und Selbständigkeitserklärung .....	146

## Abbildungsverzeichnis

### Eigene Untersuchungen

Abb. 1:	Betrachtung der abhängigen und unabhängigen Variablen im SBH nach Stewart .....	15
Abb. 2:	Gamblegramm, Darstellung der Elektroneutralität, d.h. der Elektrolyte im Blutplasma sowie der Differenz der starken Ionen und der Lücke der starken Ionen .....	18
Abb. 3:	Studiendesign der VERSUCHSREIHEN I und II.....	32
Abb. 4:	Repräsentative Ionogramme für die Kontrollgruppe und die Subgruppe MAH 1 mit akutem Verlauf zu der 4. bis 7. Woche <i>post</i> <i>infectionem</i> in mEq/l.....	85
Abb. 5:	Repräsentative Ionogramme für die Kontrollgruppe und die Subgruppe MAH 1 mit akutem Verlauf zu der 8. bis 11. Woche <i>post</i> <i>infectionem</i> in mEq/l.....	87
Abb. 6:	Repräsentative Ionogramme für die Kontrollgruppe, sowie die MAP und die Subgruppe MAH 2 zu der 48. bis 51. Woche <i>post infectionem</i> in mEq/l.....	91

### Publikationen

#### **STUDIE I Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.**

Figure 1:	Study design. ....	39
Figure 2:	Concentration of $\text{L}$ -lactate (a), concentration of total protein (b), pH corrected for body temperature (BT) (c), and concentration of actual bicarbonate (d) assessed in venous blood of healthy goats assessed during their first year of life. ....	41
Figure 3:	Actual base excess (a), anion gap (b), strong ion gap calculated on basis of total protein (c), and strong ion difference calculated on basis of five measured strong ions (d) assessed in venous blood of healthy goats assessed during their first year of life. ....	43

**STUDIE II Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.**

Figure 1: Study design. .... 50

Figure 2: Measured pH values assessed in venous blood, corrected for actual body temperature..... 56

Figure 3: Calculated concentrations of base excess assessed in venous blood..... 57

Figure 4: Calculated acid total based on albumin in mEq/L assessed in venous blood. .... 58

Figure 5: Calculated strong ion difference based on 5 measured strong ions assessed in venous blood. .... 61

**Anhang**

A2 Poster: Redlberger, S.; Fischer, S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2018); Acid-base homeostasis in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in goats..... 124 – 125

A13 Supporting material STUDIE II, S1 Fig. .... 143



## Tabellenverzeichnis

### Literaturübersicht

Tab. 1:	4 Hauptstörungen im Säure-Basen-Haushalt nach Henderson-Hasselbalch .....	10
Tab. 2:	Nicht Puffer-Ionen und Puffer-Ionen im Blutplasma nach der Stewart Theorie, modifiziert nach Fencl und Leith (1993), Constable (1997).....	17
Tab. 3:	Experimentell und theoretisch ermittelte Werte für $A_{\text{tot}}$ , $K_a$ (Median $\pm$ Standardabweichung) und $pK_a$ sowie Multiplikationsfaktoren für Albumin und Totalprotein unterschiedlicher Spezies modifiziert nach Constable und Stämpfli (2005) .....	20
Tab. 4:	Differentialdiagnosen für eine Starke-Ionen-Azidose (SID $\downarrow$ ), adaptiert nach Kellum (2000) .....	21
Tab. 5:	Differentialdiagnosen für eine Starke-Ionen-Alkalose (SID $\uparrow$ ), adaptiert nach Kellum (2000) .....	22

### Publikationen

#### **STUDIE I Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.**

Table 1	Concentrations of glucose, sodium and chloride assessed in venous blood of healthy goats during their first year of life in two consecutive studies (1-2012/2013, 2-2013/2014).....	40
Table 2	Concentrations of inorganic phosphate (ciP), albumin, and gamma globulin assessed in venous blood obtained from healthy goats during their first year of life in two consecutive studies (1-2011/2012, 2-2013/2014).....	42
Table 3	Strong ion gap calculated on basis of albumin ( $SIG_{\text{Alb}}$ ), acid total albumin ( $A_{\text{tot Alb}}$ ) and acid total total protein ( $A_{\text{tot TP}}$ ) assessed in venous blood obtained from healthy goats assessed during their first year of life in two consecutive studies (1-2011/2012, 2-2013/2014).....	44

#### **STUDIE II Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.**

Table 1.	Challenge groups and non-infected control groups of both trials. ....	50
----------	---	----

Table 2.	Calculated anion gap and strong ion gap calculated on basis of albumin (SIG <sub>Alb</sub> ) assessed in venous blood. ....	54
Table 3.	Concentration of calculated bicarbonate and measured partial CO <sub>2</sub> pressure (corrected for body temperature) assessed in venous blood.....	55
Table 4.	Albumin/Globulin ratio, acid total based on total protein (A <sub>tot TP</sub> ) assessed in venous blood. ....	59
Table 5.	Calculated strong ion difference based on 3 and 4 strong ions assessed in venous blood .....	60

## Anhang

A3	Supporting material STUDIE II, S1 Table .....	126
A4	Supporting material STUDIE II, S2 Table .....	127
A5	Supporting material STUDIE II, S3 Tables .....	128 – 130
A6	Supporting material STUDIE II, S4 Tables .....	131 – 133
A7	Supporting material STUDIE II, S5 Table .....	134 – 136
A8	Supporting material STUDIE II, S6 Table .....	137
A9	Supporting material STUDIE II, S7 Table .....	138
A10	Supporting material STUDIE II, S8 Table .....	139
A11	Supporting material STUDIE II, S9 Table .....	140
A12	Supporting material STUDIE II, S10 Tables .....	141 – 142

## Formelverzeichnis

### Literaturübersicht

Formel 1	pH-Wert.....	4
Formel 2	Dissoziationsgleichgewicht schwacher Säure .....	5
Formel 3	Dissoziationsgleichgewicht schwacher Säure .....	5
Formel 4	Kohlendioxid-Bicarbonat-Puffer Reaktion.....	5
Formel 5	Phosphat-Puffer Reaktion .....	6
Formel 6	Henderson-Gleichung .....	10
Formel 7	Henderson-Hasselbalch Gleichung .....	10
Formel 8	Henderson-Hasselblach Gleichung angewandt auf das Bicarbonat-System .....	10
Formel 9	Gleichgewicht der gemessenen und nicht gemessenen Anionen und Kationen nach dem Prinzip der Elektroneutralität.....	13
Formel 10	Anionen Lücke .....	13
Formel 11	Dissoziation von Wasser.....	14
Formel 12	Dissoziation schwacher Säuren .....	14
Formel 13	Summe aller schwachen Säuren nach dem Massenerhaltungsprinzip .....	15
Formel 14	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Bildung .....	15
Formel 15	Carbonat Bildung .....	15
Formel 16	Prinzip der Elektroneutralität nach Stewart.....	15
Formel 17	strong ion difference 3, SID <sub>m3</sub> , berechnet auf Basis von drei gemessenen starken Ionen, nach Constable .....	16
Formel 18	strong ion difference 4, SID <sub>m4</sub> , berechnet auf Basis von vier gemessenen starken Ionen, nach Constable.....	16
Formel 19	strong ion difference 5, SID <sub>m5</sub> , berechnet auf Basis von fünf gemessenen starken Ionen, nach Constable.....	16
Formel 20	strong ion difference 6, SID <sub>m6</sub> , berechnet auf Basis von sechs gemessenen starken Ionen, nach Constable.....	16
Formel 21	Das Prinzip des strong ion gap.....	17
Formel 22	strong ion gap nach Constable.....	18
Formel 23	acid total berechnet auf Basis von Total Protein.....	19
Formel 24	acid total berechnet auf Basis von Albumin .....	19
Formel 25	aktuelles Bicarbonat nach Constable .....	34

**Publikationen**

**STUDIE I Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.**

AG.....	40
SID <sub>m3</sub> .....	40
SID <sub>m4</sub> .....	40
SID <sub>m5</sub> .....	40
A <sub>tot TP</sub> .....	40
K <sub>a</sub> .....	40
A <sub>tot Alb</sub> .....	40
SIG <sub>Alb</sub> .....	40
SIG <sub>TP</sub> .....	40

**STUDIE II Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.**

AG.....	51
SID <sub>m3</sub> .....	51
SID <sub>m4</sub> .....	51
SID <sub>m5</sub> .....	51
K <sub>a</sub> .....	52
A <sub>tot TP</sub> .....	52
A <sub>tot Alb</sub> .....	52
SIG <sub>Alb</sub> .....	52
SIG <sub>TP</sub> .....	52

**Anhang**

**Anhang A1 In der Software des Blutanalysegerätes ABL7 Series inkludierte Formeln**

Formel A1.1	cHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , aktuelles Bicarbonat .....	123
Formel A1.2	cHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (st), Standard-Bicarbonat: .....	123
Formel A1.3	cBase <sub>(B)</sub> , aktueller Base Excess: .....	123
Formel A1.4	cBase <sub>(Ecf)</sub> , Standard Base Excess, BE (extracellular fluid – ecf) .....	123

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A <sup>-</sup>	Säure-Anion
Abb.	Abbildung
AG	Anionenlücke (engl.: anion gap)
Alb	Albumin
A <sub>tot</sub>	Summe der schwachen Säuren (engl.: acid total)
BE	Basenabweichung (engl.: base excess)
°C	Grad Celsius
CA	Carboanhydrase
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Gl.	Gleichung
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion <i>syn.</i> Proton
HA	nichtdissoziierte Säure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat <i>syn.</i> Bicarbonat
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphat
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Dihydrogenphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
K <sub>a</sub>	Gleichgewichtskonstante
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
kPa	Kilopascal
Lac <sup>-</sup>	Lactat-Ion
MAH	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>hominissuis</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
max	Maximum
mEq	Milliequivalent
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
min	Minimum

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

---

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
OH <sup>-</sup>	Hydroxid-Ion
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pCO <sub>2</sub>	Partialdruck von CO <sub>2</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration, <i>potentia hydrogenii</i>
pO <sub>2</sub>	Partialdruck von O <sub>2</sub>
iP	anorganisches Phosphat
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante K <sub>a</sub> , Dissoziationskonstante
SD	Standardabweichung
SBH	Säure-Basen-Haushalt
SBS	Säure-Basen-Status
SID	Differenz der starken Ionen (engl.: strong ion difference)
SID <sub>a</sub>	apparente SID
SID <sub>e</sub>	effektive SID
SIG	Lücke der starken Ionen (engl.: strong ion gap)
TP	Totalprotein
UA	ungemessene Anionen (engl.: unmeasured anions)
UK	ungemessene Kationen (engl.: unmeasured cations)
[ ]	Konzentration

# 1 Einleitung

Für die Ermittlung und Beurteilung des Säure-Basen-Haushaltes (SBH) in Medizin und Tiermedizin stehen aktuell zwei Methoden zur Verfügung:

- die traditionelle Blutgasanalyse unter Anwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung sowie die Berechnung der Basenabweichung (base excess, BE) und der Anionenlücke (anion gap, AG) (Henderson 1908, Oh und Carroll 1977)
- die Berechnung der Summe aller flüchtigen Säuren (acid total,  $A_{tot}$ ), der Differenz der starken Ionen (strong ion difference, SID) und der Lücke der starken Ionen (strong ion gap, SIG), basierend auf dem „strong ion model“ (Constable 1997, Constable 2000), in deutscher Übersetzung dem Modell der starken Ionen.

Peter Stewart postulierte Ende der 1970er Jahre mit seinem „strong ion model“, dass der SBH nicht nur durch  $CO_2$ , sondern maßgeblich auch durch Elektrolyte und Serumproteine determiniert wird (Stewart 1978, Stewart 1983). Seitdem werden Vor- und Nachteile der traditionellen Beurteilung und der auf Stewart's Theorie basierten Beurteilung des SBH im internationalen Schrifttum kontrovers diskutiert (Siggaard-Andersen und Fogh-Andersen 1995, Worthley 1999, Constable 2000, Kellum 2005). Obwohl bekannt ist, dass bei veränderten Protein- und/oder Elektrolyt-Konzentrationen im Blut sowie bei gemischten Säure-Basen-Störungen daraus resultierende relevante Veränderungen im SBH nicht ausreichend mittels der traditionellen SBH-Variablen erfasst werden können (Fencl *et al.* 2000, Kellum 2000), findet das Modell der starken Ionen keine standardmäßige Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin.

Der Kenntnisstand zur biologischen Variabilität von SBH-Variablen für unterschiedliche Tierarten ist zum Teil noch sehr lückenhaft. So lagen vor Beginn der hier dargelegten Untersuchungen keine Daten für juvenile oder adulte Ziegen vor. Im Speziellen fehlten Informationen, welche den Einfluss des somatischen Wachstums oder der Fütterungsumstellung vom Milchlamm zum Pflanzenfresser auf physiologische Schwankungen im SBH deutlich machten. Dies betraf sowohl die traditionellen SBH-Variablen, basierend auf Henderson-Hasselbalch, als auch die aus dem Modell der starken Ionen abgeleiteten SBH-Variablen (nachfolgend als Stewart-Variablen bezeichnet). Besonders im Zusammenhang mit dem Prozess der Rumination ist davon auszugehen, dass die damit einhergehenden physiologischen Veränderungen im SBH (aufgrund zu erwartender Veränderungen bei Elektrolyten und Serumproteinen) primär durch das Modell der starken Ionen wiedergespiegelt werden.

Eine weltweit bei Wiederkäuern auftretende Infektionskrankheit ist die Paratuberkulose, ausgelöst durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Nach einer langen klinisch inapparenten Phase von drei bis fünf Jahren, gefolgt von chronischem Durchfall und Verlust an Körpermasse, endet diese Infektion in der Regel mit dem Tod des betroffenen Tieres (Clarke 1997, Arsenault *et al.* 2014). Vor Beginn der eigenen Untersuchungen lagen keine Erkenntnisse und Daten zur Homöostase des Säure-Basen-Haushalts bei mit MAP infizierten Wiederkäuern im internationalen Schrifttum vor. Auch hier war davon auszugehen, dass das Modell der starken Ionen für die korrekte Erfassung von infektionsbedingten chronischen Veränderungen der Elektrolyte, der Serumproteine und der immunologischen Wirtsantwort notwendig ist. Darüber hinaus war nicht bekannt, ob sich Veränderungen im SBH bereits in der frühen, subklinischen Phase der Erkrankung manifestieren. Ebenso war unklar, inwieweit sich Reaktionsmuster im SBH im Zusammenhang mit anderen Mykobakterien-Infektionen als MAP und im Zusammenhang mit Unterschieden zwischen akuten und chronischen Verlaufsformen zeigen.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten und in Form von zwei Publikationen niedergelegten Studien dienten der Klärung der zuvor genannten offenen Fragen:

Ein Ziel der eigenen Untersuchungen bestand darin, eine repräsentative Sicht auf die Variabilität des SBH während des somatischen Wachstums von gesunden Ziegen zu geben. Hierfür wurden die altersabhängigen Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt bei jungen Ziegen – beginnend in der 6. Lebenswoche bis über das erste Lebensjahr hinaus – systematisch erfasst.

Des Weiteren sollten die Effekte von Mykobakterien-Infektionen auf den SBH evaluiert werden. Hierfür wurden Ziegen als Modelltiere genutzt, die als Lämmer entweder mit MAP oder mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) inokuliert und über den Zeitraum von ca. einem Jahr kontinuierlich untersucht und beprobt wurden. Die Tierversuche wurden nach einem bereits etablierten caprinen Großtiermodell durchgeführt (Köhler *et al.* 2015).

Aus methodischer Sicht galt es, die traditionellen auf Henderson-Hasselbalch basierenden Variablen zur Beschreibung des SBH bezüglich ihrer diagnostischen Aussagekraft mit den Variablen zu vergleichen, die aus dem neuen Modell der starken Ionen resultieren. Diesen Untersuchungen lag die Hypothese zugrunde, dass insbesondere die Konzentrationen an Proteinen und Elektrolyten im Blut zu klinisch relevanten Veränderungen im Säure-Basen-Status beitragen können, die allein mit der traditionellen Betrachtungsweise des SBH nicht erfasst werden.

Die in dieser Dissertationsschrift dargelegten Ergebnisse belegen, dass zu jeder der drei genannten Zielstellungen ein deutlicher Wissenszuwachs generiert werden konnte. Erstmals



wurde das Modell der starken Ionen auf die Tierart Ziege angewandt, was zu einem tieferen Verständnis der Einflussfaktoren auf die Säure-Basen-Homöostase bei dieser Tierart beiträgt. Für gesunde Tiere wurde die Komplexität und Dynamik des Säure-Basen-Haushaltes im Zusammenhang mit dem physiologischen Prozess der Entwicklung vom Milchlamm zum adulten Wiederkäuer dokumentiert. Im caprinen Modell mykobakterieller Infektionen wurden anhand des Modells der starken Ionen erstmals signifikante Veränderungen des SBH erfasst, welche im Zusammenhang mit einem akuten klinisch-ausgeprägten Verlauf bzw. mit einem subklinisch-chronischen Verlauf des Infektionsgeschehens stehen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Säure-Basen-Haushalt

Der Begriff Säure-Basen-Haushalt umfasst die Gesamtheit aller physiologischen Regelsysteme und Einflussfaktoren im Säugetier-Organismus, welche nach dem Prinzip der Homöostase die  $H^+$ -Konzentration regulieren, um den pH-Wert des Blutes konstant zu halten (Gäbel 2005). Die Wissenschaftsdisziplinen, in denen der SBH betrachtet wird, sind daher sehr breit und umfassen sowohl die Chemie und Physik als auch die Physiologie und Pathophysiologie.

#### 2.1.1 Chemische und physikalische Grundlagen

Aus chemischer Sicht bestimmen Wasserstoff-Ionen ( $H^+$ ) und deren Übertragungsreaktionen den sauren oder basischen Charakter einer Lösung. Nach Brønsted-Lowry sind Säuren  $H^+$ -Donatoren; wenn sie in Lösung gehen, werden  $H^+$ -Ionen frei. Basen sind  $H^+$ -Akzeptoren; sie binden  $H^+$ -Ionen. Der pH-Wert, *potentia hydrogenii*, stellt ein Maß für diese Reaktionseigenschaft dar und ist als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität definiert (Berg *et al.* 2010):

$$pH = -\log_{10} [H^+] \quad (1)$$

Bei Säugetieren liegt der physiologische pH-Wert des Blutes bei 7,4 ( $\pm 0,05$ ); Abweichungen unter 6,85 oder über 7,8 sind mit dem Leben nicht vereinbar. Ein Blut pH-Wert unter 7,4 gilt als Azidose, ein Blut pH-Wert über 7,4 als Alkalose (Robinson 2013a).

Der Körper von adulten Säugetieren besteht zu etwa 60 % aus Wasser und ist durch Membranen in unterschiedliche Kompartimente (Intrazellulärraum, Extrazellulärraum) mit unterschiedlichen pH-Werten separiert. Aus chemischer Sicht beschäftigt man sich in der Biologie mit komplexen wässrigen Lösungen (Fencl und Leith 1993). Auch im Körper gelten das Gesetz von der Erhaltung der Masse und das Prinzip der Elektroneutralität (Constable 1997). In wässrigen Lösungen dissoziieren starke Säuren und Basen vollständig in Kationen und Anionen (Arrhenius 1887). Schwache Säuren und Basen dissoziieren nicht vollständig; es entsteht eine chemische Neutralität, also ein Dissoziationsgleichgewicht dieser Teilchen (Arrhenius 1887), wobei hier Elektroneutralität nicht mit Säure-Basen Neutralität gleichgesetzt werden darf.

Basierend auf dem Massenerhaltungsgesetz stellt sich bei schwachen Säuren und Basen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Ausgangs- und Endprodukt ein, welches als Dissoziationsgleichgewicht bezeichnet wird (Robinson 2013a):



Die *Dissoziationskonstante*  $K_a$ , auch *Gleichgewichtskonstante* genannt, beschreibt dieses dynamische Reaktionsgleichgewicht (Robinson 2013a). Angegeben wird jedoch meist der negative dekadische Logarithmus der Dissoziationskonstante  $K_a$ , der  $pK_a$ -Wert. Basierend auf diesen Gesetzen kann mit Hilfe des  $pK_a$ -Wertes der Grad der Dissoziation berechnet werden.



## 2.1.2 Physiologische Grundlagen

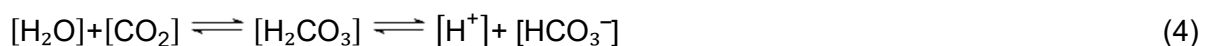
Im Zuge des Stoffwechsels entstehen im Körper stetig Säuren (Verlander 2013a): Kohlensäure ( $H_2CO_3$ ) aus  $CO_2$  durch die Zellatmung, Schwefel- und Phosphorsäure beim Proteinmetabolismus, Ketonsäure beim Fettmetabolismus, Laktat bei der unvollständigen Oxidation von Glucose (Kellum 2000, Robinson 2013a). Auch aus dem Gastrointestinaltrakt werden Säuren resorbiert. Die dadurch ständig schwankende  $H^+$ -Konzentration im Körper wird mit Hilfe von Puffersystemen und der Lunge kurzfristig und über Lunge, Nieren und Leber längerfristig reguliert (Verlander 2013a).

### 2.1.2.1 Puffersysteme

Puffer können anfallende Säuren und Basen durch eine chemische Reaktion rasch abfangen und neutralisieren, so dass der pH-Wert stabil gehalten wird (Robinson 2013a, Verlander 2013a). Diese reversible chemische Bindung kann zur Ausscheidung von  $H^+$  über die Nieren oder die Lunge rückgängig gemacht werden, eine Elimination erfolgt nicht über die Pufferung. Chemisch gesehen sind Puffer eine Mischung aus schwachen Säuren oder Basen und ihren Salzen (Corey 2003). Die Pufferfunktion entsteht durch die Dissoziation der schwachen Säure oder Base und ist vom Grad der Dissoziation abhängig. Das Dissoziationsgleichgewicht (mittels  $pK_a$  berechenbar) bestimmt, bei welchem pH-Wert ein Puffer die größte Pufferkapazität aufweist. Ein effektiver Puffer hat einen  $pK_a$  von  $\pm 1$  Einheit des pH-Wertes der Lösung, in der er wirkt, im Blut also zwischen 6,4 - 8,4 (Robinson 2013a).

#### **Kohlendioxid-Bicarbonat-Puffer**

Den größten Anteil der Puffer im gesamten Körper stellt mit etwa 75 % der Kohlendioxid-Bicarbonat( $HCO_3^-$ )-Puffer dar.



Diese chemischen Reaktionen finden sowohl direkt im Blutplasma als auch, aktiv katalysiert durch das Enzym Carboanhydrase (CAH), in den Zellen der Nieren und in den Erythrozyten statt (Verlander 2013a). Die große Kapazität des Kohlendioxid-Bicarbonat-Puffers basiert auf der sofortigen Abatmung des Gases CO<sub>2</sub>. Daher wird dieser Puffer auch als offenes Puffer-System bezeichnet (Gäbel 2005). Das macht den Kohlendioxid-Bicarbonat-Puffer trotz eines pK<sub>a</sub> von 6,1 zu einem der wichtigsten im Körper (Robinson 2013a).

### ***Protein-Puffer***

Proteine sind schwache Säuren und vermitteln dadurch eine Pufferfunktion. Dabei fungieren Seitengruppen am Protein als schwache Säuren, wodurch sich Proteine je nach ihrem Aufbau auch in ihrem pK<sub>a</sub> und ihrer Pufferkapazität unterscheiden (Constable 1997). Im Blut stellen Hämoglobin und Albumin die wesentlichen Protein-Puffer dar. Die Pufferfunktion von Hämoglobin wird durch den Imidazol-Rest an dem Globin Histidin vermittelt (Robinson 2013a). Dabei hat nicht-oxygeniertes Hämoglobin im Blut eine größere Pufferkapazität als oxygeniertes Hämoglobin (Robinson 2013a). Bei Albumin wird die Pufferfunktion durch die Imidazol-Gruppe und die Alpha-Amino-Gruppe vermittelt (Constable 1999).

### ***Phosphat-Puffer***

Phosphate (sowohl anorganische als auch organische) sind wie Proteine schwache Säuren und vermitteln daher Pufferfunktion. Mit nur 1 % macht der Phosphatpuffer im gesamten Organismus jedoch nur einen kleinen Teil aus. Auch im Blut ist bei physiologischer Phosphat-Konzentration die Pufferfunktion vernachlässigbar. Intrazellulär und in den Nierentubuli sind Phosphate aufgrund der lokalen höheren Konzentrationen jedoch wichtige Puffer (Robinson 2013a).



## **2.1.2.2 Ausscheidung und Resorption von H<sup>+</sup>**

### ***Pulmonale Regulation***

Durch die zentralen Chemorezeptoren im Hirnstamm und die peripheren Chemorezeptoren (*Glomera carotica* und *Glomus aorticus*) werden der pH-Wert sowie die Partialdrücke von Kohlendioxid und Sauerstoff (pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>) im arteriellen Blut ständig überwacht (Robinson 2013b). Veränderungen führen zur sofortigen zentral-nervalen Gegenregulation über das Atmungszentrum (Robinson 2013b).

Somit kann die Lunge Veränderungen des Blut pH-Wertes und der Blutgase innerhalb von Minuten über das Bicarbonat-Puffersystem regulieren. Durch eine vermehrte Ventilation wird

CO<sub>2</sub> abgeatmet und somit aus dem Blut entfernt. Hierbei verschiebt sich die Bicarbonat-Puffer-Reaktion (Formel 4) in Richtung CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, die Konzentration von H<sup>+</sup> sinkt und der pH-Wert steigt an. Vor allem bei einer akuten Säure-Belastung im Körper ist diese Funktion der Lunge für die schnelle Stabilisierung des pH-Wertes im Blut und dadurch im gesamten Organismus wesentlich (Verlander 2013a).

### **Renale Regulation**

Die gezielte Ausscheidung von H<sup>+</sup>-Ionen oder die Rückresorption von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kann nur über die Nieren erfolgen (Verlander 2013a). Die Epithelzellen im proximalen Tubulus, im distalen Tubulus/absteigenden Ast der Henleschen-Schleife und im Sammelrohr können H<sup>+</sup> in das Tubuluslumen sezernieren (Verlander 2013a). Im proximalen Tubulus kann zusätzlich glomerulär filtrierte HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mit Hilfe des Enzyms Carboanhydrase rückresorbiert werden (Verlander 2013b). Ein wesentlicher Anteil der anfallenden H<sup>+</sup>-Ionen wird bei der renalen Ammoniogenese nach Bindung an Ammoniak (NH<sub>3</sub>) in Form von Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ausgeschieden (Verlander 2013a). Dabei wird nochmals HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> rückresorbiert. Die Ausscheidung flüchtiger Säuren wie Schwefelsäure und Salzsäure, als Abbauprodukte des Amino- und Purin-Stoffwechsels, erfolgt ebenfalls nur über die Nieren (Gäbel 2005). Diese Säuren werden unter Bicarbonat-Verbrauch in Salze umgewandelt und ausgeschieden (Gäbel 2005).

### **Hepatischer Einfluss / Hepatische Regulation**

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen hat die Leber wesentlichen Einfluss auf den SBH. Durch ihre metabolische Aktivität verursacht die Leber etwa 20 % des anfallenden CO<sub>2</sub>.

Die Leber verstoffwechselt Laktat und Fettsäuren: Laktat wird oxidiert, dabei wird HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> frei und H<sup>+</sup> gebunden; Fettsäuren werden ebenfalls teilweise oxidiert, wodurch saure Ketonkörper entstehen (Herdt und Sayegh 2013b). Wesentlich für den Säure-Basen-Haushalt ist auch der Aminosäurestoffwechsel in der Leber, wodurch der Hauptteil der Serumproteine synthetisiert wird (Stogdale 1981a). Leber und Nieren bilden bei Stickstoffmetabolismus, Harnstoffsynthese und Ausscheidung eine „funktionelle Einheit“ (Haussinger 1997). Die Harnstoffsynthese erfolgt größtenteils in den Hepatozyten aus NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; bei dieser Reaktion wird HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> verbraucht und H<sup>+</sup> frei (Bean und Atkinson 1984). Der entstandene Harnstoff wird über die Nieren ausgeschieden. Bei einer Alkalose wird die Harnstoffsynthese im Körper erhöht, wodurch vermehrt HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> eliminiert wird (Bean und Atkinson 1984). Eine Azidose hingegen führt zu einer verminderten Harnstoffsynthese und der Bicarbonat-Verbrauch wird gesenkt (Bean und Atkinson 1984). Während einer Azidose gelangt giftiges Ammonium von der Leber

in Form von nichttoxischem Glutamin zu den Nieren und kann dort ausgeschieden werden (Haussinger 1997).

### **2.1.3 Historischer Überblick zur Forschung im Bereich des Säure-Basen-Haushaltes**

Im Jahre 1908 beschrieb Lawrence Joseph Henderson erstmals das Dissoziationsgleichgewicht von schwachen Säuren im tierischen Organismus und legte damit den Grundstein für das heutige Verständnis der Säure-Basen-Homöostase (Henderson 1908). Hendersons fokussierten sich dabei allein auf die Kohlensäure-Puffer-Reaktion, nicht zuletzt weil die technischen Möglichkeiten damals nur die CO<sub>2</sub>-Messung im Blut ermöglichten (Fencel und Leith 1993). Im Jahre 1909 prägte Sørensen den Begriff des pH-Wertes für die Protonenkonzentration und demonstrierte dessen Auswirkung auf Enzymaktivitäten (Sørensen 1909, Sørensen 1912). Basierend auf den Theorien von Henderson und Sørensen etablierte Karl Albert Hasselbalch im Jahre 1916 die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Hasselbalch 1916). Erstmals war es möglich, pH-Wert-Veränderungen im Säugetier anhand von pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, der Dissoziationskonstante von CO<sub>2</sub> und der Löslichkeit von CO<sub>2</sub> im Plasma zu beschreiben. Trotz mancher Kritik ist die Henderson-Hasselbalch-Gleichung bis heute gültig und wird zur Beurteilung der respiratorischen Komponente des SBH verwendet (Constable 2000). Bis Mitte der 1930er Jahre war die Anwendbarkeit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung mangels korrekter Messung von CO<sub>2</sub>, pH und O<sub>2</sub> im Blut jedoch begrenzt. Seit 1923 ist die Messung der Protonenkonzentration mittels einer Glaselektrode (pH-Elektrode) möglich. Im Jahre 1924 entwickelte van Slyke eine Messmethode (Äquilibration der Blutprobe), welche die genauere Bestimmung von pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub> ermöglichte (Van Slyke und Neill 1924). Darauf basierend konnte nun HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> nach der Bestimmung des pH-Wertes und von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung errechnet werden (Servinghaus *et al.* 1998). Biologische Lösungen sind jedoch weit komplexer und die Protonenkonzentration wird nicht nur von CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> beeinflusst, wie die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nahelegt. 1928 zeigte van Slyke bereits, dass Albumin und Globuline jeweils Basen binden können und somit ebenfalls einen Teil des Säure-Basen-Haushaltes darstellen (Van Slyke *et al.* 1928). Richtig in die Berechnungen aufgenommen wurden Serumproteine jedoch erst in den 1970er Jahren (Stewart 1978, Stewart 1983). Einen weiteren Grundstein für das heutige Verständnis des Säure-Basen-Haushalts legte James Lawder Gamble mit seinen Überlegungen zur „Physiologie und Pathophysiologie extrazellulärer Flüssigkeit“, dargestellt in dem nach ihm benannten Gamblegramm (Gamble 1954). Das Gamblegramm bzw. Ionogramm gibt das Grundprinzip der Elektroneutralität in biologischen Lösungen wieder (vgl. Abschnitt 2.1.7.2). Ebenfalls auf Basis der Elektroneutralität postulierten

Singer und Hastings (1948), dass der Plasma-pH-Wert von  $p\text{CO}_2$  und der Nettoladung der starken Ionen (buffer bases) bestimmt wird. Diese so genannten „buffer bases“ sind der später etablierten Differenz der starken Ionen sehr ähnlich und ermöglichten theoretisch die Differenzierung von metabolischen und gemischten Abweichungen im SBH. Die Berechnung der „buffer bases“ wurde jedoch nicht weiterverfolgt. Um  $\text{HCO}_3^-$  unabhängig von  $\text{CO}_2$  beurteilen zu können, wurde das Standard-Bicarbonat definiert, welches mit fixen Werten von  $p\text{CO}_2$ , Temperatur und  $\text{O}_2$  berechnet wird (Jorgensen und Astrup 1957). Erst die Basenabweichung nach Astrup *et al.* (1960) ermöglichte es, die gesamte Säuren- oder Basenbelastung im Organismus quantitativ abzuschätzen. Erkennung und Therapie metabolischer Störungen wurden erstmals praktikabel. Dennoch konnten weder Ursachen für Imbalances im SBH noch gemischte Säure-Basen-Störungen allein anhand der Basenabweichung identifiziert werden. Ebenfalls auf Basis der Elektroneutralität etablierten Oh und Carroll (1977) die Berechnung der Anionenlücke. Die Unterscheidung zwischen exogen und endogen auftretenden Verlusten von Säuren oder  $\text{HCO}_3^-$  war nun möglich (Constable *et al.* 1998). Sowohl Basenabweichung als auch Anionenlücke werden heute noch standardmäßig in der Medizin angewandt.

Die Erfindung des Computers und stetig wachsende Rechenleistungen machten ab den 1970er Jahren komplexe Berechnungen möglich. Infolgedessen veröffentlichte der kanadische Mathematiker und Physiker Peter Stewart Ende der 1970er Jahre das „strong ion model“, also das Modell der starken Ionen (Stewart 1978, Stewart 1983). Nach Stewarts Berechnungen wird die  $\text{H}^+$ -Konzentration im Blut von den dort vorhandenen Elektrolyten, den Serumproteinen und dem partiellen  $\text{CO}_2$  Druck bestimmt (Stewart 1983). Stewart's Theorie widerlegt die historisch erarbeiteten (und lediglich auf  $\text{H}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  fokussierten) Herangehensweisen, die das Verhalten von  $\text{H}^+$  als eigenständiges Phänomen betrachten. Daher wurde es vom schwedischen Mediziner Siggaard-Anderson und dessen Anhängern als absurd und nicht zeitgemäß abgetan (Siggaard-Andersen und Fogh-Andersen 1995, Corey 2003). Bis heute hält sich diese „transatlantische Debatte“ hartnäckig. Praktisch anwendbare Rechenmöglichkeiten zu Stewart's Theorie und zur Lücke der starken Ionen (strong ion gap, SIG) stammen von Figge *et al.* (1992), von Kellum *et al.* (1995b) und von Constable (1997). Im Jahre 1997 veröffentlichte Peter Constable sein vereinfachtes Modell als „simplified strong ion model“ und 1998 eine einfache logarithmische Formel zur Berechnung von SIG (Constable 1997, Constable *et al.* 1998). Constable's Formeln stellen die heute übliche Anwendung des „strong ion model“ dar. Bis heute herrschen in der wissenschaftlichen Gemeinschaft Kontroversen zwischen den Verfechter:innen der traditionellen, auf Henderson-Hasselbalch basierenden Methoden und den Unterstützer:innen der Stewart-Theorie.

### 2.1.4 Henderson-Hasselbalch-Gleichung: Die „Bicarbonat-Gleichung“

Die Henderson-Hasselbalch-Gleichung basiert auf der Henderson-Gleichung und der Sørensen-Theorie (Henderson 1908, Sørensen 1912). In der Henderson-Gleichung wandte Lawrence J. Henderson das Massenwirkungsgesetz auf das Dissoziationsgleichgewicht des Bicarbonat-Systems an (Henderson 1908) (Formel 6):

$$[\text{H}^+] = K' \times \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} \quad (6)$$

$K'$  = Dissoziationskonstante  $\text{CO}_2$

Hasselbalch wiederum kombinierte diese Formel mit der des pH-Wertes, woraus die Henderson-Hasselbalch-Gleichung resultierte (Hasselbalch 1916) (Formel 7):

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (7)$$

Angewendet auf das Bicarbonat-System bedeutet dies (Constable 1997, Constable 2000) (Formel 8):

$$\text{pH} = \text{pK}_1' + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{S_{\text{CO}_2} \times [\text{pCO}_2]} \quad (8)$$

$\text{pK}_1'$  = Dissoziationskonstante von  $\text{CO}_2$

$S_{\text{CO}_2}$  = Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  im Plasma

$S_{\text{CO}_2} \times [\text{pCO}_2]$  = Anteil des gelösten  $\text{CO}_2$

Hasselbalch zeigte somit den Einfluss von Atmung und  $\text{pCO}_2$  auf den Blut pH-Wert auf (Fencel und Leith 1993). Aus Formel 8 kann das aktuelle Bicarbonat berechnet werden, welches als Konzentration von  $\text{HCO}_3^-$  im arteriellen Plasma bei  $37^\circ\text{C}$  definiert ist.

#### 2.1.4.1 Interpretation der Henderson-Hasselbalch-Gleichung

Anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung können die in Tabelle 1 aufgeführten vier Hauptstörungen im SBH ermittelt werden (Constable 2000).

**Tabelle 1: Hauptstörungen im Säure-Basen-Haushalt nach Henderson-Hasselbalch**

Störung	pH-Wert im Blut	Ursache
Respiratorische Azidose	↓	↑ $\text{pCO}_2$
Respiratorische Alkalose	↑	↓ $\text{pCO}_2$
Metabolische Azidose	↓	↓ $\text{HCO}_3^-$
Metabolische Alkalose	↑	↑ $\text{HCO}_3^-$

Idealerweise halten sich die Elimination von  $\text{CO}_2$  über die Lunge und das über den Metabolismus anfallende  $\text{CO}_2$  die Waage. Kommt es im Bereich der Atmung zu einem



Ungleichgewicht durch alveoläre Hypo- oder Hyperventilation, ist von einer respiratorischen Störung die Rede. Liegt die Störung dieses Gleichgewichtes im Metabolismus, z. B. durch vermehrte Entstehung, Aufnahme oder den Verlust von Säuren bzw. Basen und/oder durch gestörte Ausscheidung von Säuren bzw. Basen über Nieren und Leber, spricht man von einer metabolischen Störung. Bicarbonat dient bei Anwendung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung der Beurteilung dieser metabolischen Komponente (Robinson 2013a).

#### 2.1.4.2 Kritik an der Henderson-Hasselbalch-Gleichung

Die Konzentrationen von  $p\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  stehen in Zusammenhang und beeinflussen sich gegenseitig. Vor allem die differentialdiagnostische Aussagekraft des aktuellen Bicarbonats zur Beurteilung der metabolischen Komponente wird als gering erachtet (Fencel und Leith 1993). Daher kann das Standard-Bicarbonat nach Äquilibration der Blutprobe auf einen standardisierten physiologischen  $p\text{CO}_2$ -Wert von 40 mmHg (5,3 kPa) bei 37°C und vollständiger Sättigung des Hämoglobins mit  $\text{O}_2$  berechnet werden (Jorgensen und Astrup 1957). Standard-Bicarbonat soll vom aktuellen  $p\text{CO}_2$  unabhängig sein und nichtrespiratorische Störungen aufdecken. Laut Kritikern ist bei beiden Werten eine isolierte Betrachtung des  $\text{CO}_2$  und des  $\text{HCO}_3^-$  als rein respiratorischer oder metabolischer Parameter, wie die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nahelegt, nicht möglich (Constable 1997).

In der Henderson-Hasselbalch-Gleichung werden viele physiologische und chemische Gegebenheiten im Körper nicht berücksichtigt: Die Elektrolyte und Plasmaproteine, welche aus chemischer Sicht ein wesentlicher Bestandteil des Säure-Basen-Haushaltes sind, werden nicht miteinbezogen (Constable 2000, Stewart 2009b, Stewart 2009c). Der Einfluss der Menge der gelösten Ionen (Ionenstärke), der Temperatur und der Proteinkonzentration auf die Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  im Plasma ( $S_{\text{CO}_2}$ ) und die  $\text{CO}_2$ -Dissoziationskonstante ( $pK_1'$ ) werden ebenfalls nicht beachtet (Hastings und Sendroy Jr 1925, Austin *et al.* 1963, Constable 1997). Daher ist fraglich, ob  $pK_1'$  als Konstante verwendet werden kann, was jedoch in Formel 8 der Fall ist (Linden und Norman 1971, Constable 1997). Experimentell ermittelte  $pK_1'$ -Werte variieren stark (Cullen *et al.* 1925, Austin *et al.* 1963, Putnam und Roos 1991). Auch der lineare Zusammenhang zwischen  $\log p\text{CO}_2$  und dem pH-Wert, den die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschreibt, ist bei veränderten Protein-,  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen und daraus resultierenden pH-Wert-Veränderungen nicht mehr gegeben (Constable 1997). Gemischte Säure-Basen-Störungen können anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung nicht ausreichend oder gar nicht erfasst werden (Kellum 2000).

Die Kritikpunkte zeigen, dass die Henderson-Hasselbalch-Gleichung nur bei nahezu physiologischen Werten von Temperatur, pH-Wert, Protein- und Elektrolyt-Konzentrationen korrekt angewendet werden kann. Bei kranken oder schwer kranken Tieren kann die

Interpretation dagegen fehlerhaft sein, und die Unterscheidung zwischen metabolischen und gemischten Säure-Basen-Störungen gelingt nicht korrekt (Kellum 2000). Eine alleinige Beurteilung des Säure-Basen-Haushaltes anhand von  $p\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  erscheint daher zu stark vereinfacht und unvollständig (Constable und Stämpfli 2005).

### 2.1.5 Die Basenabweichung

Die Basenabweichung (base excess, BE; *syn.* base deficite) gibt die Menge an Säuren bzw. Basen an (in mEq), welche pro Liter Vollblut benötigt wird, um dieses bei aktueller Sauerstoffsättigung, einem  $p\text{CO}_2$ -Wert von 40 mmHg (5,3 kPa) und 37°C auf einen pH-Wert von 7,40 zu titrieren (Astrup *et al.* 1960).

BE ist eine abstrakte Größe, welche die gesamte Belastung des Organismus mit Säuren oder Basen zeigt. Eine Erhöhung von BE bedeutet eine Verschiebung des Säure-Basen-Gleichgewichtes in Richtung Alkalose, hingegen weist eine Erniedrigung von BE in Richtung Azidose. Eine Differenzierung zwischen Konzentrationsänderungen von verschiedenen Anionen (z. B.:  $\text{Cl}^-$  oder saure Anionen) ist daher nicht möglich (Fencel und Leith 1993). Vor allem bei veränderten Plasma- und Elektrolyt-Konzentrationen erschwert dies die Interpretation (Fencel und Leith 1993). Komplexe, sich gegenseitig aufhebende Säure-Basen-Störungen können anhand von BE nicht erkannt werden (Fencel *et al.* 2000). Im Vollblut wird BE durch den Puffereffekt von Hämoglobin beeinflusst (Astrup *et al.* 1960). Für eine fundierte Beurteilung ist die parallele Begutachtung von pH-Wert,  $p\text{CO}_2$  sowie der Konzentrationen an  $\text{HCO}_3^-$ , Hämoglobin und Laktat notwendig.

Früher wurde BE mit Hilfe des Siggaard-Andersen-Nomogramms ermittelt (Astrup *et al.* 1960); heute ist die entsprechende Berechnung in handelsüblichen Blutgas-Analysatoren implementiert. Die Geräte berechnen BE aus dem pH-Wert, dem  $p\text{CO}_2$  und der Hämoglobin-Konzentration mit Hilfe der Van Slyke-Gleichung, wobei Unterschiede in den Berechnungsformeln zwischen den Herstellern bestehen (Van Slyke und Sendroy 1928, Zander 1995). Die errechneten Werte aus dem Vollblut variieren nicht nur zwischen den Herstellern, sondern auch in Abhängigkeit von Normoxie, Hypoxie und Hyperkapnie. Aus diesem Grund wird von handelsüblichen Blutgas-Analysatoren ein sogenannter  $\text{BE}_{\text{ox}}$  unter Berücksichtigung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins errechnet.  $\text{BE}_{\text{ox}}$  ist sowohl in arteriellen, gemischt arteriell-venösen und auch venösen Blutproben gleichermaßen bestimmbar (Zander 1995).

BE oder  $\text{BE}_{\text{ox}}$  spiegeln die Verhältnisse direkt im Vollblut wider, der Extrazellulärraum wird nicht berücksichtigt. Um den Effekt von darin enthaltenen Puffern mit einzubeziehen, kann BE für den Gesamtorganismus mit folgender Formel abgeschätzt werden:

BE x 0,3 x kg Körpermasse. Der so errechnete Wert wird als Standard-Basenabweichung ( $BE_{Ecf}$ ) bezeichnet, wobei der Faktor 0,3 experimentell für den Menschen ermittelt wurde (Astrup *et al.* 1960). Da mit einem konstanten Faktor multipliziert wird, werden pathologische Veränderungen der Pufferkonzentration im Extrazellulärraum nicht berücksichtigt. Die Berechnung von  $BE_{Ecf}$  setzt daher eine physiologische Konzentration an Plasmaproteinen voraus und sollte im Falle einer Hypo- oder Hyperproteinämie nicht angewendet werden (Constable 2000).

Trotz dieser Einschränkungen stellt BE im klinischen Alltag eine praktikable Variable dar. Im Tierversuch zeigte sich BE als einer der besten Indikatoren für einen akuten Blutverlust und einen hämorrhagischen Schock (Waisman *et al.* 1993). In der Humanmedizin gilt BE als ein aussagekräftiger Parameter für Prognose und Mortalität von Polytrauma- und Intensivpatienten (Rixen *et al.* 2001, Smith *et al.* 2001).

### 2.1.6 Die Anionenlücke

Die Anionenlücke (anion gap, AG) beruht auf dem Prinzip der Elektroneutralität (Oh und Carroll 1977). Für die Berechnung werden die im Blut mengenmäßigen Haupt-Kationen ( $Na^+$  und  $K^+$ ) und Haupt-Anionen ( $Cl^-$  und  $HCO_3^-$ ) verwendet. Ob Kalium in die Berechnung aufgenommen werden soll, variiert zwischen den Laboratorien und den Autoren. In der Veterinärmedizin wird empfohlen,  $K^+$  mit einzubeziehen (Constable 2000). Die anderen im Blut vorhandenen Kationen und Anionen werden als nicht gemessene Kationen (unmeasured cations, UC) und nicht gemessene Anionen (unmeasured anions, UA) zusammengefasst. Somit lässt sich feststellen (Constable 2000):

$$[Na^+] + [K^+] + [UC] = [Cl^-] + [HCO_3^-] + [UA] \quad (9)$$

$$[UA] - [UC] = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-]) = AG \quad (10)$$

Wie in Formel 10 ersichtlich, spiegelt AG Veränderungen der nicht gemessenen Anionen und Kationen wider (Kraut und Madias 2007). Den Hauptanteil stellen mit etwa 80 % die negativen Ladungen der Serumproteine dar. Veränderungen der Serumproteine beeinflussen daher AG und können Konzentrationen von anderen nicht gemessenen Anionen verschleiern (Figge *et al.* 1998, Feldman *et al.* 2005). Der restliche Anteil nicht gemessener Anionen setzt sich aus Phosphat, Laktat, Sulfat, Beta-Hydroxybutyraten, Acetoacetaten sowie sonstigen Anionen zusammen, die eventuell durch eine Urämie anfallen oder von außen zugeführt werden (Constable 2000).

Die Anzahl der gemessenen Kationen ist unter physiologischen Bedingungen größer als die der gemessenen Anionen, so dass AG eine positive Zahl annimmt. Die Erhöhung von AG ist

ein Hinweis auf eine metabolische Azidose. Zu einem Anstieg von AG kommt es, wenn Säuren von außen zugeführt werden oder im Stoffwechsel anfallen, deren Anion nicht Chlorid ist, also beispielsweise Laktat oder Keton-Körper. Werden jedoch Säuren wie HCl oder Hydrochlorid-Verbindungen zugeführt, hat dies keinen Einfluss auf die AG, da deren Anion Cl<sup>-</sup> ist. Auch bei einer reduzierten Konzentration an HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, wie z. B. bei Durchfall oder der Gabe von Carboanhydrase-Hemmern, bleibt AG unverändert, da die Kationen-Anionen-Bilanz gleichbleibt. Eine Verringerung von AG ist meist durch eine Hypoalbuminämie verursacht, da die schwache Säure Albumin als Anion fungiert (Constable *et al.* 1998, Kraut und Madias 2007).

Trotz des Einflusses der Serumproteine und oft schwieriger Interpretation findet AG in der Humanmedizin häufig Anwendung. Der klare Vorteil liegt in der einfachen und kostengünstigen Berechnung anhand von drei standardisiert bestimmten Einzelwerten (Paladini und Sala 1981, Kraut und Madias 2007).

### **2.1.7 Das Modell der starken Ionen und das vereinfachte Modell der starken Ionen**

Das „strong ion model“ von Stewart setzt die stets und zeitgleich geltenden Prinzipien der Elektroneutralität, des Dissoziationsgleichgewichtes aller nicht vollständig gelösten Substanzen und das Massenerhaltungsgesetz voraus (Stewart 1983). Darauf basierend stellte Stewart seine Berechnungen für chemische Reaktionen in komplexen wässrigen Lösungen (wie Blutserum) an. Dabei erkannte und definierte er abhängige und unabhängige Variablen und stellte fest, dass die Konzentration der unabhängigen Variablen (pCO<sub>2</sub>, A<sub>tot</sub>, SID) die Konzentration der abhängigen Variablen (H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HA, A<sup>-</sup>) und somit auch den pH-Wert des Blutes bestimmt (Abb. 1) (Constable 2000). Die abhängigen Variablen können mit Hilfe der unabhängigen Variablen berechnet werden (Stewart 1978, Stewart 1983).

So gelang es, die H<sup>+</sup>-Aktivität im Blut anhand von sechs zeitgleich und unabhängig voneinander geltenden Formeln zu beschreiben (Formeln 11-16) (Stewart 1983, Watson 1999):

#### *Wasser Dissoziation*

$$[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-] = K_w \quad (11)$$

$K_w$  = Ionenprodukt des Wassers

#### *Dissoziation schwacher Säuren*

$$[\text{H}^+] \times [\text{A}^-] = K_a \times [\text{HA}] \quad (12)$$

*Erhaltung der Masse*

$$[\text{HA}] + [\text{A}^-] = [\text{A}_{\text{tot}}] \quad (13)$$

*HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Bildung*

$$[\text{H}^+] \times [\text{HCO}_3^-] = K_c \times \text{pCO}_2 \quad (14)$$

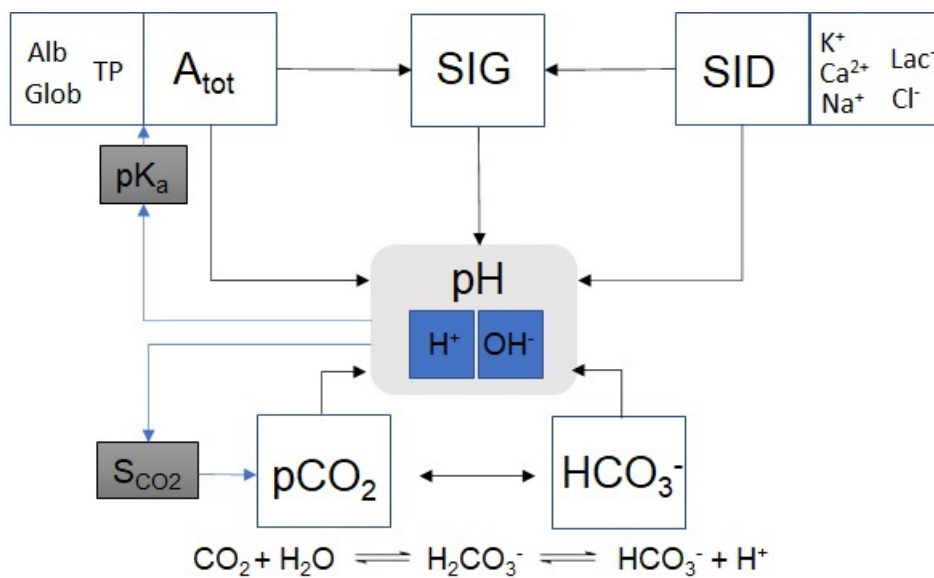
*Carbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) Bildung*

$$[\text{H}^+] \times [\text{CO}_3^{2-}] = K_3 \times [\text{HCO}_3^-] \quad (15)$$

$K_3$  = die Dissoziationskonstante von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> nach CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>

Nach dem Prinzip der Elektroneutralität folgt:

$$[\text{SID}] + [\text{H}^+] - [\text{HCO}_3^-] - [\text{A}^-] - [\text{CO}_3^{2-}] - [\text{OH}^-] = 0 \quad (16)$$



**Abbildung 1: Betrachtung der abhängigen und unabhängigen Variablen im SBH nach Stewart**

Alb: Albumin, Glob: Globuline, TP: Totalprotein, A<sub>tot</sub>: acid total, SIG: strong ion gap, SID: strong ion difference, pK<sub>a</sub>: Dissoziationskonstante der Proteine, S<sub>CO2</sub>: Löslichkeit von CO<sub>2</sub> im Plasma.

### 2.1.7.1 Die Differenz der starken Ionen

Die wichtigen Elektrolyte ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) im Blut sind starke Ionen. Sie liegen bei physiologischem pH-Wert des Blutes vollständig dissoziiert in Kationen und Anionen vor (Constable 1997). Durch diese vollständige Dissoziation sind sie nicht an chemischen Reaktionen beteiligt, haben keinen Puffereffekt und können mathematisch als fix betrachtet werden (Stewart 1983). Stewart bezeichnet daher starke Ionen auch als Nicht-Puffer-Ionen (Tab. 2) (Constable 2000). Ihr Beitrag zum Gesamtsystem besteht im Einfluss ihrer elektrischen Ladung auf die Elektroneutralität (Constable 1997). Elektrische Ladungsunterschiede, welche durch Unterschiede in der Anionen- und Kationen-Konzentration entstehen, müssen nach dem Gesetz der Elektroneutralität stetig und sofort ausgeglichen sein. Dies passiert im Körper durch die Dissoziation von Wasser in  $\text{OH}^-$  und  $\text{H}^+$ . Nach der Stewart-Theorie bestimmen daher die starken Ionen, auf Basis der Elektroneutralität, die Konzentration von  $\text{H}^+$  und somit den pH-Wert (Stewart 1983). Das Verhalten von  $\text{H}^+$  und  $\text{OH}^-$  kann mathematisch berechnet werden (Stewart 1983).

Im Blut ist die Anzahl der gemessenen starken Kationen immer größer als die der gemessenen starken Anionen. Die sich daraus ergebende rechnerische Differenz wird als Differenz der starken Ionen bzw. als „strong ion difference“ bezeichnet (Stewart 1983, Constable *et al.* 1998, Stewart 2009b). Im physiologischen Zustand nimmt SID immer eine positive Zahl ein, beim Menschen um die 40–42 mmol/l (Stewart 1983, Constable *et al.* 1998). Constable (1997) vereinfachte das Modell von Stewart mathematisch und machte es somit praktisch anwendbar. Je nach Anzahl der in die Berechnung einbezogenen, gemessenen starken Ionen kann SID unterschiedlich berechnet werden (Constable 1997) (Formeln 17-20):

$$[\text{SID}_3] = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) - [\text{Cl}^-] \quad (17)$$

$$[\text{SID}_4] = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{Ca}^{2+}]) - [\text{Cl}^-] \quad (18)$$

$$[\text{SID}_5] = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{Ca}^{2+}]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{Lac}^-]) \quad (19)$$

$$[\text{SID}_6] = ([\text{Na}^+] + [\text{K}^+] + [\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{Lac}^-]) \quad (20)$$

**Tabelle 2: Nicht-Puffer-Ionen und Puffer-Ionen im Blutplasma nach dem Modell der starken Ionen.**

---

**starke Ionen, Nicht-Puffer-Ionen, vollständig dissoziiert**

---

starke Elektrolyte

Natrium, Chlorid, Kalium, Calcium, Magnesium

starke Ionen und die korrespondierende organische Säure

Laktat	Laktatsäure
Sulfate	HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Pyruvate	Pyruvatsäure
Acetoacetate	Acetoacetat Säure
Carboxyl-Protein-Gruppe	R-COOH
β-Hydroxybutyrate	β-Hydroxybuttersäure
Succinate	Succinatsäure
Urate	Harnsäure
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NH <sub>3</sub>
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

---

**schwache Säuren, Puffer-Ionen, nicht vollständig dissoziiert**

---

geladene Puffer-Ionen

Bicarbonat – aus dem CO<sub>2</sub> System

nicht-geladene Puffer-Ionen

Albumin, Globulin, Phosphate

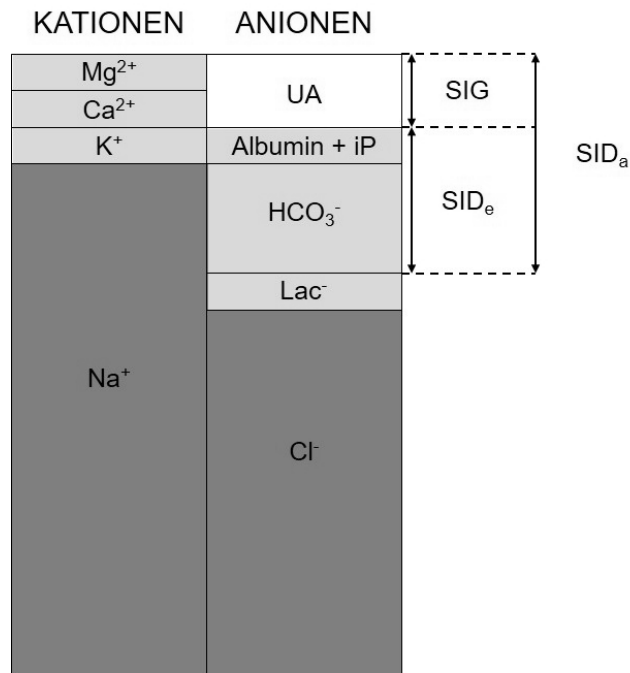
---

Quellen: (Fencel und Leith 1993, Constable 1997)

### 2.1.7.2 Die Lücke der starken Ionen

Da nicht alle Anionen und Kationen gemessen werden können, lässt sich so nur eine geschätzte SID, auch als apparente SID (SID<sub>a</sub>) bezeichnet, berechnen (Kellum *et al.* 1995b). Die ‚tatsächliche‘ SID (effektive SID, SID<sub>e</sub>) gibt HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und die schwachen Säuren (Proteine, Phosphate) wieder (Kellum *et al.* 1995b). Die Differenz der apparenten und der effektiven SID (SID<sub>a</sub>-SID<sub>e</sub>), wird als Lücke der starken Ionen (strong ion gap, SIG) bezeichnet (Figge *et al.* 1992, Constable 1999). In Abb. 2 sind SID<sub>a</sub>, SID<sub>e</sub> und SIG anhand eines Gamblegramm visuell dargestellt.

$$[\text{SIG}] = [\text{SID}_a] - [\text{SID}_e] = [\text{UA}] \quad (21)$$



**Abbildung 2: Gamblegramm, Darstellung der Elektroneutralität, d.h. der Elektrolyte im Blutplasma sowie der Differenz der starken Ionen und der Lücke der starken Ionen**

UA: unmeasured anions (nicht gemessenen Anionen); SIG: strong ion gap (Lücke der starken Ionen); SID<sub>e</sub>: effektive Differenz der starken Ionen, SID<sub>a</sub>: apparente Differenz der starken Ionen.

Wie AG basiert auch SIG auf dem Prinzip der Elektroneutralität. SIG ist jedoch deutlich genauer als AG, da Albumin, Globuline und Phosphat herausgerechnet werden (Constable 2000). SIG ist ein wichtiger Parameter, der immer gemeinsam mit SID betrachtet werden sollte. Vor allem bei kranken Tieren können nicht gemessene Anionen, wie β-Hydroxybutyrate, Acetoacetate und Sulfate, in nicht unerheblichen Konzentrationen vorkommen. Dies wird in der SID-Kalkulation nicht berücksichtigt, und eine isolierte Betrachtung von SID verfälscht die Interpretation (Constable 2000).

Constable etablierte unter Einbeziehung der drei unabhängigen Variablen pCO<sub>2</sub>, A<sub>tot</sub>, SID und der drei Konstanten K<sub>a</sub>, K<sup>-1</sup>, S<sub>CO2</sub> in die Formel für den pH-Wert eine Berechnungsmethode für SIG (Formel 22) (Constable *et al.* 1998). Die Formel hat Gültigkeit für Plasma und Serum:

$$[\text{SIG}] = \frac{1}{(1+10^{(\text{pK}_a-\text{pH}))} \times [\text{A}_{\text{tot}}]} - [\text{AG}] \quad (22)$$

Unter physiologischen Bedingungen ist SIG eine positive Zahl. Eine Zunahme an nicht gemessenen starken und schwachen Kationen (z. B.: Lithium, IgG-Immunglobuline) führt zu einer Reduktion von SIG (Constable 2000). Im Gegensatz dazu kommt es bei vermehrt



anfallenden, nicht gemessenen starken oder schwachen Anionen (z. B.: Ketonsäuren, Salicylate und D-Laktat) zu einer Erhöhung von SIG (Constable 2000).

### 2.1.7.3 Die Summe der nicht vollständig dissoziierten Substanzen mit negativer Ladung

Die im Blut vorhandenen schwachen Säuren Albumin, Globuline und Phosphat dissoziieren in dieser wässrigen Lösung nicht vollständig (Stewart 1983). Durch die unvollständige Dissoziation stellt sich ein Dissoziationsgleichgewicht zwischen Ausgangs- und Endprodukt ein, welches mit Hilfe von  $K_a$  berechnet werden kann. Stewart bezeichnet diese schwachen Säuren als Puffer-Ionen (Tab. 2). Dabei betrachtet er diese heterogene Gruppe theoretisch als einen großen Puffer unter der Bezeichnung  $A_{tot}$  (Constable 1997). Als Anionen haben Albumin, Globuline und Phosphat auch einen Effekt auf das System der elektrischen Ladung (Stewart 1983). Dieser Effekt ist nicht nur von ihrer Konzentration, sondern auch wesentlich vom Dissoziationsgrad abhängig (Constable 1997).

Erste Berechnungen in der Veterinärmedizin zu  $A_{tot}$  wurden von Constable (1997) angestellt. Albumin trägt den größten Anteil an der negativen Ladung der Plasmaproteine und stellt auch mengenmäßig den Hauptanteil dar. Die negative Ladung der Globuline ist geringer (Van Slyke *et al.* 1928, Rossing *et al.* 1986). Diese unterschiedlichen Eigenschaften müssen bei der mathematischen Betrachtung berücksichtigt werden. Constable (1997) stellte daher zwei Arten der Berechnung auf, basierend auf Totalprotein ( $A_{tot TP}$ , Formel 23) oder auf Albumin ( $A_{tot Alb}$ , Formel 24). Aufgrund der unterschiedlichen negativen Ladung müssen jeweils eigene Dissoziationskonstanten für Totalprotein und Albumin verwendet werden. Die  $K_a$ -Werte wurden von Constable mathematisch ermittelt (Constable 1997). Das mengenmäßig geringe anorganische Phosphat wird in den Berechnungen von Constable vernachlässigt.

$$[A_{tot TP}] = [TP] \times K_{a TP} \quad (23)$$

$$[A_{tot Alb}] = [Albumin] \times K_{a Albumin} \quad (24)$$

Die Struktur von Albumin sowie die Pufferfunktion aller Serumproteine variiert aber auch zwischen Tierarten. Somit sind für die korrekte Anwendung des „strong ion model“ speziesspezifische Werte für  $K_a$  und  $A_{tot}$  nötig (Constable 1997). Tabelle 3 zeigt einen Überblick über  $A_{tot}$  und  $K_a$ -Werte des Menschen und verschiedener Tierarten, welche in den letzten Jahren experimentell und mathematisch ermittelt wurden.

**Tabelle 3: Experimentell und theoretisch ermittelte Werte für  $A_{\text{tot}}$ ,  $K_a$ , und  $pK_a$  und daraus abgeleitete Umwandlungsfaktoren für Albumin und Totalprotein zur  $A_{\text{tot}}$ -Berechnung unterschiedlicher Spezies und Tierarten.**

	$A_{\text{tot}}$ in mmol/l (M $\pm$ SD)	$K_a \cdot 10^{-7}$ in Eq/l (M $\pm$ SD)	$pK_a$	Alb in mEq/g Protein	TP in mEq/g Protein	Referenzen
Pferd*	15,0 $\pm$ 3,1	2.22 $\pm$ 0,32	nv	nv	2,24	Constable (1997)
Pferd*	14,9 $\pm$ 0,8	2,11 $\pm$ 0,5	6,67	nv	2,1	Stämpfli <i>et al.</i> (1999)
Mensch*	17,2 $\pm$ 3,5	0,8 $\pm$ 0,6	7,1	3,78	2,24	Stämpfli und Constable (2003)
Kalb*	19,2 $\pm$ 6,1	0,84 $\pm$ 0,41	7,08	6,22	3,43	Constable <i>et al.</i> (2005)
Rind*	25	0,87	7,06	7,6	3,6	Constable (2002)
Katze*	24,3 $\pm$ 4,6	0,67 $\pm$ 0,4	7,17	7,6	3,5	McCullough und Constable (2003)
Hund*	17,4 $\pm$ 8,6	0,17 $\pm$ 0,11	7,77	4,69	2,73	Constable und Stämpfli (2005)
Vogel**	7,76 $\pm$ 2,15	2,15 $\pm$ 1,15	6,67	5,1	3,2	Stämpfli <i>et al.</i> (2006)

Alb: Umwandlungsfaktor zur Berechnung von  $A_{\text{tot Alb}}$  aus Alb in g/l; TP: Umwandlungsfaktor zur Berechnung  $A_{\text{tot TP}}$  aus TP in g/l;  $A_{\text{tot}}$ : acid total;  $K_a$ : Dissoziationskonstante für schwache Säuren; \*: experimentell ermittelt; \*\*: theoretisch ermittelt; nv: nicht vorhanden; M: Mittelwert; SD: Standardabweichung.

#### 2.1.7.4 Die Summe der molekularen Formen von Kohlendioxid

Der größte Teil von  $\text{CO}_2$  (etwa 90 %) liegt im Blut chemisch gelöst vor, ein kleiner Anteil bleibt in physikalischer Lösung (dissoziiertes  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_{2(d)}$ ) (Robinson 2013c). In wässrigen Lösungen chemisch gelöst verhält sich Kohlendioxid als schwache Säure und kann drei molekulare Formen einnehmen: Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ),  $\text{HCO}_3^-$  und Carbonat-Ion ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Stewart 1983). Der größte Teil des chemisch gelösten  $\text{CO}_2$  liegt als  $\text{HCO}_3^-$  (etwa 50 % in Erythrozyten, 27 % im Plasma) und nur ca. 11 % in Form von  $\text{CO}_3^{2-}$  vor (Robinson 2013c).

Stewart fasst alle vorhandenen vier molekularen Formen von  $\text{CO}_2$ , als Summe der flüchtigen Säuren ( $\text{CO}_{2(d)}$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{CO}_3^{2-}$ ), unter dem Symbol  $P_{\text{CO}_2}$  zusammen (Stewart 1983). Praktisch hat dies keine Auswirkungen und die respiratorische Komponente wird anhand des partiellen  $\text{CO}_2$  Druckes, also auf Basis des physikalisch gelösten  $\text{CO}_2$ , beurteilt. Wie hoch der jeweilige Anteil an physikalisch und chemisch gelöstem  $\text{CO}_2$  im Plasma ist (chemische Löslichkeit  $\text{CO}_2$  im Plasma,  $S_{\text{CO}_2}$ ), ist jedoch von der Temperatur, der Osmolarität und der Ionen-Stärke der Lösung abhängig (Austin *et al.* 1963, Stewart 2009a).

## 2.1.8 Die sechs primären Störungen des Säure-Basen-Haushaltes nach Stewart

Mit Hilfe des „strong ion model“ können sechs primäre Störungen des Säure-Basen-Haushaltes unterschieden werden (Constable 2000):

Respiratorische	SID	A <sub>tot</sub>
Azidose	Azidose	Azidose
Alkalose	Alkalose	Alkalose

### 2.1.8.1 Starke-Ionen-Azidose und Starke-Ionen-Alkalose

Eine erniedrigte SID repräsentiert eine metabolische Azidose, wobei das Verhältnis von Kationen und Anionen zugunsten der Anionen verschoben ist (Kellum 2000). Basierend auf den Gesetzen der Elektroneutralität und der Massenerhaltung kommt es zu einem Anstieg der H<sup>+</sup>-Konzentrationen und zur Erniedrigung des pH-Wertes (Stewart 1983).

Wie in Tabelle 4 ersichtlich, kann dies durch Cl<sup>-</sup>-Shift zwischen Kompartimenten, Störungen im Cl<sup>-</sup>-Transport, vermehrt anfallende organische Anionen wie Laktat und Keton-Körper oder durch von außen zugeführte Anionen wie Cl<sup>-</sup> (NaCl-Infusion), Salicylate oder Gifte entstehen (Kellum 2000). Umgekehrt kommt es aber auch durch den Verlust an Kationen, zum Beispiel über den Kot wie bei Durchfall, zu einer SID-Azidose (Kellum 2000).

**Tabelle 4: Differentialdiagnosen für eine Starke-Ionen-Azidose (SID ↓) beim Menschen**

nicht-renale Ursachen		renale Ursachen
<u>gastrointestinal</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durchfall</li> <li>• Dünndarm-/Pankreasdrainage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• distale renale tubuläre Azidose</li> </ul>
<u>iatrogen</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• parenterale Ernährung</li> <li>• Kochsalzlösung/ „Verdünnungszidose“</li> <li>• Medikamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• proximale renale tubuläre Azidose</li> <li>• Aldosteron Mangel – Morbus Addison</li> </ul>
<u>organische Anionen</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laktatazidose</li> <li>• Diabetische Ketoazidose</li> </ul>	
<u>anorganische Anionen</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gifte</li> <li>• Medikamente</li> </ul>	

Quelle: (Kellum 2000)

Ein Anstieg von SID ist Indiz für eine metabolische Alkalose. Dabei ist das Kationen-Anionen-Verhältnis zugunsten der Kationen verschoben. Dies kann, wie in Tabelle 5 ersichtlich, durch

den Verlust von Anionen oder die übermäßige Zufuhr von Kationen entstehen, z. B. Verlust von Chlorid-Ionen infolge von Erbrechen (Kellum 2000).

**Tabelle 5: Differentialdiagnosen für eine Starke-Ionen-Alkalose (SID ↑) beim Menschen**

---

**Cl<sup>-</sup> responsive Cl<sup>-</sup>-Verluste (Cl<sup>-</sup>-Konzentration im Urin <10 mmol/l)**

gastrointestinale Verluste: Erbrechen, Magenentleerung

Diuretika

Post-Hyperkapnie\*

**nicht auf Cl<sup>-</sup> responsive Cl<sup>-</sup>-Verluste (Cl<sup>-</sup>-Konzentration im Urin >20 mmol/l)**

primärer Hyperaldosteronismus (Conn's Syndrom)

sekundärer Hyperaldosteronismus

Morbus Cushing

exogen zugeführte Mineralocorticoide

**massive Diurese****erhöhte Zufuhr von Na<sup>+</sup>-Ionen im Vergleich zu Cl<sup>-</sup>-Ionen**

große Mengen an Bluttransfusion

parenterale Ernährung

Plasmaexpander (HES-Lösung)

Natrium Laktat (Ringer-Lösung)

**hochgradiger intrazellulärer Kationen Mangel (Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>)**

---

Quelle: (Kellum 2000)

\* Hyperkapnie führt zur gesteigerten HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Rückresorption aus dem proximalen Tubulus, dies geschieht elektroneutral über einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport, was zu einer hypochlorämischen metabolischen Azidose führt.

**2.1.8.2 A<sub>tot</sub>-Azidose und A<sub>tot</sub>-Alkalose**

Eine Hyperproteinämie erhöht die Konzentration an schwachen Säuren im Blut und führt zu einer Azidose. Eine Hypoproteinämie vermindert die Konzentration an schwachen Säuren, woraus eine Alkalose resultiert (McAuliffe *et al.* 1986, Rossing *et al.* 1986, Constable 1997).

**2.1.9 Vor- und Nachteile des „strong ion model“**

Der große Vorteil des „strong ion model“ liegt in der Möglichkeit, physiologische und pathophysiologische Vorgänge zu differenzieren und die Komplexität des SBH besser zu verstehen (Fencel und Leith 1993). Komplexe bzw. gemischte Störungen im SBH, bei denen mehrere Störungen parallel auftreten und sich teilweise aufheben, können mit den klassischen Berechnungen nur unzureichend oder gar nicht erfasst werden (Fencel *et al.* 2000, Kellum 2000). Insbesondere die Effekte von Hypo- und Hyperproteinämie auf den Säure-Basen-

Status können nur durch das Modell der starken Ionen erkannt und erklärt werden (Rossing *et al.* 1986). Durch die Erkenntnis des Verhaltens der abhängigen Variablen ergeben sich auch neue Einblicke und Sichtweisen auf physiologische Vorgänge im Körper (Stewart 1983).

Primär werfen Kritiker dem „strong ion model“ vor, keinen zusätzlichen Nutzen zu bringen (Cameron 1989, Siggaard-Andersen und Fogh-Andersen 1995). Die auf chemischen Reaktionen basierende, aber mathematisch berechnete Abhängigkeit oder Unabhängigkeit der Variablen wird als fragwürdig kritisiert (Funk 2007). Ebenso werden im Modell der starken Ionen fünf Konstanten mathematisch angewendet, welche jedoch aufgrund ihrer teilweisen Abhängigkeiten vom pH-Wert und von der Temperatur nicht immer als konstant angesehen werden können (Stewart 1983, Constable *et al.* 1997). Diese 5 Variablen sind:

- $K_a$  = effektive Dissoziationskonstante für schwache Säuren im Plasma,  $A_{tot}$
- $K'_w$  = Ionenprodukt des Wassers
- $K'_1$  = effektive Dissoziationskonstante für die Henderson-Hasselbalch-Gleichung
- $S_{CO_2}$  = Löslichkeit von  $CO_2$  in Plasma
- $K_3$  = apparente Dissoziationskonstante für  $HCO_3^-$

Ein wesentliches Problem bei der Anwendung des „strong ion model“ stellt die korrekte Bestimmung von SID und von  $A_{tot}$  dar (Constable 1997). Im Plasma gemessene Elektrolyte variieren in Abhängigkeit von der Messmethode und den verwendeten Geräten (Stämpfli *et al.* 2014). So ergaben z. B. Messungen mit ionenselektiven Elektroden (im Vergleich zu denen mit anderen Untersuchungsmethoden) abweichende Referenzwerte für Elektrolyte im Blut gesunder Menschen (Kraut und Madias 2007). Durch Einbeziehung mehrerer starker Ionen in die Berechnung von SID entsteht eine kumulative Messungenauigkeit (Constable 1997). Je mehr Elektrolyte einbezogen werden, umso höher wird dieser Fehler. Bei der Berechnung von  $SID_4$  liegt diese Ungenauigkeit jedoch akzeptierbar bei etwa  $\pm 3$  mEq/l (Constable 1997). Für die korrekte Bestimmung von  $A_{tot}$  sind speziesspezifische Referenzwerte sowohl für die Konzentrationen von Gesamtprotein, Albumin und Globulinen im Plasma als auch für deren Dissoziationskonstanten  $K_a$  nötig (Constable 1997, Constable und Stämpfli 2005, Stämpfli *et al.* 2014). Auch wird die heterogene Gruppe der nicht flüchtigen Puffersubstanzen im Plasma von Stewart als ein homogener Puffer mit nur einer Dissoziationskonstante betrachtet (Constable 1997). Hier kommen Bedenken über die Effekte der relativen Konzentration der schwachen Säuren Albumin, Globuline sowie Phosphat auf. Daher wurden angepasste Berechnungsweisen für  $A_{tot}$  bei starken Veränderungen der Serumproteine empfohlen (Fencel und Leith 1993, Constable 1997). Ob auch der Grad der Dissoziation der Proteine durch Veränderungen von Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke beeinflusst wird, wird kontrovers diskutiert (Constable 1997).

## **2.2 Infektionen mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* und *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis***

### **2.2.1 Taxonomische Einordnung der Erreger**

Der *Mycobacterium avium* Komplex (MAC) zählt zu den sogenannten nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTB) und besteht aus 2 Spezies: *Mycobacterium avium* (*M. avium*) und *Mycobacterium intracellulare*. Insgesamt sind 28 Serotypen beinhaltet.

Folgende Subspezies können *Mycobacterium avium* zugeordnet werden (Thorel *et al.* 1990, Mijs *et al.* 2002):

- *M. avium* subsp. *avium*
- *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)
- *M. avium* subsp. *sylvaticum*
- *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH)

### **2.2.2 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

MAP ist der Erreger der weltweit verbreiteten Paratuberkulose, auch Johnesche Krankheit genannt (Clarke 1997). Primäre Wirte für Paratuberkulose sind Wiederkäuer; Nutztiere wie Wildtiere können gleichermaßen betroffen sein (Motiwala *et al.* 2004, Álvarez *et al.* 2005, Glawischnig *et al.* 2006, Nielsen und Toft 2009, Forde *et al.* 2012). Aber auch bei monogastrischen Tieren und Vögeln wurden MAP-Infektionen nachgewiesen, z. B. bei Katzen, Dachsen, Kojoten, Waschbären, Füchsen, Kaninchen, Ratten, Waldmäusen, Braunbären und Krähen (Greig *et al.* 1999, Beard *et al.* 2001, Kopecna *et al.* 2006, Arsenault *et al.* 2014, Arrazuria *et al.* 2015).

#### **2.2.2.1 Eigenschaften von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ist ein kleines (0,5 x 1,0-1,5 µm), langsam wachsendes, stäbchenförmiges, obligat-intrazelluläres, schwach grampositives Bakterium (Clarke 1997). Seine dicke Zellwand aus Lipiden und Polysacchariden macht es widerstandsfähig gegen niedrige pH-Werte, hohe und niedrige Temperaturen und Chemikalien (Rowe und Grant 2006). Da MAP das für den Eisentransport in die Zelle notwendige Mykobaktin nicht selbst bilden kann, ist der Erreger auf eine Wirtszelle bzw. auf den Zusatz von Mykobaktin in der kulturellen Anzucht angewiesen (Merkal und Curran 1974, Collins 2003). Anhand von genetischen Typisierungen werden drei Strangtypen von MAP unterschieden: Typ I (sheep strain, S), Typ II (cattle strain, C) und Typ III (intermittent strain) (Collins *et al.* 1990, Stevenson 2015).

Durch seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Umgebungsbedingungen ist MAP in der Umwelt lange überlebensfähig. Mit MAP kontaminierter Kot kann im Freien zwischen 152 und 246 Tagen infektiös bleiben, abhängig von Temperatur, Feuchtigkeit, Sonneneinstrahlung, Boden-pH-Wert und Strang-Typ. Im Einzelfall sind selbst Überlebenszeiten bis zu 385 Tagen dokumentiert (Collins 2003, Whittington *et al.* 2004).

### **2.2.2.2 Pathogenese, Verlauf, klinisches Bild und pathologische Veränderungen**

Eine Infektion mit MAP erfolgt hauptsächlich durch orale Aufnahme von mit Fäzes kontaminiertem Wasser, Futter, Kolostrum, kontaminierter Milch sowie über kotverschmutzte Zitzen (Sweeney 1996, Clarke 1997). Bei Karnivoren scheint die orale Aufnahme durch das Fressen der Beute zu erfolgen. Die Möglichkeit einer intrauterinen Übertragung beim Wiederkäuer wurde ebenso beschrieben wie die Übertragung durch Nematoden, Insekten und Aerosole (Clarke 1997, Rowe und Grant 2006, Whittington und Windsor 2009, Eisenberg *et al.* 2010, Arsenault *et al.* 2014).

Bei Rindern stellt das Alter einen wichtigen Risikofaktor für die Empfänglichkeit gegenüber MAP dar. Studien zeigten, dass Kälber bis zu einem Alter von sechs Monaten das höchste Infektionsrisiko aufweisen (Windsor und Whittington 2010, Mortier *et al.* 2013). Altersabhängige Veränderungen der Peyerschen Platten und der lokalen Schleimhautimmunität im Darm werden hierfür als Ursache diskutiert (Arsenault *et al.* 2014). Bei kleinen Wiederkäuern konnte eine vergleichbare Altersabhängigkeit noch nicht bestätigt werden (Clarke 1997, Mortier *et al.* 2013).

Nach einer langen asymptomatischen Phase, die durchaus drei bis fünf Jahre andauern kann, zeigen die betroffenen Tiere unspezifische Symptome wie struppiges Haarkleid, reduzierte Milchleistung, reduziertes Wachstum und intermittierenden Durchfall (Clarke 1997). Es kommt zu einer progressiv fortschreitenden chronischen Entzündung und Verdickung der Darmwand, wobei die Erreger in den regionalen Lymphknoten persistieren. Eine sogenannte Protein-Verlust-Enteropathie (protein losing enteropathy, PLE) entsteht, d. h., Nährstoffe und Proteine werden schlechter resorbiert, die Tiere magern zunehmend ab. Erst mit Fortschreiten der Infektion werden zirkulierende Antikörper gebildet, welche jedoch keinen immunologischen Schutz bieten (Manning und Collins 2001).

In dieser Endphase der Infektion kommt es zu einem raschen Fortschreiten der klinischen Symptome und zum Versterben der Tiere (Manning und Collins 2001, Koets *et al.* 2015). Es ist keine Heilung möglich. Ziegen zeigen eine weniger starke natürliche Resistenz gegen MAP-Infektionen und schnellere Krankheitsverläufe als andere Spezies (Stewart *et al.* 2007).

### **2.2.2.3 Nachweis einer *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infektion**

Der Nachweis von MAP ist direkt aus Kot- oder Organproben (mittels kultureller Anzucht, PCR-Tests oder mikroskopisch im Kotausstrich bzw. im Organabklatschpräparat) sowie indirekt über den Nachweis von Antikörpern in Blut oder Milch oder mit einem Test zum Nachweis der zellulären Immunantwort möglich. Das langsame Wachstum von MAP in der Kultur (Dauer: bis zu drei Monaten) und die zeitlich stark verzögerte humorale Immunantwort des Wirtstieres erschweren den Nachweis von MAP-Infektionen (Köhler *et al.* 2008, Sweeney *et al.* 2012).

### **2.2.2.4 Zoonotisches Potential**

Die Frage nach dem zoonotischen Potential von MAP ist bislang nicht ausreichend beantwortet. Der Konsum von kontaminierter Milch und kontaminiertem Fleisch soll ein mögliches Infektionsrisiko für den Menschen darstellen (Alonso-Hearn *et al.* 2009). MAP steht im Verdacht, ein Co-Faktor der multifaktoriellen Erkrankung *Morbus Crohn* beim Menschen zu sein (Bull *et al.* 2003, Scanu *et al.* 2007, Sweeney *et al.* 2012). Ebenfalls wird MAP als Trigger für Autoimmunerkrankungen, z. B. autoimmuner Diabetes Typ 1 und Multiple Sklerose, diskutiert (Naser *et al.* 2013).

## **2.2.3 *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis***

### **2.2.3.1 Eigenschaften von *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis***

Mijs *et al.* konnten 2002 mehrere dem *Mycobacterium avium* Komplex zugehörige Isolate weder genotypisch noch phänotypisch den bereits bekannten drei Subspezies (Thorel *et al.* 1990) zuordnen und bezeichneten diese als subsp. *hominissuis* (Mijs *et al.* 2002).

Prinzipiell gilt, dass nicht-tuberkulöse Mykobakterien bzw. dem MAC zugeordnete Spezies ubiquitär in der Umwelt vorkommen (Falkinham III *et al.* 2001, Biet *et al.* 2005, Hilborn *et al.* 2008, Falkinham III 2009). Speziell MAH-Isolate konnten sowohl in Torf, Wasser, Einstreu und Staub aus Schweinehaltungsbetrieben als auch am Schlachthof in Schweinefleisch und Schweinelymphknoten nachgewiesen werden (Matlova *et al.* 2005, Agdestein *et al.* 2011, Agdestein *et al.* 2014, Johansen *et al.* 2014).

### **2.2.3.2 Pathogenese, Verlauf, klinisches Bild und pathologische Veränderungen**

MAH gilt als opportunistischer Erreger beim Menschen und beim Schwein (Mijs *et al.* 2002). Während beim Menschen die Eintrittspforten und Übertragungswege noch nicht ausreichend aufgeklärt sind, geht man bei der Übertragung auf das Schwein von einer oralen Aufnahme aus den verschiedenen Reservoiren aus (Agdestein *et al.* 2014). Bei Schweinen verläuft die Infektion meist unbemerkt und wird in der Regel erst bei der Fleischschau im Schlachthof



festgestellt. Vereinzelt kommt es zu Aborten und zur Abmagerung der betroffenen Tiere. Auf natürlichem Wege infizierte Schweine zeigten granulomatöse Läsionen des Gastrointestinaltraktes und der gastrointestinalen Lymphknoten, aber auch in Lunge, Leber und in den Nieren wurden vereinzelt Läsionen gefunden (Johansen *et al.* 2014). MAH konnte auch aus den gastrointestinalen Lymphknoten von Schweinen isoliert werden, welche bei der Fleischschau keinerlei makroskopische Veränderungen zeigten (Agdestein *et al.* 2011, Agdestein *et al.* 2014, Johansen *et al.* 2014).

Schinköthe *et al.* (2016b) berichteten erstmals über eine experimentell induzierte MAH-Infektion bei Ziegen nach oraler Applikation des Erregers. Diese verlief heterogen, es zeigten sich sowohl ein fulminanter Verlauf mit hochgradigen Symptomen und plötzlichen Todesfällen einzelner Tiere als auch ein chronischer, milder Verlauf. Bei der pathologischen Begutachtung zeigte sich ein weites Spektrum morphologisch unterschiedlicher Granulome, vor allem im Gastrointestinaltrakt und im darmassoziierten lymphatischen Gewebe. Auffällig waren Ähnlichkeiten zu pathologischen Veränderungen, wie sie nach Infektionen mit *Mycobacterium bovis* zu finden sind (Schinköthe *et al.* 2016a, Schinköthe *et al.* 2016b).

### **2.2.3.3 Zoonotisches Potential von *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis***

Bei Kindern und Jugendlichen wurden Bakterien des MAC, im Speziellen MAH, in Zusammenhang mit einer Lymphadenitis am Kopf nachgewiesen (Biet *et al.* 2005, Despierres *et al.* 2012). Vor allem für immungeschwächte Personen, wie AIDS-Patienten, Patienten nach Organ-Transplantation oder Chemotherapie oder auch Personen mit chronischen Lungen- und Atemwegserkrankungen, stellen nicht-tuberkulöse Bakterien wie MAH ein hohes Risiko dar (Falkinham III 1996, Biet *et al.* 2005). Eintrittspforten, Infektionswege und Ablauf der Infektion sind beim Menschen jedoch noch nicht ausreichend aufgeklärt.

### 2.3 Aus dem Kenntnisstand der Literatur aufgezeigtes Wissensdefizit

Für die korrekte Interpretation des Säure-Basen-Haushaltes und daher auch für die Abgrenzung von krankheits-assoziierten Zuständen sind Kenntnisse über tierartspezifische Basiswerte – und deren physiologische Variabilität – eine wesentliche Voraussetzung. Dies gilt vor allem für die korrekte Anwendung des noch nicht im klinischen Alltag gebräuchlichen Modells der starken Ionen, aber auch für die traditionell auf Henderson-Hasselbalch basierenden Berechnungsweisen.

Für Wiederkäuer – im Speziellen für Ziegen – waren vor Beginn der eigenen Untersuchungen keine Daten im Schrifttum zu finden, welche die physiologischen Schwankungen im SBH in Abhängigkeit von Wachstum, Alter und/oder Fütterung widerspiegeln. Eine hohe Variabilität in der Säure-Basen-Homöostase ist insbesondere während der Transitphase vom milchsaugenden Lamm hin zum sich rein pflanzlich ernährenden Wiederkäuer zu erwarten. Dies steht im Zusammenhang mit der funktionellen Reifung des Vormagen-Komplexes und den sich entwickelnden fermentativen Verdauungsvorgängen.

Des Weiteren konnten im internationalen Schrifttum keine Daten gefunden werden, die Veränderungen im SBH im Zusammenhang mit der Paratuberkulose beschrieben. Im Endstadium dieser Erkrankung ist eine nachhaltige Beeinflussung der Säuren-Basen-Homöostase aufgrund von Malabsorption und Kachexie zu erwarten. Es stellt sich jedoch die Frage, welchen Einfluss chronische intestinale Mykobakterien-Infektionen bereits in der klinisch inapparenten Phase auf den SBH haben und inwieweit diese Säure-Basen-Veränderungen in die pathophysiologische Krankheitsentwicklung involviert sind. Zudem waren keine vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen verschiedener mykobakterieller Infektionen auf die Säure-Basen-Homöostase im Wiederkäuer dokumentiert.

Zur Klärung dieser offenen Fragen bedurfte es der Erfassung des SBH über einen Zeitraum von mehreren Monaten anhand der beiden aktuell bekannten Betrachtungsweisen zum SBH. In diesem Zusammenhang wurde zum einen deutlich, dass weder im veterinärmedizinischen noch im humanmedizinischen Schrifttum Referenz-Daten für SBH-Variablen im Longitudinalverlauf dokumentiert waren. Zum anderen fehlten vergleichende systematische Untersuchungen zu traditionellen SBH-Variablen und den Stewart-Variablen, insbesondere für Ziegen, da das Modell der starken Ionen *bis dato* noch keine Anwendung auf diese Tierart gefunden hatte.

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Aufgabenstellung und allgemeiner Versuchsaufbau

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für molekulare Pathogenese am Friedrich-Loeffler-Institut und der Universität Rostock wurden zwei Tierversuchsvorhaben durchgeführt, in denen jeweils ein etabliertes caprines Modell einer mykobakteriellen Infektion zur Anwendung kam (Köhler *et al.* 2015). Dieses Tiermodell basiert darauf, dass juvenile Ziegen oral mit Mykobakterien inokuliert werden, wobei gleichaltrige nicht-inokulierte Tiere als Kontrollen dienen. In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Mykobakterien-Challenge mit MAP. In der zweiten Versuchsreihe gab es zwei Versuchsgruppen, von denen eine einer MAP-Exposition und die andere einer MAH-Exposition ausgesetzt wurde. Die Versuchsdauer betrug je Tierversuch über ein Jahr (ca. 14 Monate). Während der gesamten Zeit wurden inokulierte Versuchstiere und unbelastete Kontrolltiere zeitgleich, aber streng räumlich getrennt, unter vergleichbaren Bedingungen gehalten.

Die Evaluierung des SBH war ein Teilaspekt des Gesamtprojektes. Zunächst galt es, im o. g. Ziegenmodell die physiologischen Effekte des somatischen Wachstums und der metabolischen Veränderungen während der Entwicklung zum Wiederkäuer, sowohl auf die traditionellen SBH-Variablen als auch auf die Stewart-Variablen zu erheben. Nach Kenntnis der physiologischen Variabilität sollten die Veränderungen im SBH evaluiert werden, welche mit den mykobakteriellen Infektionen bzw. den daraus resultierenden krankheits-assoziierten Veränderungen im Zusammenhang standen.

Den beiden dieser Dissertationsschrift zugrundeliegenden Studien lag jeweils die Arbeitshypothese zugrunde, dass die Komplexität der Säure-Basen-Homöostase sowie Veränderungen im SBH durch das Modell der starken Ionen vollständiger widergespiegelt werden als durch die traditionelle Betrachtungsweise. Folglich wurden neue Erkenntnisse bezüglich physiologischer Zusammenhänge im Säure-Basen-Haushalt bei jungen Ziegen und bezüglich pathophysiologischer Interaktionen zwischen dem SBH und Infektionen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien erwartet.

## 3.2 Tiere, Material und Methoden

### 3.2.1 Behördliche Genehmigung der Tierversuchsvorhaben

Die beiden den eigenen Untersuchungen zugrundeliegenden Tierversuchsvorhaben wurden in den Jahren 2011/2012 und 2013/2014 am Standort Jena des Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, durchgeführt. Die Genehmigung für beide nach § 8 des Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtigen Tierversuche wurde vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, ehemals Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, erteilt. Die zugehörigen Registriernummern waren 04-001/11 (Versuch 2011/2012) und 04-002/12 (Versuch 2013/2014). Sowohl die Haltung der Tiere als auch die Versuchsdurchführung erfolgten unter fachlicher Aufsicht des zuständigen Amtstierarztes. Die zuständige Tierschutzbeauftragte des Standortes konnte uneingeschränkt tätig sein.

### 3.2.2 Haltung, Fütterung und Gesundheitszustand der Tiere

Insgesamt wurden 95 Tiere der Rasse „Thüringer Wald Ziege“ in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen (n = 43 im Zeitraum 2011/2012, VERSUCHSREIHE I; n = 52 im Zeitraum 2013/2014, VERSUCHSREIHE II). Alle Tiere stammten aus demselben Herkunftsbetrieb, der nachweislich den Status „Paratuberkulose frei“ aufwies. Die Überführung der Tiere in das Friedrich-Loeffler-Institut erfolgte im Alter von 7–16 Tagen (VERSUCHSREIHE I) bzw. im Alter von 9–19 Tagen (VERSUCHSREIHE II). Die Körpermassen der Jungtiere variierten zum Zeitpunkt der Einstallung von 3,2 bis 7,6 kg ( $5,4 \pm 1,0$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; 2011/2012) und von 3,2 bis 8,0 kg ( $5,7 \pm 1,1$ ; Mittelwert  $\pm$  SD; 2013/2014). Der Großteil der Tiere war männlich (n = 83), da die weiblichen Tiere in der Regel zur weiteren Nutzung als spätere Zuchttiere im Herkunftsbetrieb verblieben. Alle männlichen Ziegen wurden im Alter von 6–8 Wochen *lege artis* kastriert.

Im Herkunftsbetrieb erhielten die Ziegenlämmer Kolostrum und wurden zunächst konventionell aufgezogen. Im Friedrich-Loeffler-Institut erfolgte die Fütterung mit Milchaustauscher, welcher schrittweise auf ein Alleinfuttermittel für Lämmer und später auf ein Alleinfuttermittel für adulte Ziegen umgestellt wurde (Abb. 3). Details zu Herstellern und Zusammensetzung der Futtermittel sind in Tabelle A1 im Anhang ersichtlich. Trinkwasser, Heu und ein Mineral-Leckstein (Blattimin; Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co. KG, Dormagen, Deutschland) standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung aller Tiere erfolgte unter Bedingungen der Bio-Sicherheitsstufe 2 in Laufställen auf Tiefstreu (Stroh). Tiergruppen mit unterschiedlichem Infektionsstatus wurden innerhalb derselben Gebäudehülle räumlich getrennt voneinander, jedoch unter identischen klimatischen Bedingungen gehalten und personell separat betreut.

Klinische Untersuchungen sowie ein definiertes Einstallungs-Monitoring inklusive mikrobieller Kotuntersuchungen zum Zeitpunkt der Einstallung stellten sicher, dass die Tiere klinisch gesund waren und schlossen sowohl Mykobakterien-Infektionen als auch relevante Co-Infektionen aus. Während der gesamten Dauer der Versuchsvorhaben wurde der Gesundheitszustand eines jeden Tieres täglich überwacht und dokumentiert. Eine Behandlung gegen Kokzidien erfolgte bei allen Tieren im Alter von zwei bis drei Monaten (Toltrazuril 20 mg/kg Körpermasse (KM), oral; Baycox, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und gegen Endo- und Ektoparasiten im Alter von vier, acht und zehn Monaten (Doramectin, 3 mg/kg KM, intramuskulär; Dectomax, Pfizer, Berlin, Deutschland). Im Alter von vier, acht und zehn Monaten erhielten alle Tiere zusätzlich eine Vitamin B Supplementierung (B1 Hevert, 200 mg/Tier, intramuskulär; Hevert, Nussbaum, Deutschland).

In VERSUCHSREIHE II verendete eine mit MAP inokulierte Ziege in der 20. Woche *post inoculationem* (pi). Des Weiteren verendeten zwei Ziegen aus der MAH-exponierten Gruppe innerhalb der ersten 7 Wochen pi und weitere 10 Tiere dieser Gruppe mussten aufgrund von Abbruchkriterien (nach § 8 des Tierschutzgesetzes) vorzeitig euthanasiert werden. Damit verringerte sich die Anzahl der Ziegen, die mit MAH inokuliert worden waren, von ursprünglich 21 Tieren ab der 16. Woche pi auf lediglich 9 im Versuch verbleibende Tiere (Abb. 3). Letztere wurden zum regulären Ende der Versuchsdauer in den Wochen 48–55 pi euthanasiert. Es wurde eine histo-pathologische Untersuchung aller euthanasierten und verendeten Tiere durchgeführt.

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

### **3.2.3 Experimentelle Tierversuchsreihen und Studiendesign**

#### **3.2.3.1 VERSUCHSREIHE I und VERSUCHSREIHE II**

Nach der Einstallung für das jeweilige Tierversuchsvorhaben wurden die Tiere randomisiert in Gruppen eingeteilt. Danach erfolgte die Exposition gegenüber Mykobakterien, indem das jeweilige Inokulat insgesamt zehn Mal (aller zwei bis drei Tage) über einen Zeitraum von etwa vier Wochen hinweg oral – zusammen mit der Tränke – an die Versuchstiere appliziert wurde. Die Tiere in den Kontrollgruppen erhielten lediglich Milchaustauscher.

In VERSUCHSREIHE I wurde 28 Ziegen mit dem Erreger MAP inokuliert, in VERSUCHSREIHE II 21 Ziegen mit MAP und zusätzlich 21 Tiere mit dem Erreger MAH. Die aufsummierte Inokulationsdosis von MAP betrug  $2,6 \times 10^8$  cfu (colony forming units) pro Tier. Verwendet wurde das MAP Feld-Isolat (J II-1961) aus einem Ileocecal-Lymphknoten einer paratuberkuloseinfizierten Kuh, welches zuvor als nichtpigmentierter Typ II Strang

charakterisiert worden war (Borrmann *et al.* 2011). Die MAH-Inokulation erfolgte mit dem Isolat 09MA1289, welches ursprünglich aus dem Lymphknoten eines Schweines isoliert worden war. Die gesamte MAH-Inokulationsdosis pro Tier betrug  $2,13 \times 10^{10}$  cfu. Die Aufbereitung der Inokulate wurde vorab veröffentlicht (Köhler *et al.* 2015).

Innerhalb des Studiendesigns war vorab definiert, dass Tiere zu festgelegten Zeitpunkten und in randomisierter Auswahl je Gruppe pathologisch untersucht werden. Somit sank in beiden Tierversuchsvorhaben die Anzahl der Tiere im zeitlichen Verlauf planmäßig. Wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben, waren in VERSUCHSREIHE II zusätzlich Tierverluste zu verzeichnen. Die Anzahl der Tiere je Gruppe und Zeitperiode ist in Abb. 3 ersichtlich.

Für regelmäßige Blutentnahmen wurden die Zeiträume pi in Intervalle von je 4 Wochen eingeteilt (Abb. 3). Je Intervall wurden pro Tier zwei venöse Blutproben für die Analyse von Blutgasen, Elektrolyten und Metaboliten gewonnen. Beide Blutproben je Tier und Zeitpunkt wurden analysiert, so dass *de facto* eine Doppelbestimmung erfolgte, deren Messwerte für nachfolgende Auswertungen gemittelt wurden.

Lebenswoche		1-2	3-6	7-9	10-13	14-17	18-21	22-25	26-29	30-33	34-37	38-41	42-45	46-49	50-53	54-57
Einstellung																
Woche pi				1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23	24-27	28-31	32-35	36-39	40-43	44-47	48-51
Versuchsreihe I 2011/2012	MAP n=28		INOKULATION	28		26		19		13		7		6		
	KT n=15	15				13		10		7						
Versuchsreihe II 2013/2014	MAP n=21	21				16		15		10						
	MAH n=21	21		18	16	10	9				8					
	KT n=10	10								4						
Fütterung			MAT	MAT + KF		KF										

**Abbildung 3: Studiendesign der VERSUCHSREIHEN I und II**

MAT: Milchaustauscher-Tränke; KF: Kraftfutter; MAP: mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inokulierte Tiere; KT: Kontrolltiere; MAH: mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* inokulierte Tiere.

### 3.2.3.2 Zuordnung der Daten beider Versuchsreihen zu STUDIE I und STUDIE II

Obwohl VERSUCHSREIHEN I und II zeitlich nacheinander stattfanden, ergab die statische Analyse, dass sowohl die Daten der klinischen Untersuchungen als auch die Daten zum SBH als eine Grundgesamtheit angesehen werden konnten. Folglich wurden die VERSUCHSREIHEN I und II gemeinsam betrachtet, jedoch basierend auf den beiden Fragestellungen den STUDIEN I und II zugeordnet und separat ausgewertet:

- Zur Evaluierung der physiologischen Variabilität des SBH wurden in STUDIE I die Daten zum Säure-Basen-Haushalt aller gesunden 25 Kontrolltiere (VERSUCHSREIHE I: n = 15; VERSUCHSREIHE II: n = 10) gemeinsam betrachtet und verglichen.

- STUDIE II diente der Aufklärung des pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen Infektionsgeschehen und Veränderungen im SBH. Die Daten beider Versuchsreihen wurden zusammengefasst und gemeinsam betrachtet. Somit wurden Informationen zum Säure-Basen-Haushalt von 48 mit MAP inokulierten (VERSUCHSREIHE I: n = 27; VERSUCHSREIHE II: n = 21) und 18 mit MAH inokulierten Ziegen einbezogen und denen der 25 gesunden Kontrolltiere gegenübergestellt. Eine Besonderheit hierbei war, dass sich die mit MAH inokulierten Tieren nicht als eine homogene Gruppe darstellten. Aufgrund sehr unterschiedlicher Krankheitsverläufe war es nötig, diese Gruppe in Tiere mit akutem, schwerem Krankheitsverlauf (Subgruppe MAH 1, n = 9) und jene mit chronischem Verlauf der Infektion (Subgruppe MAH 2, n = 9) zu unterteilen. Drei der MAH-Tiere mussten von der Gruppierung (und folglich von der weiteren Auswertung) ausgeschlossen werden; eines aufgrund einer Nabelentzündung, zwei weitere, da sie weder aufgrund des klinischen Verlaufs noch nach der histo-pathologischen Befundung eindeutig einer der beiden Subgruppen zuzuordnen waren.

Weitere Details der Studiendesigns sind in der entsprechenden Publikation dargelegt.

### **3.2.4 Blutuntersuchungen und Ermittlung der Säure-Basen-Parameter**

#### ***Gewinnung und Aufbereitung der Blutproben***

Die Gewinnung venöser Blutproben erfolgte jeweils ca. drei Stunden nach der Morgenfütterung durch Punktion der *Vena jugularis* mit sterilen Einmalkanülen. Zunächst wurden zwei sterile elektrolytbalancierte Trocken-Heparin-Spritzen (Füllvolumen 2 ml, PICO 50, Radiometer Medical ApS, Brønshj, Dänemark) ohne Einschluss von Luftblasen befüllt und sofort luftdicht verschlossen. Anschließend wurde eine Monovette zur Serumgewinnung befüllt (Füllvolumen 9 ml, S-Monovette®, Sarstedt AG & Co. KG, Nuembrecht, Germany) und 30 Minuten bei 2000 x g (Umdrehungen/Minute) und Zimmertemperatur zentrifugiert (Labofuge® 400R, Kendro, Hanau, Deutschland). Das so gewonnene Serum wurde durch Pipettieren in Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

#### ***Biochemische-Analysen im Blutserum***

Folgende Analysen des Blutserums wurden im Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik (IVD, Berlin-Lankwitz) durchgeführt: die Messung der Konzentrationen an Totalprotein [TP] und anorganischem Phosphat [iP] mittels Spektral-Photometrie (Cobas 6000, Roche/Hitachi), die Ermittlung der Konzentrationen an Globulinen und Albumin mittels Kapillarelektrophorese (Capillarys2, Sebia). Der Albumin-Globulin Quotient wurde später aus den übermittelten Rohdaten errechnet.

**Analyse der Blutgase, Elektrolyte und Metabolite**

Die Analyse der heparinisierten Blutproben mit dem kombinierten Blutgas- und Elektrolyt-Analysegerät ABL725 Series (Radiometer Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark) erfolgte innerhalb von zehn Minuten nach Gewinnung der Blutproben. Vor Überführung des Vollblutes in den Automaten wurde der erste Blutstropfen aus dem Konus der Einmalspritze verworfen.

Der pH-Wert und der  $p\text{CO}_2$  des venösen (v) Blutes wurden, wie bei kommerziellen Blutgasanalytoren üblich, bei  $37^\circ\text{C}$  analysiert. Die Korrektur dieser beiden Kenngrößen auf die aktuelle Körpertemperatur erfolgte mittels implementierter Software unter Eingabe der für jedes Tier vor der Blutprobengewinnung individuell ermittelten Rektaltemperatur. Die Konzentrationen von Natrium  $[\text{Na}^+]$ , Kalium  $[\text{K}^+]$ , Calcium  $[\text{Ca}^{2+}]$  und Chlorid  $[\text{Cl}^-]$  wurden auf der Basis ionenselektiver Potentiometrie gemessen (ionisiertes Calcium); jene von Glucose  $[\text{Gluc}]$  und  $l$ -Laktat  $[\text{L-Lac}]$  mittels enzymatischer Elektroden (mit den Enzymen Glucose-Oxidase und Laktat-Oxidase). Zusätzlich wurden durch die integrierte Software der Hämatokrit-Wert, die Konzentration von Standard-Bicarbonat, der aktuelle Base Excess und der Standard Base Excess berechnet (Formeln als Anlage A3 im Anhang).

**Kalkulierte Variablen des Säure-Basen-Haushaltes**

Auf Basis der vom Blutgas- und Elektrolyt-Analysator erhobenen Daten wurden – unter Anwendung des Programms Excel – zusätzlich folgende Kenngrößen des SBH errechnet: aktuelles  $\text{HCO}_3^-$ , AG,  $\text{SID}_{\text{m3}}$ ,  $\text{SID}_{\text{m4}}$ ,  $\text{SID}_{\text{m5}}$ ,  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$ ,  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  und  $\text{SIG}_{\text{TP}}$ . Für die Kalkulation des aktuellen Bicarbonats ( $\text{HCO}_3^-_{\text{kalk}}$ ) fand die Formel 25 Anwendung (Constable 2000), wobei für pH-Wert und  $p\text{CO}_2$  die jeweils auf die individuelle Körpertemperatur (T) korrigierten Werte eingesetzt wurden. Des Weiteren wurden eine Löslichkeit für  $\text{CO}_2$  ( $S_{\text{CO}_2}$ ) von 0,0307 bei  $37^\circ\text{C}$  (Austin *et al.* 1963) und eine Dissoziationskonstante für  $\text{CO}_2$  ( $pK_1'$ ) von 6,120 (Putnam und Roos 1991) verwendet.

$$[\text{HCO}_3^-_{\text{kalk}}] = 0,0307 \times p\text{CO}_2(T) \times 10^{(\text{pH}(T) - 6,120)} \quad (25)$$

Zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit konnten in der Literatur keine Werte für die Dissoziationskonstante ( $K_a$ ) von Totalprotein und Albumin im Plasma von Ziegen gefunden werden. Daher wurden für die Kalkulation von  $A_{\text{tot}}$  die experimentell für Kälber ermittelten  $K_a$ -Werte und daraus abgeleitete Umwandlungsfaktoren angewandt (Constable *et al.* 2005). Details zu den verwendeten Formeln und den  $K_a$ -Werten finden sich in den jeweiligen Publikationen.



### **3.2.5 Euthanasie der Tiere und pathologische Untersuchung**

Zur kontinuierlichen Erfassung des Infektionsverlaufes sowie damit einhergehender Gewebeveränderungen und Entzündungsreaktionen wurden im Laufe beider Versuchsreihen einzelne Tiere euthanasiert und histo-pathologisch untersucht. Die Zeitpunkte für die planmäßigen pathologischen Untersuchungen (3 bzw. 6 Monate pi) waren im Studiendesign fixiert; die Entnahme der Einzeltiere aus den jeweiligen Gruppen erfolgte randomisiert. Die entsprechenden histo-pathologischen Untersuchungen erfolgten in der Arbeitsgruppe ‚Pathologie‘ des Instituts für molekulare Pathogenese am Friedrich-Loeffler-Institut, Standort Jena.

Die histo-pathologischen Untersuchungen waren nicht Bestandteile der eigenen Forschungsarbeiten, gehörten aber zum Design der Tierversuchsvorhaben. Die entsprechenden Befunde beschreiben die mit den mykobakteriellen Infektionen im Zusammenhang stehenden strukturellen Veränderungen (Krüger *et al.* 2015, Schinköthe *et al.* 2016a, Schinköthe *et al.* 2016b).

## 4 Publikationen und Darlegung der persönlichen Beiträge

### STUDIE I

**S. Redlberger**, S. Fischer, H. Köhler, R. Diller, P. Reinhold (2017):

Age-dependent physiological dynamics in acid-base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.

The Veterinary Journal 229: 45–52

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.017>

### STUDIE II

**S. Bassis**, S. Fischer, H. Köhler, P. Reinhold (2020):

Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

PLoS ONE 15(12): e0243892.

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892>

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

#### **4.1 STUDIE I: Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.**

persönlicher Beitrag:

- Datenerhebung und Berechnung der SBH-Variablen, basierend auf Henderson Hasselbalch und dem Modell der starken Ionen
- mathematisch-statistische Auswertung aller Daten
- Erstellung des Manuskripts inklusive Abbildungen und Tabellen

**You have to purchase this part online.**

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.017>

**4.2 STUDIE II: Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

persönlicher Beitrag:

- Datenerhebung und Berechnung der SBH-Variablen, basierend auf Henderson-Hasselbalch und dem Modell der starken Ionen
- mathematisch-statistische Auswertung aller Daten
- Erstellung des Manuskripts inklusive Abbildungen und Tabellen

## RESEARCH ARTICLE

# Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

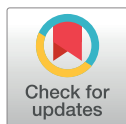
Stefanie Bassis<sup>1</sup><sup>✉</sup>, Sina Fischer<sup>1</sup><sup>✉</sup>, Heike Köhler<sup>1,2</sup>, Petra Reinhold<sup>1</sup><sup>\*</sup>

**1** Institute of Molecular Pathogenesis at 'Friedrich-Loeffler-Institut' (Federal Research Institute for Animal Health), Jena, Germany, **2** National Reference Laboratory for Paratuberculosis, Jena, Germany

<sup>✉</sup> Current address: Clinical Unit of Anesthesiology and Perioperative Intensive-Care Medicine, Emergency Clinic Small Animals, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

<sup>✉</sup> Current address: Chemical and Veterinary Investigation Office (CVUA) Karlsruhe, Karlsruhe, Germany

\* [petra.reinhold@fli.de](mailto:petra.reinhold@fli.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Bassis S, Fischer S, Köhler H, Reinhold P (2020) Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. PLoS ONE 15(12): e0243892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892>

**Editor:** Horacio Bach, University of British Columbia, CANADA

**Received:** December 19, 2019

**Accepted:** November 30, 2020

**Published:** December 14, 2020

**Copyright:** © 2020 Bassis et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its [Supporting information files](#).

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

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

## Abstract

In current literature, data assessing the acid-base equilibrium in animals and humans during bacterial infection are rare. This study aimed to evaluate acid-base deteriorations in growing goats with experimentally induced NTM (nontuberculous mycobacteria) infections by application of the traditional Henderson-Hasselbalch approach and the strong ion model. NTM-challenged animals were orally inoculated with either *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH; n = 18) or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP; n = 48). Twenty-five goats served as non-infected controls. Until 51<sup>st</sup> week post-inoculation (wpi), blood gas analysis, serum biochemical analysis, and serum electrophoresis were performed on venous blood. Fifty percent (9/18) of goats inoculated with MAH developed acute clinical signs like apathy, fever, and diarrhea. Those animals died or had to be euthanized within 11 weeks post-inoculation. This acute form of NTM-infection was characterized by significantly lower concentrations of sodium, calcium, albumin, and total protein, as well as significantly higher concentrations of gamma globulin, associated with reduced albumin/globulin ratio. Acid-base status indicated alkalosis, but normal base excess and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations, besides significantly reduced levels of SID (strong ion difference), A<sub>tot Alb</sub> (total plasma concentration of weak non-volatile acids, based on albumin), A<sub>tot TP</sub> (A<sub>tot</sub> based on total protein) and markedly lower SIG (strong ion gap). The remaining fifty percent (9/18) of MAH-infected goats and all goats challenged with MAP survived and presented a more sub-clinical, chronic form of infection mainly characterized by changes in serum protein profiles. With the progression of the disease, concentrations of gamma globulin, and total protein increased while albumin remained lower compared to controls. Consequently, significantly reduced albumin/globulin ratio and lower A<sub>tot Alb</sub> as well as higher A<sub>tot TP</sub> were observed. Changes were fully compensated with no effect on

blood pH. Only the strong ion variables differentiated alterations in acid-base equilibrium during acute and chronic NTM-infection.

## Introduction

Any bacterial infection is a complex event challenging homeostasis in the host organism in diverse ways depending on the infection site, the pathogen, the pathology, and the severity of infection. Basic data assessing the general effects of bacterial infection on acid-base balance are rare. In experimental veterinary medicine, an acute respiratory acidosis and strong ion (metabolic) acidosis was documented in pigs with an induced respiratory *Chlamydia suis* infection [1]. A mixed interplay between respiratory alkalosis (due to hyperventilation) and counterbalancing metabolic effects were reported in calves inoculated with the respiratory pathogen *Chlamydia psittaci* [2]. The effect of subclinical bacterial infection on acid-base equilibrium has yet to be elucidated. In particular, the effect of NTM-infections on acid-base homeostasis has not been assessed in animals or men so far.

Two major approaches to evaluate acid-base status are currently available, i.e. the traditional calculations of pH, bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), base excess (BE), and anion gap (AG) based on the Henderson-Hasselbalch equation, and the more recent strong ion models [3–5]. With traditional values, four primary disorders can be detected: metabolic acidosis, metabolic alkalosis, respiratory acidosis, and respiratory alkalosis [5]. Mixed and complex acid-base disorders cannot be assessed [6]. The linear relationship between  $\text{pCO}_2$  and pH indicated by Henderson-Hasselbalch is criticized as non-correct, and  $\text{HCO}_3^-$  cannot be regarded as an independent value of the metabolic component [4, 5]. Also, the temperature dependence of pH [7], and the dependence of the dissociation constant of carbonic acid ( $\text{pK}'_1$ ) on pH, temperature, protein concentration, and sodium concentration are not considered [4, 8, 9]. BE is criticized as non-accurate as it only shows a cumulative acid or base load and mixed acid-base disturbance may balance out [6, 10, 11].

In 1983, Stewart introduced the strong ion model based on the simultaneously valid principles of charge balance, dissociation equilibrium, and mass balance [3]. Thereby Stewart proposed that pH,  $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , weak acids, and their acid residues are dependent variables, and are determined by three independent factors: (1) the strong ion difference (SID; strong cations minus strong anions); (2) acid total ( $A_{\text{tot}}$ ; total concentration of non-volatile weak acids: i.e. mainly albumin, globulin, and inorganic phosphate); and (3)  $\text{pCO}_2$  [3]. Constable simplified the strong ion model calculation methods, first provided methods for calculation of  $A_{\text{tot}}$  [4], and established an equation for calculating the strong ion gap (SIG) to determine unidentified anions in plasma [12]. The strong ion models allow to distinguish metabolic disorders in SID acidosis, SID alkalosis,  $A_{\text{tot}}$  acidosis,  $A_{\text{tot}}$  alkalosis and to record the presence of unexplained anions via SIG [5]. The calculated dependent and independent variables seem questionable from a chemical point of view and are criticized to provide no further benefit [13, 14]. Despite the critique, only the strong ion models can detect a complex, mixed acid-base disorder and consider the effect of electrolytes, phosphate, and buffering effect of proteins [3, 5, 6, 10, 15]. Recent research proposes the necessity to apply both methods for correct acid-base assessment [16].

This study aimed to provide a profound assessment of pathophysiological changes in acid-base balance associated with experimentally induced NTM-infections in a goat trial. This was to be achieved by longitudinal monitoring of traditional and strong ion variables, blood pH, serum proteins, electrolytes, and metabolites. We assumed changes in electrolytes, serum

proteins, metabolites, and acid-base balance in goats with NTM-infections compared to healthy controls. These were to be characterized in detail. We hypothesized that the associated changes in acid-base balance could not fully be explained by the traditional values alone and that the strong ion variables were essential for correct interpretation.

## Materials and methods

### Legislation and ethical approval

Two consecutive animal experiments, each lasting 15 months (performed in the years 2011–2012 and 2013–2014) provided the experimental basis for this study. Animal experiments were carried out in strict accordance with European and National Law for the Care and Use of Animals. Protocols were approved by the Animal Health and Welfare Unit of the ‘Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz’ (permit numbers: 04-001/11 and 04-002/12; dates of permission: 03.03.2011 and 12.12.2012, respectively). Experiments were done under the supervision of the authorized institutional Animal Protection Officer. During the entire study, every effort was made to minimize suffering.

### Study design and animals

Goat kids (from one farm with no history of mycobacterial infections) were admitted to the Federal Research Institute for Animal Health (Friedrich-Loeffler-Institut, FLI) in Jena at the age of 7 to 19 days, weighing 3.2 to 8.0 kg ( $5.6 \pm 1.0$  kg; mean  $\pm$  SD). Upon arrival, fecal samples were collected and cultures from all animals were confirmed mycobacteria negative [17, 18].

For inoculation, two nontuberculous mycobacteria (NTM), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH), were chosen.

Animals were randomly assigned to challenge groups and non-infected control groups as shown in Table 1. The groups were kept separately under biosecurity level 2 conditions. Challenges with MAP or MAH, respectively, started one week after the entrance to the premises. Goat kids to be inoculated were exposed to the pathogen orally via milk replacer. Each goat was challenged 10 times with intervals of 2–3 days between two challenges, leading to an inoculation period of 4 weeks (Fig 1). Controls received pure milk-replacer.

Each animal trial lasted from the 1<sup>st</sup> to the 51<sup>st</sup> week post-inoculation (wpi), which was equivalent to the 7<sup>th</sup> to 57<sup>th</sup> week of life (wl) (Fig 1). Clinical examinations were performed daily (rectally measured body temperature (BT), general behavior, appetite, consistency of feces, nasal and ocular discharge, presence or absence of cough, respiratory rate). Jugular venous blood was collected in 4-week intervals, about three hours after morning feeding. A heparinized 2 mL plastic PICO 50 syringe (Radiometer, Copenhagen, Denmark) and a 7.5 mL plastic Monovette syringe (AG & Co. KG, Sarstedt, Germany) per animal were filled anaerobically. Necropsy and pathological examination at defined time points were obligatory, resulting in a constantly decreasing number of animals (Fig 1).

### Re-grouping of animals exposed to MAH

Unexpectedly, goat kids challenged with MAH ( $n = 21$ ) presented two opposite courses of infection. Nine animals fell seriously ill (MAH 1). Two of them died and seven had to be euthanized due to humane endpoints within the first 11 weeks after inoculation. Nine others turned into a mild progression of infection and survived until the end of the trial (MAH 2). Based on clinical and pathological examination, animals were reassigned to sub-group MAH 1 (acute form of MAH infection) or sub-group MAH 2 (chronic form of MAH infection) [18, 20]. Three MAH inoculated goats (one died, one euthanized due to humane endpoint, one was

**Table 1. Challenge groups and non-infected control groups of both trials.**

	challenge with MAP (n = 48)	challenge with MAH (n = 21)	non-infected controls, CG (n = 25)
number of animals per trial	27 (04-001/11)	-	15 (04-001/11)
	21 (04-002/12)	21(04-002/12)	10 (04-002/12)
sex	34 M / 4 F	16 M / 3 F / 1 FI	23 M / 2 F
age at inoculation in days (mean ± SD)	39 ± 3.2	41 ± 2.5	41 ± 2.6
excluded from study	0	3	0
total inoculation dosage per animal	2.6 x 10 <sup>8</sup> cfu	2.13 x 10 <sup>10</sup> cfu	-
characteristics of bacterial strains	field isolate (JII-1961), non-pigmented type II strain [19]	isolate 09MA1289 from swine lymph node [18]	

MAP, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH, *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. CG, control group. M, male. F, female. FI, Female infertile. cfu, colony-forming units.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.t001>

euthanized according to plan) could not be categorized by pathological examination and were excluded from the presented study.

### Housing conditions and animal welfare

Animals were kept under standardized conditions in air-conditioned rooms (20 ± 3 °C, 63 ± 6% relative humidity) on deep straw bedding. In the herd of origin, goat kids were raised conventionally with their mothers and had been fed colostrum. In the animal facility of FLI, the feeding regime was continuously adjusted to age and nutritional physiology (S1 Table). Water and meadow hay were supplied ad libitum. Male goats were castrated (6<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> wl) according to good veterinary practice under midazolam/ketamine general anesthesia and local anesthesia with lidocaine (intramuscular injection of 0.4 mg midazolam + 4 mg ketamine/kg body weight; Midazolam, Hexal, Holzkirchen, Germany; Ketamin, Intervet, Unterschleißheim, Germany; local injection into spermatic cords of 2 ml lidocaine/animal, Miocain 2%, bela-pharm, Vechta, Germany). For analgesia, goats received an intramuscular injection of phenylbutazone directly after surgery (20 mg/kg, Phenylbutazon 20%, CP-Pharma, Burgdorf, Germany) and intramuscular injections of metamizole one and two days postoperative (20–40 mg/kg, Metamizol, WDT, Garbsen, Germany). Goats received treatment against endo- and ectoparasites, and vitamin B supplementation as described elsewhere [17]. Goats inoculated with MAH that developed fever and apathy were treated with an intramuscular injection of metamizole (20 mg/kg, Metamizol, WDT, Garbsen, Germany). According to ethical standards, goats with severe clinical signs (apathy up to somnolence, a decrease of BT below

week of life	2-6	7-9	10-13	14-17	18-21	22-25	26-29	30-33	34-37	38-41	42-45	46-47	50-53	54-57	
week post-inoculation		1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23	24-27	28-31	32-35	36-39	40-43	44-47	48-51	
controls	Inoculation	n = 25					n = 23			n = 20		n = 17			
group MAP		n = 48			n = 47		n = 35		n = 34		n = 23		n = 18		
group MAH 2		n = 9	n = 9	n = 9	n = 9									n = 8	
group MAH 1		n = 9	n = 8	n = 6	n = 0										

**Fig 1. Study design.** MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.g001>



physiological values, no feed intake) were euthanized. Euthanasia and necropsy were conducted as described elsewhere [17].

## Analytical methods

### Analysis of blood gases and electrolytes

Heparinized blood samples were kept at room temperature and were analyzed within 10 min after collection using a combined blood-gas and electrolyte analyzer (ABL725 Series, Radiometer; Copenhagen, Denmark). The following variables were measured by the analyzer: venous pH (pH(v)), partial pressure of CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>(v)), as well as plasma concentrations of sodium ([Na<sup>+</sup>]), potassium ([K<sup>+</sup>]), calcium ([Ca<sup>2+</sup>]), and chloride ([Cl<sup>-</sup>]). Electrolytes were measured via ion-selective potentiometry. Concentrations of glucose ([Gluc]) and L-lactate ([L-Lac]) in plasma were measured using the same equipment with enzymatic electrodes (glucose oxidase, lactate oxidase). Values of partial pressures and pH were corrected for BT measured rectally before each blood collection. Each sample was analyzed in duplicate and results were averaged.

### Serum biochemical analysis

Blood samples were centrifuged, serum harvested, and stored at -20 °C until analysis. The concentrations of total protein ([TP]) and inorganic phosphate ([iP]) were measured spectrophotometrically with the biuret method and ammonium-molybdate, respectively. The concentrations of albumin ([Alb]) and globulins, as well as globulin spectra, were measured by capillary electrophoresis with the Capillary 2 (Sebia; Evry Cedex, France).

### Calculated acid-base variables

The following variables were calculated by the blood-gas and electrolyte analyzer using proprietary equations included in the software: blood pH and pCO<sub>2</sub> corrected for the rectally measured BT of the animal (pH(v)<sub>BT</sub>, pCO<sub>2</sub>(v)<sub>BT</sub>), hematocrit (Hct), standard bicarbonate ([HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)]), actual base excess ([BE]), and standard base excess ([BE<sub>ecf</sub>]).

### Henderson-Hasselbalch approach and anion gap

Bicarbonate was calculated via the Henderson-Hasselbalch equation. For calculation, pH(v)<sub>BT</sub>, pCO<sub>2</sub>(v)<sub>BT</sub>, the assumed value for solubility of carbon dioxide, S = 0.037 at 37 °C [8], and the dissociation constant for carbon dioxide pK1' of 6.120 [7] were used. The anion gap, displaying the amount of unmeasured anion concentration, was calculated [5]:

$$AG = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$$

### SID and strong ion approach

Strong ion difference was calculated from 3, 4, or 5 strong ions measured (<sub>m</sub>) in plasma:

$$SID_{m3} = ([Na^+] + [K^+]) - [Cl^-]$$

$$SID_{m4} = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [L-Lac])$$

$$SID_{m5} = ([Na^+] + [K^+] + [Ca^{2+}]) - ([Cl^-] + [L-Lac])$$

For goats and other small ruminants no data about plasma buffer capacity or values for A<sub>tot</sub>, as well as the effective dissociation constant for plasma weak acids K<sub>a</sub> or its negative logarithm pK<sub>a</sub>, have been published. Values for cattle and calves are available and have been

previously applied to goats [21]. Accordingly, the values described for calves were used [22]:

$$K_a = (0.84 \pm 0.41) \times 10^{-7}; \quad pK_a = 7.08$$

$$A_{tot\ TP} = [TP](g/L) \times 0.343$$

$$A_{tot\ Alb} = [Alb](g/L) \times 0.622$$

The strong ion gap (SIG) was calculated according to Constable [5, 12] from [TP] in g/L and from [Alb] in g/L, based on temperature-corrected pH values:

$$SIG_{TP} = \frac{A_{tot\ TP}}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} - AG = \left( [TP] \times \frac{0.343}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} \right) - AG$$

$$SIG_{Alb} = \frac{A_{tot\ Alb}}{(1 + 10^{(pK_a - pH)})} - AG = \left( [Alb] \times \frac{0.622}{(1 + 10^{(7.08 - pH)})} \right) - AG$$

### Statistical analysis

Exploratory statistical evaluation revealed that no significant differences existed between the two consecutive animal trials concerning the courses of MAP-infection or in non-infected controls over time. Thus, data from all animals exposed to MAP and all non-infected controls were merged into the respective comparison groups. Since the clinical courses of MAH-infections differed significantly between acute and chronic, the two MAH-subgroups (MAH 1, MAH 2) were analyzed separately.

Data were explored using frequency distributions and illustrated via boxplots presenting medians and 25–75% percentiles (boxes), with outlier values, given as circles (\*), and extreme values given as stars (\*). A descriptive statistic was performed for the whole study period. Data were summarized using medians and ranges (minimum, maximum). Evaluation of data by the Shapiro-Wilk test and histogram revealed that data was not normally distributed.

Due to the study design and circumstances, the number of animals decreased over study time. Within a given time-interval, the number of goats differed between groups but was constant within a group. The non-parametric Mann-Whitney *U*-test (MWU, Wilcoxon rank-sum test) was used to identify significant differences between independent groups within a given time interval. Due to the resulting low numbers of animals at the end of the study, the Mann-Whitney *U*-test was performed until the 28<sup>th</sup> wpi. Within each dependent group, the variance of blood values over time was tested with the non-parametric Friedman test for significance. Significant differences were subsequently confirmed by the Wilcoxon Ranked Sum post hoc test. The test was applied to goats of one group that lived from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi until the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi, or until the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi in sub-group MAH 1.

All analyses were carried out using SPSS Statistics Version 19.0 (IBM Corporation), R-Statistics, and Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation). P values < 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

### Two clinical courses of mycobacterial infections

By the end of the inoculation period, increased BT values (39.6 °C up to 41.1 °C) were recorded in goats challenged with MAH (S2 Table). Furthermore, mild depression to apathy, and intermittently soft feces up to pasty to liquid diarrhea were noted. About 50% of the MAH inoculated animals died or had to be euthanized before the 11<sup>th</sup> wpi (sub-group MAH 1). The

remaining 9 goats inoculated with MAH presented milder symptoms and recovered clinically (by gaining physiological BT data) until 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> wpi (S2 Table). These 9 MAH-exposed goats stayed clinically unsuspecting until the end of the study (sub-group MAH 2).

Inoculation with MAP resulted in a more homogenous course of infection. No acute onset of illness was seen, and all MAP-challenged goats developed subclinical to mild clinical forms of infection.

### General changes in metabolites and acid-base equilibrium observed in all NTM-challenged groups

Within the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi, significantly higher blood concentrations of glucose and inorganic phosphate (iP) compared to 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi were observed in all goat kids irrespective of infection, and median concentrations of <sub>L</sub>-Lac were above 1 mmol/L in all groups of goat kids (S2 Table). Up to the 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> wpi (4<sup>th</sup>-5<sup>th</sup> month of life), [Gluc], [<sub>L</sub>-Lac] and [iP] decreased with age and stayed in the same range afterward until the end of the study in all surviving goats (S2–S5 Tables). Up to the 4<sup>th</sup>-5<sup>th</sup> month of life, median [TP] values in the blood increased to about  $\geq 130\%$  in all surviving groups of goats compared to data after inoculation and stayed in the same range afterward (S6 Table). Despite that increase in [TP], all NTM-challenged groups showed lower [Alb] compared to controls during this time (S6 Table). Within the first weeks after inoculation, all NTM-challenged goats had lower [TP] and significantly lower [Gamma glob] compared to controls (S6 Table). Depending on the infection group, serum proteins then developed differently onwards. Within the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi, significantly lower SIG<sub>Alb</sub>, and SIG<sub>TP</sub>, and higher AG were observed in all NTM-challenged animals compared to controls (Table 2, S6 Table). Thereby, SIG<sub>Alb</sub> -median values in NTM-challenged goats were 3 to 4 times lower compared to the median value in controls (Table 2).

After the observed increase in [TP], i.e. from the 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> wpi to the 20<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> wpi (4–7 months of age), all remaining goats had a mild acidosis characterized by lower blood pH, significantly lower [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [BE], [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)] and [BE<sub>Ecf</sub>], compared to values within 3 weeks after inoculation (Table 3, Figs 2 and 3, S3–S6 Tables).

In all groups [Cl<sup>-</sup>] ranged from 94 to 111 mmol/L, and [Na<sup>+</sup>] from 134 to 150 mmol/L throughout the study (S7 Table). Besides these fluctuating concentrations significantly higher [Cl<sup>-</sup>] were present in all NTM-challenged animals within the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi (S7 Table). Simultaneously [Na<sup>+</sup>] tended to be higher compared to controls (S7 Table).

### Changes in acid-base equilibrium associated with MAH inoculation

By the end of inoculation, during 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi, all MAH-challenged animals showed significantly lower [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)], [BE], [BE<sub>Ecf</sub>], SIG<sub>TP</sub>, and significantly higher AG values, (but normal blood pH) compared to group MAP and controls (Tables 2 and 3, Figs 2 and 3, S6 and S8 Tables). While clinical signs in sub-group MAH 1 and MAH 2 were already present (S2 Table) during this time, no significant differences in acid-base variables, electrolytes, and metabolites were obvious. Only concentrations of beta 2 globulin in MAH 2 were significantly higher than in MAH 1 (S9 Table).

From the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi to the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi median [Gamma glob] significantly increased to 320% (sub-group MAH 2) and 422% (sub-group MAH 1). Simultaneously, median [Alb] significantly decreased to 87% (sub-group MAH 2) and 80% (sub-group MAH 1) (S5, S6 and S10 Tables). In sub-group MAH 1, this decrease in [Alb] was not significant. Thereby in both MAH sub-groups, changes in [Gamma glob] and [Alb] balanced out to [TP] values that were comparable to values in controls, and no differences within the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi in SIG<sub>TP</sub> values compared to the other groups were observed (S6 Table). Regarding [Alb] also A<sub>tot</sub> Al<sub>b</sub>

Table 2. Calculated anion gap and strong ion gap calculated on basis of albumin (SIG<sub>Alb</sub>) assessed in venous blood.

wpi	group	n	AG mEq/L		SIG <sub>Alb</sub> mEq/L	
			median (min/max)		median (min/max)	
1–3	CG	25	13.3 (8.9/16.5)	a	-0.78 (-5.20/2.93)	c
	MAP	48	14.4 (10.7/17.1)	a	-2.45 (-5.49/0.15)	b
	MAH 2	9	15.9 (14.8/18.8)	b	-3.45 (-6.90/-0.90)	a
	MAH 1	9	15.3 (13.3/17.1)	b	-2.50 (-6.20/-1.50)	ab
4–7	CG	25	13.6 (11.1/19.8)	n.s.	0.21 (-4.63/4.88)	b
	MAP	48	13.55 (9.7/18.5)		0.86 (-2.50/4.54)	b
	MAH 2	9	14.6 (12.4/18.5)		-2.80 (-5.30/-0.50)	a
	MAH 1	8	13.9 (9.6/15.1)		-2.95 (-7.20/-1.80)	a
8–11	CG	25	16.5 (10.9/18.6)	b	-0.10 (-4.28/4.50)	b
	MAP	47	15.3 (7.2/19.8)	bc	0.30 (-3.50/7.20)	b
	MAH 2	9	16.9 (14.1/18.8)	bc	-2.50 (-7.70/-0.90)	a
	MAH 1	6	7.8 (6.8/13.8)	a	-3.90 (-10.40/-1.20)	a
12–15	CG	25	16.5 (13.6/21.9)	a	-0.50 (-6.00/3.43)	b
	MAP	47	18.4 (9.6/23.2)	ab	-1.70 (-8.90/4.51)	b
	MAH 2	9	20.0 (17.1/21.1)	b	-4.10 (-6.40/-2.4)	a
16–19	CG	25	15.9 (13.4/21.8)	a	0.40 (-7.70/2.52)	b
	MAP	35	16.2 (12.7/21.6)	a	-1.22 (-6.90/2.78)	b
	MAH 2	9	19.0 (16.6/21.3)	b	-3.90 (-5.40/-1.20)	a
20–23	CG	23	16.6 (11.1/21.1)	n.s.	0.16 (-6.80/4.60)	n.s.
	MAP	34	15.9 (13.3/19.8)		-1.21 (-5.60/4.70)	
	MAH 2	9	18.4 (8.6/20.1)		-2.30 (-4.50/8.30)	
24–27	CG	23	16.4 (14.1/18.5)	n.s.	0.24 (-2.76/4.50)	n.s.
	MAP	34	15.9 (13.4/18.4)		-0.30 (-2.80/3.30)	
	MAH 2	9	16.4 (13.1/18.8)		0.20 (-2.70/2.80)	
28–31	CG	20	15.0 (12.9/16.7)		1.26 (-0.71/5.70)	
	MAP	23	15.8 (13.7/18.8)		-0.20 (-3.11/3.40)	
	MAH 2	9	14.8 (12.7/16.9)		1.90 (0.90/3.40)	
32–35	CG	20	15.6 (12.4/17.1)		0.80 (-1.64/4.40)	
	MAP	23	15.7 (12.8/17.3)		0.56 (-2.49/3.60)	
	MAH 2	9	15.5 (14.1/16.7)		1.80 (0.10/4.00)	
36–39	CG	15	15.2 (12.9/17.0)		0.78 (-2.97/2.90)	
	MAP	18	15.5 (13.9/17.8)		-0.52 (-2.73/3.00)	
	MAH 2	9	14.4 (13.5/15.7)		2.10 (-0.30/2.50)	
40–43	CG	17	15.4 (13.3/18.4)		0.97 (-2.70/2.98)	
	MAP	17	15.7 (14.6/18.2)		-0.74 (-4.50/1.57)	
	MAH 2	9	17.4 (16.2/18.6)		-0.80 (-2.70/1.20)	
44–47	CG	17	15.4 (12.9/19.0)		1.40 (-3.20/3.45)	
	MAP	17	16.3 (13.7/17.7)		-0.50 (-3.60/2.64)	
	MAH 2	9	16.6 (15.1/18.9)		-0.10 (-3.00/2.10)	
48–51	CG	17	16.0 (14.3/19.4)		-0.40 (-2.51/3.70)	
	MAP	18	15.5 (12.6/17.8)		0.55 (-2.90/2.96)	
	MAH 2	8	16.5 (14.9/18.3)		-0.35 (-1.90/4.20)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

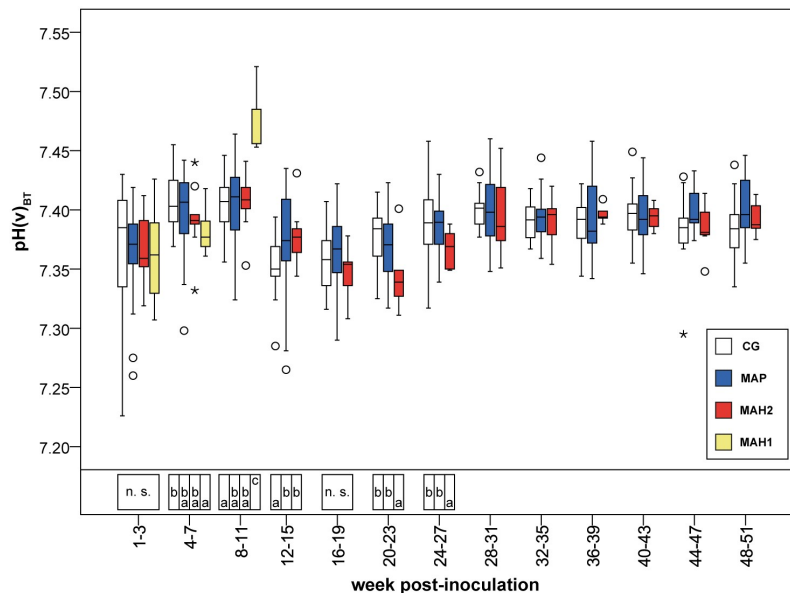
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.t002>

Table 3. Concentration of calculated bicarbonate and measured partial CO<sub>2</sub> pressure (corrected for body temperature) assessed in venous blood.

wpi	group	n	pCO <sub>2(V)BT</sub> kPa		[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] mmol/L	
			median (min/max)		median (min/max)	
1–3	CG	25	7.31 (6.30/10.70)	bc	30.54 (27.01/32.26)	b
	MAP	48	7.32 (6.33/10.10)	c	30.47 (26.98/33.81)	b
	MAH 2	9	6.86 (6.23/7.74)	ab	27.75 (26.96/29.48)	a
	MAH 1	9	6.70 (6.26/8.52)	a	28.08 (24.90/30.18)	a
4–7	CG	25	6.67 (5.63/7.50)	n.s.	29.35 (26.32/33.38)	b
	MAP	48	6.68 (5.88/9.90)		29.63 (23.64/35.68)	ab
	MAH 2	9	6.67 (5.95/8.03)		29.82 (25.40/31.42)	ab
	MAH 1	8	6.41 (5.86/7.64)		26.94 (23.56/33.22)	a
8–11	CG	25	6.49 (5.72/7.32)	c	28.37 (25.46/31.83)	n.s.
	MAP	47	6.43 (5.25/7.74)	bc	28.58 (24.46/34.54)	
	MAH 2	9	5.99 (5.81/6.93)	abc	26.40 (23.51/31.48)	
	MAH 1	6	5.52 (4.44/5.86)	a	26.26 (25.29/31.27)	
12–15	CG	25	6.42 (5.89/7.10)	b	25.34 (22.05/28.78)	a
	MAP	47	6.43 (5.59/7.51)	b	26.47 (21.51/31.77)	b
	MAH 2	9	5.94 (5.19/6.76)	a	24.87 (21.55/28.75)	ab
16–19	CG	25	6.43 (5.67/6.91)	n.s.	25.87 (21.52/29.61)	ab
	MAP	35	6.46 (5.55/7.52)		25.71 (22.14/31.40)	b
	MAH 2	9	6.12 (5.82/6.66)		23.67 (23.29/25.19)	a
20–23	CG	23	6.47 (5.49/7.03)	ab	27.42 (21.39/29.52)	b
	MAP	34	6.54 (5.64/7.52)	b	26.98 (21.50/31.00)	b
	MAH 2	9	6.24 (5.79/6.88)	a	23.20 (21.09/27.57)	a
24–27	CG	23	6.35 (5.48/7.18)	a	27.45 (21.17/31.09)	ab
	MAP	34	6.63 (5.73/7.46)	b	28.12 (25.32/31.10)	b
	MAH 2	9	6.61 (5.79/7.14)	ab	26.54 (24.71/28.90)	a
28–31	CG	20	6.62 (5.95/7.25)		28.89 (26.41/32.57)	
	MAP	23	6.63 (5.69/7.49)		29.16 (25.42/33.45)	
	MAH 2	9	6.42 (5.72/7.45)		28.43 (23.31/32.44)	
32–35	CG	20	6.65 (6.07/7.07)		28.01 (26.15/31.03)	
	MAP	23	6.68 (5.83/7.33)		29.23 (25.29/31.05)	
	MAH 2	9	6.55 (6.02/7.86)		28.62 (26.35/31.02)	
36–39	CG	15	6.64 (5.94/7.15)		28.50 (26.24/32.96)	
	MAP	18	6.62 (5.92/7.17)		28.32 (24.39/30.78)	
	MAH 2	5	6.63 (6.43/6.92)		29.64 (27.44/29.95)	
40–43	CG	17	6.61 (6.03/7.01)		28.45 (26.19/31.33)	
	MAP	17	6.62 (6.05/7.07)		29.07 (25.23/30.31)	
	MAH 2	9	6.21 (5.83/6.84)		27.19 (25.81/29.09)	
44–47	CG	17	6.63 (5.92/8.31)		28.34 (25.74/31.03)	
	MAP	17	6.55 (5.95/7.20)		29.13 (26.82/30.87)	
	MAH 2	9	6.49 (6.09/7.30)		27.26 (26.61/28.42)	
48–51	CG	17	6.75 (6.21/7.69)		28.47 (26.46/33.19)	
	MAP	18	6.55 (5.89/7.06)		28.49 (24.18/31.51)	
	MAH 2	8	6.20 (5.40/6.89)		27.69 (22.94/29.54)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. BT, body temperature (rectally measured before each blood collection). Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test, *P* < 0.05). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test, *P* < 0.05) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.t003>



**Fig 2. Measured pH values assessed in venous blood, corrected for actual body temperature.** CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. BT, body temperature (rectally measured before each blood collection). Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

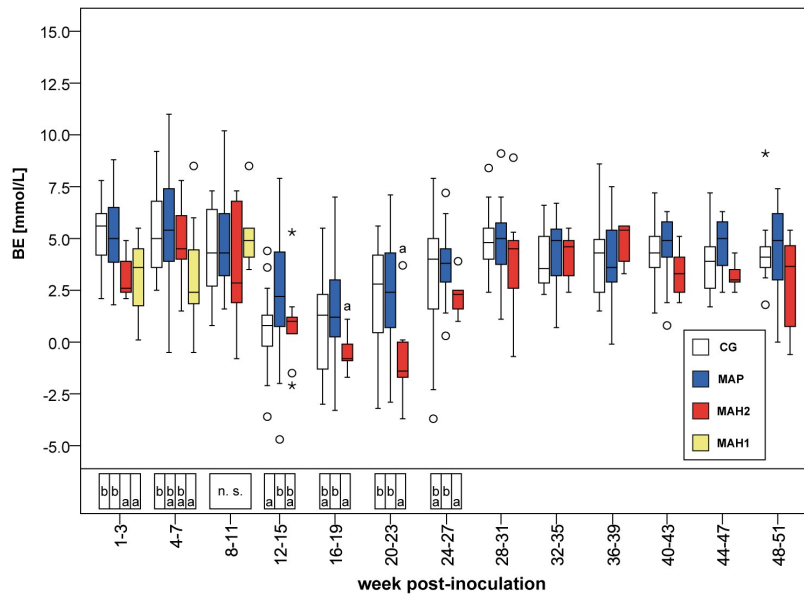
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.g002>

decreased significantly in all MAH-challenged goats (Fig 4, S6 Table). [Alb],  $A_{\text{tot Alb}}$ , and  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  remained significantly lower in both MAH sub-groups until the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi, compared to group MAP and controls (Table 2, Fig 4 and S6 Table).

Overall, these changes in protein pattern in MAH-exposed goats were reflected by a significant decrease of the albumin/globulin ratio from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi. This decrease to only 21.2% was significantly more pronounced in sub-group MAH 1 compared to sub-group MAH 2 (to 56.5%) (Table 4, S5 and S10 Tables).

**The manifestation of an acute severe form.** The observed increase of [Gamma glob] from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi in goats inoculated with MAH was significantly higher in sub-group MAH 1 compared to sub-group MAH 2 (S6 Table). From the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi  $[\text{HCO}_3^-]$  and [BE] or  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$  and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$ , respectively, decreased in sub-group MAH 1 (Table 3, Fig 3, and S8 Table). Simultaneously  $\text{SID}_{\text{m3}}$ ,  $\text{SID}_{\text{m4}}$ , and  $\text{SID}_{\text{m5}}$  decreased by about 5–6% in sub-group MAH 1, leading to significantly lower SID-concentrations compared to all other groups (Table 5, Fig 5). Despite that,  $[\text{Cl}^-]$  median values in sub-group MAH 1 increased from 105 mmol/L to 107 mmol/L, while no difference in  $[\text{Na}^+]$  was obvious between all groups (S7 Table).  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  and  $\text{pH}(\text{v})_{\text{BT}}$  did not change significantly (Table 3, Fig 2). The decreases in  $[\text{HCO}_3^-]$ , [BE],  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$ , and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$  as well as in  $\text{SID}_{\text{m3}}$ ,  $\text{SID}_{\text{m4}}$ , and  $\text{SID}_{\text{m5}}$  were not statistically significant (S10 Table).

**Failure of homeostasis in sub-group MAH 1.** From the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi the acute severe form of MAH-infection proceeded and all animals of sub-group MAH 1 died or

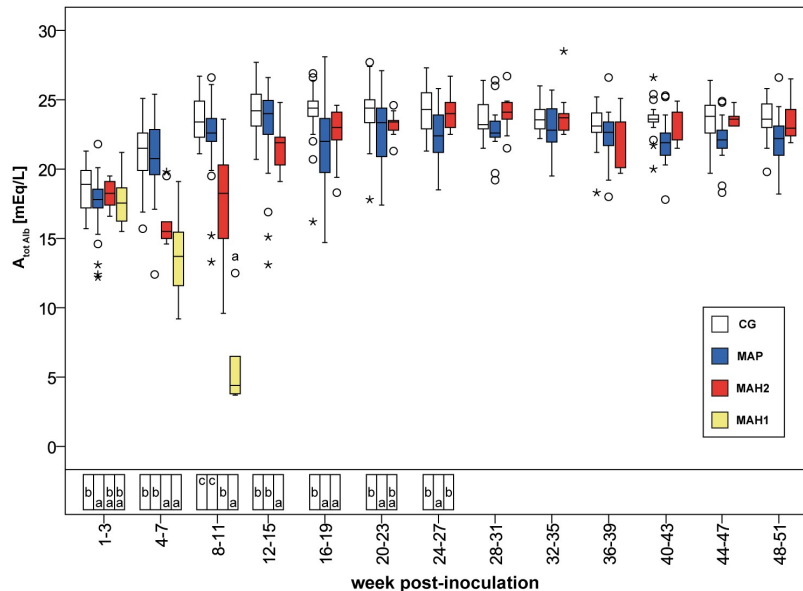


**Fig 3. Calculated concentrations of base excess assessed in venous blood.** CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.g003>

needed to be euthanized (Fig 1). Thereby in MAH 1, blood pH increased significantly (Fig 2, S10 Table) while [TP], [Alb],  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$ , AG,  $[\text{Na}^+]$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]$ , [Gluc] decreased significantly (Fig 4, Tables 2 and 4, S2, S6, S7 and S10 Tables). Besides these changes, no significant differences were observed within the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi in  $[\text{HCO}_3^-]$  and [BE] or  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$ , and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$ , respectively, comparing sub-group MAH 1 to the other groups (Table 3, Fig 3, S8 Table). Median values of [Alb] decreased by 61.4% to 30.8% of median values measured within 3 weeks after inoculation. [Gamma glob] decreased by 35% and [TP] by 45.2% (S6 Table). Consequently, also median values of  $A_{\text{tot Alb}}$  and  $A_{\text{tot TP}}$  decreased (Table 4, Fig 4). Within 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi significantly lower [Gluc] median values of 2.9 mmol/L, as well as significantly lower [TP] and [Alb] compared to all other groups were measured (S2 and S6 Tables). Thereby, the lowest individually measured [TP] of 28.0 g/dL and [Alb] of 6.0 g/dL within this study were noted (S6 Table). Median values of  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  significantly decreased in both MAH sub-groups from the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi (S5 and S10 Tables). In sub-group MAH 1  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  decreased by 14% and in sub-group MAH 2  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  by 10% (Table 3). While  $[\text{Cl}^-]$  did not change, significant decrease in  $[\text{Na}^+]$  median values by about 4.2% to 138 mmol/L and  $[\text{Ca}^{2+}]$  median values by about 18.5% to 1.06 mmol/L (S7 Table) led to a drop in  $\text{SID}_{\text{m}3}$ ,  $\text{SID}_{\text{m}4}$ , and  $\text{SID}_{\text{m}5}$ . Consequently, significantly lower median values of 37.6 mEq/L  $\text{SID}_{\text{m}3}$ , 36.7 mEq/L  $\text{SID}_{\text{m}4}$ , and 37.7 mEq/L  $\text{SID}_{\text{m}5}$  in sub-group MAH 1 compared to all other groups were observed (Table 5, Fig 5).

**Recovery of sub-group MAH 2.** From the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi to the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi,  $[\text{HCO}_3^-]$ , [BE], and  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  as well as  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$ , and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$  increased in sub-group MAH 2 to values



**Fig 4. Calculated acid total based on albumin in mEq/L assessed in venous blood.** CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.g004>

similar to group MAP and to control group (Table 3, Fig 3, S8 Table). From the 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi median values of [Alb] increased by 20.3% and [Gamma glob] median values increased significantly by 55.2% in sub-group MAH 2 (S5 and S6 Tables). Consequently,  $A_{tAlb}$  also increased. Thereby, observed median values of [Alb] (30.2 g/dL) were significantly lower while median values of [Gamma glob] (19.4 g/dL) were significantly higher compared to group MAP and to control group. After the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi, [Alb] continued to increase in sub-group MAH 2, and [Gamma glob] decreased until values matched concentrations in MAP-inoculated goats from the 20<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> wpi onwards (S6 Table).

The mild acidosis observed in all groups after the increase of [TP] lasted 4 weeks longer until the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi in sub-group MAH 2, and significantly lower  $[HCO_3^-]$ , [BE],  $[HCO_3^-(st)]$ , and  $[BE_{Ecf}]$  were reached compared to group MAP and to control group (Table 3, Fig 3, and S8 Table).

### Changes in acid-base equilibrium associated with MAP inoculation

Throughout the study, [Alb] in goats exposed to MAP tended to be lower, and was occasionally significantly lower, compared to controls (S6 Table). Until 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> wpi [Gamma glob] and [TP] also tended to be lower and were occasionally significantly lower. From 20<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> wpi onwards, i.e. with the progression of the disease, [TP] and [Gamma glob] were higher compared to controls (S6 Table).



**Table 4. Albumin/Globulin ratio, acid total based on total protein ( $A_{\text{tot TP}}$ ) assessed in venous blood.**

wpi	group	n	Alb/Glob ratio		$A_{\text{tot TP}}$ mEq/L	
			median (min/max)		median (min/max)	
1–3	CG	25	1.48 (0.97/1.87)	n.s.	17.5 (15.5/19.9)	c
	MAP	48	1.52 (0.63/2.08)		16.5 (15.0/18.5)	a
	MAH 2	9	1.38 (1.11/1.66)		17.2 (16.6/18.0)	bc
	MAH 1	9	1.60 (1.19/1.79)		16.5 (14.4/18.2)	abc
4–7	CG	25	1.34 (0.78/1.76)	c	20.4 (16.1/25.0)	b
	MAP	48	1.54 (0.45/2.38)	d	19.3 (16.7/23.0)	a
	MAH 2	9	0.85 (0.58/1.39)	b	18.9 (17.8/22.4)	ab
	MAH 1	8	0.57 (0.37/0.87)	a	21.0 (15.8/26.8)	ab
8–11	CG	25	1.41 (1.08/1.63)	c	22.3 (18.7/25.1)	ab
	MAP	47	1.48 (0.39/1.98)	c	21.1 (18.0/26.3)	c
	MAH 2	9	0.78 (0.56/1.39)	b	22.4 (18.6/24.6)	bc
	MAH 1	6	0.34 (0.24/0.45)	a	11.5 (9.6/23.4)	a
12–15	CG	25	1.40 (1.05/1.72)	b	22.8 (19.5/26.3)	b
	MAP	47	1.41 (0.62/1.99)	b	22.0 (17.0/25.1)	a
	MAH 2	9	1.07 (0.77/1.42)	a	23.2 (21.6/25.4)	ab
16–19	CG	25	1.41 (0.84/1.72)	b	23.0 (19.5/26.0)	b
	MAP	35	1.28 (0.60/1.92)	a	22.2 (19.4/26.4)	a
	MAH 2	9	1.17 (0.74/1.47)	a	22.6 (21.5/25.6)	ab
20–23	CG	23	1.40 (0.89/1.67)	b	22.8 (20.5/25.1)	n.s.
	MAP	34	1.24 (0.78/1.75)	a	23.2 (19.5/24.9)	
	MAH 2	9	1.17 (0.92/1.43)	a	23.3 (21.0/26.2)	
24–27	CG	23	1.40 (1.22/1.66)	b	22.4 (20.8/25.9)	a
	MAP	34	1.21 (0.86/1.70)	a	22.7 (21.0/25.3)	a
	MAH 2	9	1.36 (0.92/1.47)	ab	24.0 (21.5/25.9)	b
28–31	CG	20	1.40 (1.25/1.62)		22.2 (20.2/24.6)	
	MAP	23	1.21 (0.84/1.67)		22.8 (20.6/24.2)	
	MAH 2	9	1.37 (0.94/1.45)		23.2 (22.0/26.7)	
32–35	CG	20	1.36 (1.12/1.63)		22.7 (21.4/24.7)	
	MAP	23	1.28 (0.84/1.73)		22.6 (21.3/24.3)	
	MAH 2	9	1.38 (0.89/1.46)		23.0 (21.6/26.8)	
36–39	CG	15	1.42 (1.03/1.53)		22.6 (17.3/23.5)	
	MAP	18	1.26 (0.78/1.57)		22.7 (21.0/24.0)	
	MAH 2	9	1.07 (1.03/1.37)		22.4 (21.0/24.9)	
40–43	CG	17	1.43 (1.26/1.78)		21.9 (19.8/24.0)	
	MAP	17	1.20 (0.67/1.43)		22.3 (20.8/27.9)	
	MAH 2	9	1.31 (0.98/1.49)		22.8 (21.5/24.0)	
44–47	CG	17	1.44 (1.22/1.65)		22.2 (19.8/23.8)	
	MAP	17	1.24 (0.67/1.51)		22.8 (20.6/25.8)	
	MAH 2	9	1.33 (1.04/1.53)		23.2 (21.3/25.0)	
48–51	CG	17	1.41 (1.16/1.67)		22.1 (19.7/25.2)	
	MAP	18	1.11 (0.69/1.44)		23.3 (21.1/26.4)	
	MAH 2	8	1.26 (0.78/1.49)		23.2 (21.8/27.7)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

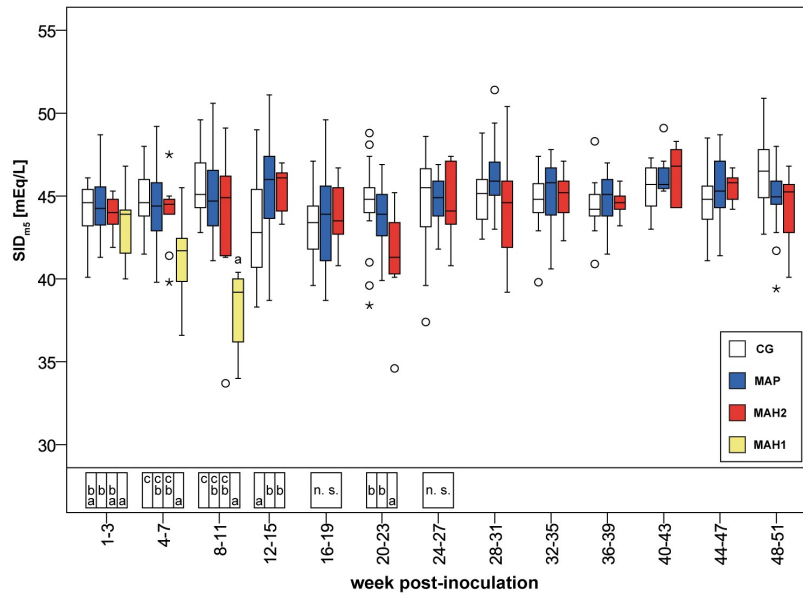
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.t004>

Table 5. Calculated strong ion difference based on 3 and 4 strong ions assessed in venous blood.

wpi	group	n	SID <sub>m3</sub> mEq/L		SID <sub>m4</sub> mEq/L	
			median (min/max)		median (min/max)	
1–3	CG	25	44.4 (39.3/46.9)	ab	43.2 (38.8/44.8)	ab
	MAP	48	44.6 (41.4/49.2)	b	42.9 (40.0/47.4)	b
	MAH 2	9	44.4 (42.2/45.8)	ab	42.9 (40.6/43.9)	ab
	MAH 1	9	43.3 (39.4/46.5)	a	42.5 (38.5/45.4)	a
4–7	CG	25	44.2 (41.0/48.4)	c	43.3 (40.2/46.8)	c
	MAP	48	43.8 (39.5/49.0)	bc	43.1 (38.5/47.9)	bc
	MAH 2	9	43.8 (39.0/48.5)	bc	43.4 (38.5/46.2)	bc
	MAH 1	8	40.7 (36.6/44.6)	a	40.2 (35.3/44.2)	a
8–11	CG	25	44.7 (42.0/49.6)	c	43.9 (41.4/48.4)	c
	MAP	47	44.5 (40.4/50.6)	bc	43.5 (39.8/49.3)	bc
	MAH 2	9	44.8 (40.6/48.5)	bc	43.8 (40.0/47.8)	bc
	MAH 1	6	37.6 (33.1/40.2)	a	36.7 (32.6/39.4)	a
12–15	CG	25	42.4 (37.3/48.6)	a	41.5 (36.9/47.8)	a
	MAP	47	45.3 (37.8/50.3)	b	44.6 (37.4/49.8)	b
	MAH 2	9	45.2 (42.5/46.2)	b	44.8 (42.0/45.6)	b
16–19	CG	25	42.4 (39.0/47.6)	n.s.	42.0 (38.4/45.9)	n.s.
	MAP	35	43.2 (37.8/48.7)		42.6 (37.4/48.3)	
	MAH 2	9	42.6 (39.9/45.9)		42.2 (39.5/45.4)	
20–23	CG	23	43.9 (37.6/47.8)	b	43.6 (37.1/47.5)	b
	MAP	34	43.2 (39.0/46.1)	b	42.6 (38.5/45.6)	b
	MAH 2	9	40.5 (33.7/44.7)	a	40.0 (33.2/43.9)	a
24–27	CG	23	44.8 (36.5/48.2)	n.s.	44.2 (36.1/47.4)	n.s.
	MAP	34	44.1 (41.3/46.1)		43.6 (40.5/45.6)	
	MAH 2	9	43.2 (39.9/47.3)		42.8 (39.5/46.1)	
28–31	CG	20	44.5 (41.4/48.1)		43.9 (41.1/47.5)	
	MAP	23	45.2 (42.1/50.6)		44.7 (41.7/50.1)	
	MAH 2	9	44.0 (38.3/49.7)		43.4 (37.9/49.3)	
32–35	CG	20	44.1 (38.9/46.8)		43.6 (38.6/46.2)	
	MAP	23	45.0 (39.8/47.0)		44.6 (39.3/46.6)	
	MAH 2	9	44.8 (41.4/46.7)		44.0 (41.0/45.8)	
36–39	CG	15	43.5 (40.0/47.6)		42.9 (39.7/47.1)	
	MAP	18	44.5 (40.7/46.8)		43.8 (40.2/45.8)	
	MAH 2	9	43.8 (42.4/45.1)		43.4 (42.0/44.7)	
40–43	CG	17	45.1 (42.3/46.8)		44.5 (41.8/46.1)	
	MAP	17	45.2 (44.7/48.5)		44.5 (44.1/47.9)	
	MAH 2	9	45.9 (43.5/47.5)		45.6 (43.1/47.1)	
44–47	CG	17	44.1 (40.2/47.6)		43.6 (39.8/47.2)	
	MAP	17	44.8 (41.4/47.8)		44.0 (40.2/47.5)	
	MAH 2	9	44.8 (43.4/47.5)		44.5 (43.0/45.5)	
48–51	CG	17	45.7 (41.7/49.9)		45.2 (41.3/49.6)	
	MAP	18	44.4 (38.3/47.7)		43.7 (38.1/46.7)	
	MAH 2	8	44.4 (39.7/45.8)		44.0 (39/45.5)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.t005>



**Fig 5. Calculated strong ion difference based on 5 measured strong ions assessed in venous blood.** CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892.g005>

By comparing group MAP with sub-group MAH 2, no significant differences in [Gamma glob] or [TP] were observed. Otherwise [Alb] tended to be lower and was occasionally significantly lower in group MAP, from the 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> wpi onwards. These changes were accompanied by a significantly lower albumin/globulin ratio (Table 4). Consequently,  $A_{\text{tot Alb}}$  tended to be lower while  $A_{\text{tot TP}}$  tended to be higher in MAP challenged goats compared to sub-group MAH 2 (Table 4, Fig 4).

## Discussion

This study provides essential information for (i) biomedical science using large animal models, (ii) comparative medicine concerning the host response to mycobacterial infections, (iii) translational medicine assessing pathophysiology of acute versus chronic bacterial infection, and (iv) veterinary medicine.

Two clinical outcomes after NTM-inoculation, a chronic and an acute form, both associated with changes in acid-base equilibrium, were the main findings of this study. Acute onset of disease after NTM-inoculation was characterized by significant deteriorations of acid-base variables as well as electrolytes and metabolites, altogether indicating a severe failure of homeostasis. Chronic and subclinical courses of NTM-infection, respectively, were associated with alterations in serum proteins and the strong ion variables related to albumin or total protein, (i.e.  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$ ,  $SIG_{\text{Alb}}$ , and  $SIG_{\text{TP}}$ ). Besides changes in the acid-base balance

associated with infection, physiological changes due to somatic growth and development of rumination could not be excluded and were valid for all groups. The latter had previously been evaluated in detail taking only the non-infected controls into account [21].

### The animal model

MAP or MAH were used for inoculation. MAP is the causative agent of Johne's disease, a chronic gastrointestinal disease in domestic and wild ruminants [23]. Johne's disease is characterized by a long clinically inapparent phase followed by diarrhea and wasting as main clinical signs [23]. MAH is a ubiquitous pathogen, mainly causing mild to subclinical infections in swine and humans, like children or immunosuppressed persons [24–27]. The susceptibility of goats to MAH-infection has recently been documented experimentally by this interdisciplinary working group [18, 20]. While the dosage used for MAP-inoculation was based on previous studies [17], there was no experience regarding the dosage to be used for MAH-inoculation. Based on the idea that ubiquitous bacteria would present lower pathogenicity compared to MAP, a relatively high cumulative dosage of MAH ( $2.13 \times 10^{10}$  cfu per goat; Table 1) was administered, and a subclinical to chronic course of disease in goats was assumed. The acute, severe form of illness that appeared in 50% of goats exposed to MAH, within the first few weeks after inoculation, was not expected. Nevertheless, severe MAH-infections with fever, diarrhea, emaciation, and gastro-intestinal granulomas leading to death or euthanasia have been reported occasionally in individual cats, dogs, and horses [28–30]. It is likely that the effects of inoculation dosage and infection pressure within the group contributed to the acute onset.

Although arterial blood-gas analysis is regarded as the gold standard in acid-base evaluation, central venous blood is also valuable to evaluate both metabolic and respiratory components of acid-base status [31, 32]. Following a previous study assessing acid-base status in young pigs [1], jugular venous blood samples were used in this study. The low number of animals within both MAH sub-groups and constantly declining numbers of animals within subgroup MAH 1 must be critically kept in mind during interpretation.

### General observed acid-base changes after NTM inoculation

Irrespective of clinical signs of infection, lower up to significantly lower [Alb], [Gamma glob] and [TP] were observed shortly after inoculation, and were interpreted as unspecific signs of inflammation. Reduced [Alb] levels in NTM-challenged goats were expected and can be linked to decreased formation due to the acute phase reaction [33]. Likewise, lower [Gamma glob] could be linked to early infection [33]. The acute phase response is induced by pro-inflammatory cytokines (interleukin 1, interleukin 6, TNF  $\alpha$ ) released by activated monocytes or after sustained tissue damage [34]. Previously a positive association between SIG and concentrations of inflammatory cytokines was demonstrated [35]. In accordance with these findings significantly more negative SIG<sub>Alb</sub>, SIG<sub>TP</sub>, and significantly higher AG values were observed in all NTM-inoculated animals during early infection. SIG<sub>Alb</sub> remained significantly more negative during the clinically critical time in MAH-exposed animals, indicating ongoing inflammation and tissue damage. Increased levels of the pro-inflammatory cytokine IFN $\gamma$  (interferon-gamma) in blood serum of MAH-exposed goats support this postulated association between SIG and the level of inflammation (S1 Fig). Overall, the impact of acute phase reaction and inflammation processes on acid-base homeostasis appears unspecific and does not allow conclusions about localization or origin.

### Inter-individual differences in host-pathogen interaction, leading to an acute form of NTM-infection

The different clinical outcomes of MAH-exposure in a homogenous group of animals (same breed, age, farm of origin, and randomized allocation to groups) indicated inter-individual differences regarding the host pathogen-immune interaction. An inter-individual variation in host immune response to mycobacteria is known from human and bovine tuberculosis [18]. The histopathological examination of all MAH-exposed goats revealed similarities with human and bovine tuberculosis [18, 20].

In goats with the acute severe form of illness histopathologic examination demonstrated an exuberant inflammatory response and associated severe tissue damage [20]. Furthermore, 6 goats showed signs consistent with multi-organ dysfunction syndrome (MODS) and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (i.e., multifocal, renal necrosis; multiple fibrin thrombi in the kidneys, the liver, and the lungs) [18]. Although biochemical parameters were not evaluated, clinical signs, histopathology, measured metabolites (significantly lower [Gluc], and [Alb]), and acid-base variables indicated sepsis before death or euthanasia. Sepsis is defined as a dysregulated systemic inflammatory and immune response to bacterial infection leading to life-threatening organ dysfunctions [36, 37].

Overall, the results of histopathologic examination [18, 20] and the significant increases in gamma globulins [33] indicated a greater host-pathogen immune interaction in the acute form of NTM-infection.

### Changes in the acid-base balance associated with an acute form of NTM-infection

After inoculation, hypocapnia and significantly lower  $[\text{HCO}_3^-]$  and  $[\text{BE}]$ , or  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$  and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$ , respectively, were observed within both MAH sub-groups compared to group MAP and to control group. The loss of  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  was most likely induced by hyperventilation caused by fever reactions observed in most of the MAH-inoculated goats. Since blood  $\text{pH}(\text{v})_{\text{BT}}$  was not affected, those changes were fully compensated. Despite the clinical presence of diarrhea in some goats inoculated with NTM, elevated blood  $[\text{Cl}^-]$  and  $[\text{Na}^+]$  as well as normal hematocrit excluded any diarrhea-induced acidotic burden on the group level. Consequently, traditional acid-base variables were consistent with compensated respiratory alkalosis. Applying the strong ion approach, normal SID values, and lower  $A_{\text{tot}}$  values also indicated a compensated primary respiratory disorder.

Although blood  $\text{pH}(\text{v})_{\text{BT}}$  was significantly lowered in acute severely ill goats 4<sup>th</sup>-7<sup>th</sup> wpi, the animals were still able to maintain it within the physiological range. Traditional variables, i.e., significantly lower  $[\text{HCO}_3^-]$ ,  $[\text{HCO}_3^-(\text{st})]$ ,  $[\text{BE}]$ , and  $[\text{BE}_{\text{Ecf}}]$  as well as normal  $\text{pCO}_2(\text{v})_{\text{BT}}$  compared to controls, revealed a metabolic acidotic burden, with no conclusion about origin [5]. This is in good agreement with results found in man, associating low serum bicarbonate with higher mortality, independent of systemic  $\text{pH}(\text{v})_{\text{BT}}$  values [38], and the known correlation between a lower  $[\text{BE}]$  and worse outcome in critical illness [39, 40]. The strong ion variables indicated a SID acidosis or a SIG acidosis, respectively, balanced out by an  $A_{\text{tot}}$  alkalosis. Significantly lower SID revealed changes in electrolytes as causal factors for the metabolic acidotic burden (regardless of the number of electrolytes incorporated in the calculation) [3]. This seemed to be a cumulative effect, as it was not expected when looked at electrolytes separately. Decreasing albumin levels led to an  $A_{\text{tot}}$  alkalosis [41, 42]. According to the strong ion approach, a decrease in plasma SID can be caused by intestinal loss of cations due to diarrhea [6], and some diarrhea was observed in acutely ill goats. Furthermore, it is proposed that low SID correlates with hypoalbuminemia to maintain electro-neutrality and acid-base

equilibrium [43]. Whether declining albumin levels contributed to lower SID values could not be determined.

Recent investigations have demonstrated that interactions do exist between acid-base disorders and the underlying inflammation process in critical illness [44–49]. Therefore it is proposed that acidosis alters the release of inflammatory mediators, plays a role in the progression of an illness, and the pathogenesis of sepsis [50]. This agrees with the course of the constantly proceeding acute, severe form of NTM-infection, leading to failure of acid-base homeostasis, and assumed sepsis during 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi. During sepsis, a variety of related acid-base disorders are known: primary respiratory alkalosis, various forms of primary metabolic acidosis, complex acid-base disorders, the appearance of unexplained anions, and lactate acidosis [36, 51, 52]. In the present study, traditional parameters like hypocapnia, unaffected bicarbonate, and base excess indicated an acute respiratory alkalosis during 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi [5]. Thereby, traditional variables failed to reveal the complexity of the acid-base disorders present. The strong ion variables revealed a SID acidosis, and a SIG<sub>Alb</sub> acidosis overwhelmed by a massive A<sub>tot</sub> alkalosis (A<sub>tot Alb</sub> as well as A<sub>tot TP</sub>) beside a mild respiratory alkalosis. This is supported by findings demonstrating severe acid-base disturbances despite presenting normal BE in every sixth patient hospitalized at Intensive Care Units [11]. As the BE only shows a cumulative acid or base load, mixed acid-base disturbance may balance out [6, 10, 11]. The fact that [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] was not affected during this complex acid-base disorders confirms that bicarbonate cannot be regarded as an independent variable for the metabolic component [4, 5]. Significantly lower SID<sub>m3</sub>, SID<sub>m4</sub>, and SID<sub>m5</sub> values were mainly caused by dramatically low [Na<sup>+</sup>] and [Ca<sup>2+</sup>]. This may have been caused by gastrointestinal and renal loss of electrolytes and loss of sodium via effusions [53–55]. Histopathologic examination in acutely ill goats showed massive renal and gastrointestinal defects, thoracic and abdominal effusions [18, 20]. Furthermore, assumed sepsis in acutely ill goats may have contributed to low SID values. It is known that inflammatory cytokines induce a lower parathyroid hormone (PTH) secretion as well as a PTH resistance in kidneys and bones during sepsis [56]. Albumin is a weak acid [11, 41, 42], and the dramatic drop in all protein concentrations in all severely ill goats before death or euthanasia caused a massive alkalinizing effect. Hypoalbuminemia is a well-known complication in critical illness that is associated with a poor outcome in humans [57–59]. Hypoalbuminemia may have been caused by reduced production within the liver [33], due to acute-phase reaction [34], or may have been associated with liver failure that was indicated by histological examination [18]. Furthermore, a loss of albumin via kidneys or the gastrointestinal tract, gastrointestinal malabsorption, as well as reduced feed intake [33] due to apathy, may have worsened hypoproteinemia.

### Chronic NTM-infection and associated acid-base changes

Nine MAH-inoculated goats and all animals exposed to MAP evolved a chronic form of infection. With ongoing chronicity of infection (20<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> wpi onwards), SIG values decreased indicating a lower intensity of inflammation [35]. Simultaneously, significantly higher [Gamma glob] in blood indicated stimulation of antibody production [33]. Despite similarities in SIG and [Gamma glob], [Alb] developed differently in goats with chronic NTM-infection over time: [Alb] in sub-group MAH 2 tended to reach the level of controls while concentrations of albumin remained low in goats exposed to MAP until the end of the study. On the one hand, this may underline ongoing recovery in sub-group MAH 2. On the other hand, this possibly shows the progression of disease in group MAP. These differences were only reflected in strong ion variables A<sub>tot Alb</sub> and A<sub>tot TP</sub>, without any effect on other acid-base variables.

### Methodological aspects

The strong ion variables  $A_{\text{tot}}$  and SIG are not only species-specific [4, 12] but also highly dependent on serum protein pattern as both values can be calculated based on either albumin or total protein [4]. In all animals exposed to MAH,  $\text{SIG}_{\text{TP}}$  and  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  values developed reversely in parallel to a constantly declining albumin/globulin ratio. Both  $\text{SIG}_{\text{TP}}$ , as well as AG, were not able to detect unmeasured anions correctly in MAH exposed goats during hypoalbuminemia. Hypoalbuminemia is known to cause inaccuracies in AG [60, 61]. Furthermore,  $A_{\text{tot TP}}$  only changed at the time when homeostasis in sub-group MAH 1 failed, while significantly lower  $A_{\text{tot Alb}}$  was already obvious 4 weeks before. Therefore, under conditions of variable albumin/globulin ratios (especially during infection), SIG and  $A_{\text{tot}}$  should be calculated on basis of albumin as well as on basis of total protein and should be interpreted together. Moreover, in critical illness,  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  might be preferably used instead of  $\text{SIG}_{\text{TP}}$ , as albumin carries the main base-binding capacity of the non-volatile weak acids [62].

The correct determination of SID is dependent on precise electrolyte measurement, and values differ depending on measuring methods and instruments [4, 63]. The effect of hypoalbuminemia and acid-base disturbances on ionization of electrolytes, and consequently on correct measurements, is still unclear. Regarding ionized  $\text{Ca}^{2+}$ , concentrations are mainly dependent on albumin concentration and blood pH [54, 64]. Lower  $[\text{Ca}^{2+}]$  in sub-group MAH 1 during failure of homeostasis could therefore partly be due to the measuring procedure. It is known that alkalosis is associated with hypopotassemia and hyperchloremia [54, 65]. Despite that, no difference in  $[\text{Cl}^-]$  or  $[\text{K}^+]$  in sub-group MAH 1 during the critically ill phase, and alkalemia were obvious. For correct interpretation of SID during critical illness, further research is needed to better identify the effects of hypoproteinemia and pH changes on measurements of electrolytes.

SID values showed high potentials in early detection of a derailment of acid-base equilibrium. Overall, SID can be calculated easily based on measured electrolytes and seems a readily available tool.

### Conclusions

This study provides new essential information about the long-term processes of NTM-infections, and the resulting consequences on acid-base equilibrium.

There is strong evidence for an association between SIG and the level of inflammation during bacterial infection. SIG seems a promising additional parameter to detect inflammation, making further research on this topic worthwhile.

Acute NTM-infection led to substantial imbalances in homeostasis, accompanied by massive hypoalbuminemia, significantly lower  $A_{\text{tot}}$  and SID values, hypocapnia, alkalosis, and signs of SIRS or MODS, respectively, consistent with sepsis. Significantly decreased SID, base excess, and bicarbonate were observed before the derailment of homeostasis in acute NTM-infection.

Chronic NTM-infection was dominated by alterations of blood protein profiles, mainly characterized by low concentrations of Albumin, higher gamma globulin, and thereby lower  $A_{\text{tot Alb}}$ .

The present results demonstrate that the effects of acute and chronic bacterial infection and critical illness on acid-base equilibrium can only be understood by considering the strong ion variables.

## Supporting information

**S1 Fig. Levels of the pro-inflammatory cytokine IFN $\gamma$  (interferon-gamma) assessed in blood serum of goats.** CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 2, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with chronic form of infection.  
(TIF)

**S1 Table. Feeding regime.**  
(PDF)

**S2 Table. Concentrations of  $L$ -Lactate, glucose, inorganic phosphate in mmol/L assessed in venous blood and rectally measured body temperature.** wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney  $U$ -test,  $P < 0.05$ ). n. s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney  $U$ -test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.  
(PDF)

**S3 Table. P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to controls (CG) from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).** Additional information to S3 Table: P-values  $> 0.05$  were considered not significant.  
(PDF)

**S4 Table. P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to group MAP from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).** Additional information to S4 Table: P-values  $> 0.05$  were considered not significant.  
(PDF)

**S5 Table. P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to sub-group MAH 2 from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).** Additional information to S5 Table: P-values  $> 0.05$  were considered not significant.  
(PDF)

**S6 Table. Concentrations of total protein, albumin, gamma globulin in g/dL, and strong ion gap calculated on basis of total protein (SIG<sub>TP</sub>) in mEq/L assessed in venous blood.** wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney  $U$ -test,  $P < 0.05$ ). n. s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney  $U$ -test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables.  
(PDF)

**S7 Table. Concentrations of sodium, chloride, potassium, and calcium in mmol/L assessed in venous blood.** wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with



*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Significant differences  $P < 0.05$  calculated via Mann-Whitney *U*-test, a: CG/MAP, b: CG/MAH 2, c: CG/MAH 1, d: MAP/MAH 2, e: MAP/MAH 1, f: MAH 1/MAH 2. Significant differences  $P < 0.05$  calculated via Friedman test from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi, <sup>1</sup>: within group CG, <sup>2</sup>: within group MAP, <sup>3</sup>: within sub-group MAH 2, <sup>4</sup>: from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi within sub-group MAH 1. Detailed P-values are given in S3–S5 and S10 Tables. (PDF)

**S8 Table. Concentrations of standard bicarbonate and standard base excess in mmol/L and hematocrit assessed in venous blood.** wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables. (PDF)

**S9 Table. Concentrations of beta 1, beta 2, alpha 1, and alpha 2 globulin in g/dL assessed in venous blood.** wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3–S5, and S10 Tables. (PDF)

**S10 Table. P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to sub-group MAH 1 from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).** Additional information to S10 Table: P-values  $> 0.05$  were considered not significant. (PDF)

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dr. Marcus G. Doherr, Ph.D., Dipl. ECVPH (Germany) and Mag. phil. Dr. rer. nat. Alexander Tichy (Austria) for their help and statistical advice. Also, the authors are very grateful to Annelie Langenberg, Sylke Stahlberg, Ines Lemser, and all colleagues of the technical staff of the animal house (FLI, Jena, Germany) for their excellent assistance while performing the study. Besides, they are thankful to Antje Willing and Eva Radtke (specialized veterinarians for laboratory diagnostic in the Institute of Veterinary Diagnostics, Berlin-Lankwitz, Germany) for analyzing concentrations of total protein and inorganic phosphate as well as performing capillary electrophoresis in serum samples.

Preliminary results were presented as an abstract and an oral presentation at the conference of the section “Physiology and Biochemistry” of the German Veterinary Medical Society

(DVG), Berlin, 30<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> March 2016, and as an abstract and a poster at the conference of the section “Physiology and Biochemistry” of the German Veterinary Medical Society (DVG), Vienna, February 2018.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Stefanie Bassis, Heike Köhler, Petra Reinhold.

**Data curation:** Stefanie Bassis, Sina Fischer.

**Formal analysis:** Stefanie Bassis.

**Investigation:** Stefanie Bassis, Sina Fischer, Heike Köhler.

**Methodology:** Heike Köhler, Petra Reinhold.

**Project administration:** Heike Köhler, Petra Reinhold.

**Resources:** Petra Reinhold.

**Supervision:** Petra Reinhold.

**Validation:** Stefanie Bassis.

**Visualization:** Stefanie Bassis.

**Writing – original draft:** Stefanie Bassis.

**Writing – review & editing:** Heike Köhler, Petra Reinhold.

### References

1. Reinhold P, Hartmann H, Constable PD. Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Vet J*. 2010; 184(2):212–8. Epub 2009/03/17. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.02.005> PMID: 19286403.
2. Ostermann C, Linde S, Siegling-Vlitakis C, Reinhold P. Evaluation of pulmonary dysfunctions and acid-base imbalances induced by *Chlamydia psittaci* in a bovine model of respiratory infection. *Multidisciplinary Respiratory Medicine Journal*. 2014; 9(10).
3. Stewart PA. Modern quantitative acid–base chemistry. *Can J Physiol Pharmacol*. 1983; 61(12):1444–61. <https://doi.org/10.1139/y83-207>
4. Constable PD. A simplified strong ion model for acid-base equilibria: application to horse plasma. *J Appl Physiol*. 1997; 83:297–311. <https://doi.org/10.1152/jappl.1997.83.1.297> PMID: 9216976
5. Constable PD. Clinical assessment of acid-base status: Comparison of the Henderson-Hasselbalch and strong ion approaches. *Vet Clin Pathol*. 2000; 29(4):1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2000.tb00241.x> PMID: 12070822
6. Kellum JA. Determinants of blood pH in health and disease. *Critical Care*. 2000; 4(1):6. <https://doi.org/10.1186/cc644> PMID: 11094491
7. Putnam RW, Roos A. Which value for the first dissociation constant of carbonic acid should be used in biological work? *American Physiological Society*. 1991.
8. Austin WH, Lacombe E, Rand PW, Chatterjee M. Solubility of carbon dioxide in serum from 15 to 38 C. *J Appl Physiol*. 1963; 18(2):301–4. <https://doi.org/10.1152/jappl.1963.18.2.301> PMID: 13965591
9. Cullen GE, Keeler HR, Robinson HW. The pK' of the Henderson-Hasselbalch equation for hydrion concentration of serum. *J Biol Chem*. 1925; 66:301–22.
10. Fencel V, Leith DE. Stewart's quantitative acid-base chemistry: Applications in biology and medicine. *Respir Physiol*. 1993; 91(1):1–16. [http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687\(93\)90085-0](http://dx.doi.org/10.1016/0034-5687(93)90085-0).
11. Fencel V, Jabor A, Kazda A, Figge J. Diagnosis of metabolic acid-base disturbances in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(6):2246–51. Epub 2000/12/09. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.6.9904099> PMID: 11112147.
12. Constable PD, Hinchcliff KW, Muir WW. Comparison of anion gap and strong ion gap as predictors of unmeasured strong ion concentration in plasma and serum from horses. *Am J Vet Res*. 1998; 59:881–7. PMID: 9659556

13. Cameron JN. Acid-base homeostasis: past and present perspectives. *Physiol Zool.* 1989; 62(4):845–65.
14. Funk GC. Das Säure-Basen-Modell nach Stewart. *Wiener Klinische Wochenschrift.* 2007; 119(13–14):390–403. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0811-6>
15. Constable PD, Streeter RN, Koenig GJ, Perkins NR, Gohar HM, Morin DE. Determinants and Utility of the Anion Gap in Predicting Hyperlactatemia in Cattle. *J Vet Intern Med.* 1997; 11(2):71–9. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00076.x> PMID: 9127293
16. Kellum JA. Clinical review: reunification of acid-base physiology. *Crit Care.* 2005; 9(5):500–7. Epub 2005/11/10. <https://doi.org/10.1186/cc3789> PMID: 16277739.
17. Krüger C, Köhler H, Liebero-Tenorio EM. Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology Online First.* 2014; 1–15. <https://doi.org/10.1177/0300985814533804> PMID: 24829286
18. Schinköthe J, Möbius P, Köhler H, Liebler-Tenorio EM. Experimental Infection of Goats with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*: a Model for Comparative Tuberculosis Research. *J Comp Pathol.* 2016; 155(2–3):218–30. Epub 2016/07/19. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.06.008> PMID: 27426001.
19. Borrmann E, Möbius P, Diller R, Köhler H. Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of type II and III in a standardized in vitro model. *Vet Microbiol.* 2011; 152(1–2):101–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.002> PMID: 21555192
20. Schinköthe J, Köhler H, Liebler-Tenorio EM. Characterization of tuberculous granulomas in different stages of progression and associated tertiary lymphoid tissue in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 47:41–51. Epub 2016/08/02. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.006> PMID: 27477506.
21. Redlberger S, Fischer S, Köhler H, Diller R, Reinhold P. Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats. *The Veterinary Journal.* 2017; 229:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.017>. PMID: 29183573
22. Constable PD, Stämpfli HR, Navetát H, Berchtold J, Schelcher F. Use of a quantitative strong ion approach to determine the mechanism for acid–base abnormalities in sick calves with or without diarrhea. *J Vet Intern Med.* 2005; 19:581–9. PMID: 16095178
23. Clarke CJ. The Pathology and Pathogenesis of *Pratuberculosis* in Ruminants and Other Species. *J Comp Pathol.* 1997; 116:217–61. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80001-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80001-1)
24. Agdestein A, Olsen I, Jorgensen A, Djonne B, Johansen TB. Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health. *Vet Res.* 2014; 45(46). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-46> PMID: 24742183
25. Agdestein A, Johansen TB, Polaček V, Lium B, Holstad G, Vidanović D, et al. Investigation of an outbreak of mycobacteriosis in pigs. *BMC Vet Res.* 2011; 7(63):1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-63> PMID: 22014189
26. Bruijnesteijn van Coppenraet LES, de Haas P, Lindeboom JA, Kuijper EJ, Van Soelingen D. Lymphadenitis in children is caused by *Mycobacterium avium* *hominissuis* and not related to 'bird tuberculosis'. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27:293–9. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0440-z> PMID: 18320245
27. Johansen TB, Agdestein A, Lium B, Jorgensen A, Djonne B. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in Swine Associated with Peat Used for Bedding. *BioMed Research International.* 2014; 2014(189649). <https://doi.org/10.1155/2014/189649> PMID: 25431762
28. Haist V, Seehusen F, Moser I, Hotzel H, Deschl U, Baumgärtner W, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in 2 Pet Dogs, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(6):988–90. <https://doi.org/10.3201/eid1406.071463> PMID: 18507926
29. Klang A, Staffler C, Macherbauer C, Sperser J, Rütgen BC, Hinney B, et al. *Mycobacterium avium* sub-species *hominissuis* infection in a domestic European shorthair cat. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 2014; 101:74–8.
30. Kriz P, Jahn P, Bezdekova B, Blahutkova M, Mrlík V, Slana I, et al. *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in Horses. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(8):1328–9. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100097> PMID: 20678342
31. Day TK. Blood gas analysis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002; 32(5):1031–48. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(02\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(02)00035-9). PMID: 12380163
32. Wohl JS, Baggs A, Lin JL, Fink MP, Dhupa N. Use of jugular venous blood, compared with mixed venous blood, for measurement of venous oxygenation indices in a porcine model of endotoxic shock. *Am J Vet Res.* 1997; 58(8):910–4. PMID: 9256980.

33. Stogdale L. Correlation of Changes in Blood Chemistry with Pathological Changes in the Animal's Body: I Serum Nutrients and Proteins. *J S Afr Vet Assoc.* 1981; 52(1):57–63.
34. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004; 35(2):163–87. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004002> PMID: 15099494
35. Zampieri FG, Kellum JA, Park M, Ranzani OT, Barbeiro HV, de Souza HP, et al. Relationship between acid–base status and inflammation in the critically ill. *Critical Care.* 2014; 18(4):R154–R. <https://doi.org/10.1186/cc13993> PMID: 25034180
36. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent J-L. Sepsis and septic shock. 2016; 2:16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45> PMID: 28117397
37. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315(8):801–10. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287> PMID: 26903338
38. Raphael KL, Murphy RA, Shlipak MG, Satterfield S, Huston HK, Sebastian A, et al. Bicarbonate Concentration, Acid-Base Status, and Mortality in the Health, Aging, and Body Composition Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016; 11(2):308–16. <https://doi.org/10.2215/CJN.06200615> PMID: 26769766
39. Noritomi DT, Soriano FG, Kellum JA, Cappi SB, Biselli PJ, Liborio AB, et al. Metabolic acidosis in patients with severe sepsis and septic shock: a longitudinal quantitative study. *Crit Care Med.* 2009; 37(10):2733–9. Epub 2009/11/04. <https://doi.org/10.1097/ccm.0b013e3181a59165> PMID: 19885998.
40. Smith I, Kumar P, Molloy S, Rhodes A, Newman PJ, Grounds RM, et al. Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. *Intensive Care Med.* 2001; 27(1):74–83. <https://doi.org/10.1007/s001340051352> PMID: 11280677
41. McAuliffe JJ, Lind LJ, Leith DE, Fencel V. Hypoproteinemic alkalosis. *The American Journal of Medicine.* 1986; 81(1):86–90. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90187-7](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(86)90187-7). PMID: 3089010
42. Rossing TH, Maffeo N, Fencel V. Acid-base effects of altering plasma protein concentration in human blood in vitro. *J Appl Physiol.* 1986; 61(6):2260–5. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.6.2260> PMID: 3100499
43. Wilkes P. Hypoproteinemia, strong-ion difference, and acid-base status in critically ill patients. *J Appl Physiol.* 1998; 84(5):1740–8. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.5.1740> PMID: 9572825
44. Kellum JA, Song M, Li J. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2004; 286(4):R686–R92. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00564.2003> PMID: 14695114
45. Bellocq A, Suberville S, Philippe C, Bertrand F, Perez J, Fouqueray B, et al. Low Environmental pH Is Responsible for the Induction of Nitric-oxide Synthase in Macrophages: EVIDENCE FOR INVOLVEMENT OF NUCLEAR FACTOR- $\kappa$ B ACTIVATION. *J Biol Chem.* 1998; 273(9):5086–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5086>
46. Bidani A, Wang CZ, Saggi SJ, Heming TA. Evidence for pH Sensitivity of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Release by Alveolar Macrophages. *Lung.* 1998; 176(2):111–21. <https://doi.org/10.1007/pl00007593>
47. HEMING TA, DAVÉ SK, TUAZON DM, CHOPRA AK, PETERSON JW, BIDANI A. Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor- $\alpha$  production by resident alveolar macrophages. *Clin Sci.* 2001; 101(3):267–74. <https://doi.org/10.1042/cs1010267> PMID: 11524044
48. Miyazawa K, Inoue K. Complement activation induced by human C-reactive protein in mildly acidic conditions. *The Journal of Immunology.* 1990; 145(2):650–4. PMID: 2365997
49. Anne L. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(4):522–30.
50. Kellum JA, Song M, Li J. Science review: Extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Critical Care.* 2004; 8(5):331. <https://doi.org/10.1186/cc2900> PMID: 15469594
51. Elisaf M, Theodorou J, Pappas H, Siamopoulos KC. Acid-base and electrolyte abnormalities in febrile patients with bacteraemia. *The European journal of medicine.* 1993; 2(7):404–7. PMID: 8258028.
52. Kellum JA, Bellomo R, Kramer DJ, Pinsky MR. Hepatic anion flux during acute endotoxemia. *J Appl Physiol.* 1995; 78(6):2212–7. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.78.6.2212> PMID: 7665420.
53. Herdt TH, Sayegh AI. Digestion and Absorption: The Nonfermentative Processes. In: Klein BG, editor. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology.* 5th ed. Missouri: Elsevier; 2013. p. 297–319.
54. Stogdale L. Correlation of Changes in Blood Chemistry with Pathological Changes in the Animal's Body: II Electrolytes, Kidney Function Tests, Serum Enzymes, and Liver Function Tests. *J S Afr Vet Assoc.* 1981; 52(2):155–64.
55. Willard MD, Tvedten H. *Ergüsse und andere Flüssigkeitsansammlungen. Labordiagnostik in der Kleintierpraxis.* 1 ed. München: Elsevier; 2006. p. 305–10.

56. Eller K. Hypokalziämie und Hyperkalziämie: Ätiologie, Klinik, Diagnose und Therapie. *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel-Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014; 4(3):40–5.
57. Herrmann FR, Safran C, Levkoff SE, Minaker KL. Serum albumin level on admission as a predictor of death, length of stay, and readmission. *Arch Intern Med*. 1992; 152(1):125–30. Epub 1992/01/01. PMID: [1728907](#).
58. Vincent J-L, Dubois M-J, Navickis RJ, Wilkes MM. Hypoalbuminemia in Acute Illness: Is There a Rationale for Intervention?: A Meta-Analysis of Cohort Studies and Controlled Trials. *Ann Surg*. 2003; 237(3):319–34. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000055547.93484.87> PMID: [12616115](#)
59. ME M., Elke R, Rebecca K. The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2002; 12(2):113–24. <https://doi.org/10.1046/j.1435-6935.2002.00025.x>
60. Figge J, Jabor A, Kazda A, Fencel V. Anion gap and hypoalbuminemia. *Crit Care Med*. 1998; 26(11):1807–10. Epub 1998/11/21. <https://doi.org/10.1097/00003246-199811000-00019> PMID: [9824071](#).
61. Feldman M, Soni N, Dickson B. Influence of hypoalbuminemia or hyperalbuminemia on the serum anion gap. *J Lab Clin Med*. 2005; 146(6):317–20. <https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.07.008> PMID: [16310513](#)
62. van Slyke DD, Hastings AB, Hiller A, Sendroy J. Studies of gas and electrolyte equilibria in blood: XIV. the amount of alkali bound by serum albumin and globulin. *J Biol Chem*. 1928; 79:769–80.
63. Stämpfli HR, Schoster A, Constable PD. Clinical utility of serum biochemical variables for predicting acid–base balance in critically ill horses. *Vet Clin Pathol*. 2014; 43(4):547–56. <https://doi.org/10.1111/vcp.12200> PMID: [25219754](#)
64. Loken H, Havel R, Gordan G, Whittington S. Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum. *J Biol Chem*. 1960; 235(12):3654–8. PMID: [13763241](#)
65. Robinson NE. Acid-Base Homeostasis. In: Klein BG, editor. *Cunninghams Textbook of Veterinary Physiology*. 5th ed. Missouri: Elsevier; 2013. p. 549–58.

## 5 Diskussion

Für die korrekte Interpretation von Störungen im SBH sind Kenntnisse über physiologische ‚Normal‘-Werte und deren biologische Variabilität nötig. Altersabhängige Normwerte von SBH-Variablen für Ziegen lagen vor Beginn der eigenen Untersuchungen nicht vor.

In zwei longitudinalen Tierversuchsreihen (VERSUCHSREIHE I im Jahr 2011/2012 und VERSUCHREIHE II im Jahr 2013/2014) wurden der Einfluss von somatischem Wachstum bei gesunden Ziegen (STUDIE I) sowie der Einfluss einer nichttuberkulösen Mykobakterien Infektion bei Ziegen auf den SBH (STUDIE II) erhoben. Die Auswertungen umfassten sowohl die traditionellen Berechnungsmethoden als auch die dem „strong ion model“ entsprechenden SBH-Variablen nach Stewart und Constable. Das zuvor etablierte Großtiermodell ermöglichte die Standardisierung der äußeren Einflussfaktoren (Spezies, Rasse, physische Konstitution, Fütterungsregime, klimatische Umwelteinflüsse, Inokulationsmenge/Infektionsdruck) ebenso wie die der endogenen Einflüsse (Ausschluss anderer Infektionen, Endo- und Ektoparasiten, Kastration). Somit ergaben sich gute Voraussetzungen für die valide Erfassung der physiologischen Veränderungen im SBH beim Übergang vom Milchziegenlamm zum adulten Wiederkäuer sowie für die Abgrenzung zwischen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen im SBH (hier durch mykobakterielle Infektionen induziert).

Die Ergebnisse beider Studien lieferten erstmals longitudinale Informationen zum SBH von Ziegen über einen Zeitraum von 14 Monaten. Aus physiologischer Sicht konnten eindeutige Zusammenhänge mit Ernährungsphysiologie und somatischem Wachstum beim Wiederkäuer dokumentiert werden. Aus pathophysiologischer Sicht ergaben sich neue Erkenntnisse zu Veränderungen im SBH bei akuten und chronischen Verlaufsformen mykobakterieller Infektionen. Darüber hinaus zeigten sich unerwartete intraindividuelle Unterschiede in der Erreger-Wirt-Interaktion bei einer Mykobakterien Infektion. Aus klinischer Sicht unterstreichen die gewonnenen Ergebnisse die Notwendigkeit, das „strong ion model“ für eine korrekte Erfassung von Veränderungen im SBH in die Betrachtungsweise mit einzubeziehen. Die gewonnenen Erkenntnisse sind von grundlegender Relevanz für weitere Untersuchungen zum SBH bei Ziegen sowie für die praktische Anwendung des Modells der starken Ionen.

## 5.1 Validität und Relevanz der experimentellen Studien

### 5.1.1 Beurteilung des Tiermodells

Das caprine Tiermodell wurde aus zwei wesentlichen Gründen gewählt. Aus wissenschaftlicher Sicht stellen Ziegen eine biologisch relevante Tierart für die Etablierung einer experimentellen Paratuberkuloseinfektion dar. Ziegen sind für alle drei bekannten MAP-Strang-Typen I, II und III empfänglich und zeigen für den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten bovinen MAP-Strang-Typ eine höhere Empfänglichkeit sowie eine schnellere Progression der Krankheit im Vergleich zu anderen Spezies (de Juan *et al.* 2005, Stewart *et al.* 2007, Biet *et al.* 2012, Köhler *et al.* 2015, Liapi *et al.* 2015). Unter versuchstierkundlichen Aspekten hat diese hohe Empfänglichkeit den Vorteil, dass sich – im Vergleich zur Modelltierart Rind – die Dauer von Tierexperimenten mit MAP-Infektionen deutlich verkürzt. Darüber hinaus erleichtert die geringere Körpergröße von Ziegen (im Vergleich zu größeren Wiederkäuern) die Haltung und Handhabung der Versuchstiere, wodurch sich die Kosten für entsprechende tierexperimentelle Studien verringern (Anschaffung der Tiere, Futterbedarf, Betreuungsaufwand durch das Personal). Aus den genannten Gründen gewann die Ziege als Versuchstierart in den letzten Jahren vermehrt an Bedeutung (Fischer *et al.* 2015, Larsen 2015).

Die in die eigenen Untersuchungen einbezogenen Tiere konnten (nach statistischer Prüfung) als eine Grundgesamtheit betrachtet werden, obwohl die Einzeltiere in zwei zeitlich nacheinander angeordnete Tierversuche integriert waren. Alle Ziegen stammten aus demselben Herkunftsbetrieb, gehörten derselben Rasse an und wurden im vergleichbaren Alter, als Lämmer, in die Versuchstiereinrichtung eingestallt. In der Versuchstiereinrichtung galten für Haltung (Raumgröße, Besatzdichte, Strohmatte als Tiefstreu), Raumklima (relative Luftfeuchte, Raumtemperatur) und Fütterung (Menge und Art des Futters, Fütterungszeiten) standardisierte Bedingungen. Klinische Untersuchungen und ein mikrobiologisches Screening zu Beginn beider Versuchsreihen schlossen krankhafte Befunde und relevante Co-Infektionen aus. Während der gesamten Studiendauer erfolgten tägliche klinische Untersuchungen eines jeden Tieres sowie mehrfache prophylaktische Behandlungen gegen Endo- und Ektoparasiten. Um den Einfluss von Sexualhormonen zu unterbinden, wurden die männlichen Tiere kastriert. Eine solch umfangreiche Standardisierung ist bei Feldstudien unter Bedingungen der landwirtschaftlichen Praxis nicht möglich. Stetige, randomisierte, Sektionen mit pathologisch-anatomischer Befundung von Einzeltieren (inokulierte Versuchstiere und Kontrolltiere zu identischen Zeitpunkten  $\pi_i$ ) gewährleisteten einen konstanten Überblick und die Kontrolle des Gesundheits- und Infektionsstatus.

Durch den Umfang der Standardisierung, den langen Untersuchungszeitraum und die definierten Zeitpunkte zur Evaluierung der induzierten strukturellen Veränderungen im Tierkörper bot das eingesetzte Tiermodell beste Voraussetzungen für:

- die Betrachtung physiologischer Veränderungen im SBH im Zusammenhang mit somatischem Wachstum und der damit verbundenen Umstellung in der Ernährungsphysiologie beim Wiederkäuer (ausschließliche Betrachtung der nicht inokulierten Kontrolltiere)

sowie

- die Betrachtung des Einflusses eines Infektionsverlaufes auf den SBH ab dem Zeitpunkt des Kontaktes mit dem Erreger, über die Inkubationsphase bzw. das klinisch inapparente Stadium der Infektion bis hin zur manifesten Erkrankung.

Beide Betrachtungsebenen ließen zudem Rückschlüsse auf longitudinale Veränderungen im Zeitverlauf (über ein Jahr) als auch auf intra- und inter-individuelle Variabilität im SBH zu.

#### Fazit:

Das in beiden tierexperimentellen Versuchsreihen eingesetzte caprine Großtiermodell erwies sich als geeignet für:

- die Erfassung des Einflusses von somatischem Wachstum und der Ernährungsphysiologie,
- sowie des Einflusses einer akuten und einer chronischen Infektionserkrankung auf den SBH.

### **5.1.2 Beurteilung der angewandten Analytik und der Berechnungen**

#### **Analyseverfahren**

Die Gewinnung geeigneter Blutproben sowie die Messungen der Blutgas- und Elektrolyt-Konzentrationen stellen kritische Punkte bei der korrekten Beurteilung des SBH dar. Für eine valide Beurteilung von Blutgasen gilt die Analyse aus arteriellem Blut als Goldstandard, da diese die Oxygenierung des Blutes nach Passage der Lunge widerspiegelt (Wohl *et al.* 1997, Byrne *et al.* 2014). Wie verschiedene Studien zeigten, können aber auch venöse Blutproben zur validen Beurteilung der metabolischen als auch der respiratorischen Komponente des SBH herangezogen werden (Day 2002, Reinhold *et al.* 2010). Wichtig ist, dass die Blutproben aus großen, am besten aus zentralvenösen Blutgefäßen gewonnen werden, da periphere Gefäße von lokalen Perfusionsstörungen beeinflusst werden (Day 2002). Kurzfristige Änderungen im  $p\text{CO}_2$  ziehen keine großen Veränderungen von SID oder  $A_{\text{tot}}$  nach sich, daher kann zur Beurteilung der Stewart-Variablen venöses Blut verwendet werden (Stewart 1983). Bei



gesunden Hunden wurde, im Vergleich von venösem zu arteriellem Plasma, eine Abweichung für SID um etwa 2 mEq/l berechnet (Zweens *et al.* 1977).

Nach der oralen Inokulation von MAP bzw. MAH waren bei den untersuchten Ziegen keine Erkrankungen des respiratorischen Systems, und folglich auch keine Beeinträchtigung der Oxygenierung des Blutes, zu erwarten. In beiden Versuchsreihen wurden daher venöse Blutproben zur Analyse herangezogen. Durch Punktion der *Vena jugularis* wurde eine rasche, standardisierte Probenahme gewährleistet. Die unmittelbar nachfolgende Analyse bzw. Aufarbeitung der Blutproben vor Ort (ohne Zeitverzug durch Transport der Proben in ein entfernter liegendes Labor) schloss die Gefahr von Veränderungen der Laktat- und pH-Werte durch aeroben und anaeroben Metabolismus der Blutzellen oder einer Beeinflussung des ionisierten Calciums aus (Zander 2002).

Ermittelte Elektrolyt-Konzentrationen können zwischen Messgeräten verschiedener Hersteller schwanken (Stämpfli *et al.* 2014). Die Messungen sind aber auch bei ein und demselben Gerät fehleranfällig. Das birgt die Gefahr, dass es bei der Berechnung von SID zu einer Aufsummierung von Fehlern kommt. In beiden Studien erfolgte die Elektrolytmessung im Blut mittels ionenselektiver Potentiometrie, welche zum aktuellen Stand als die genaueste Elektrolyt-Messmethode galt (Kraut und Madias 2007). Trotzdem zeigte sich in STUDIE I eine hohe Variabilität der gemessenen Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen, jedoch ohne erkennbaren Einfluss auf SID oder andere Säure-Basen-Variablen. Bei Anwendung der ionenselektiven Potentiometrie ist zu beachten, dass bereits das Vorhandensein von Anionen wie Acetat, Citrat, Malat, Laktat, Phosphat und Sulfat in physiologischen Konzentrationen zu Fehlern bei der Konzentrationsbestimmung von Elektrolyten führen kann (Zander 1992).

Hinweise auf einen Einfluss der Analysemethode auf die Serumproteine, und folglich auf die darauf basierende Variable  $A_{\text{tot}}$ , konnten im aktuellen Schrifttum nicht gefunden werden. Die Globulin-Fractionen und Albumin wurden in beiden Tierversuchsreihen mittels Kapillarelektrophorese bestimmt. Vergleichsstudien zeigten, dass die Kapillarelektrophorese schneller und exakter in der Separation der Globulin-Fractionen ist als die Gelelektrophorese (Kim *et al.* 1993, Landers 1995). Alle bis zum aktuellen Stand veröffentlichten Daten zu Serumproteinen von Ziegen wurden mittels Gel-Elektrophorese erhoben (Alberghina *et al.* 2010, Piccione *et al.* 2011, Piccione *et al.* 2014, Nagy O *et al.* 2015). Somit lieferten STUDIE I und STUDIE II erstmals Serumproteinwerte von Ziegen, welche mittels Kapillarelektrophorese bestimmt wurden. Im Vergleich zu den zuvor veröffentlichten Daten für Ziegen zeigten sich in beiden Tierversuchsreihen höhere Albumin-Konzentrationen und dadurch höhere Albumin-Globulin-Quotienten. Zudem konnten eine Alpha 1-, Alpha 2-, Beta 1-, Beta 2- und eine Gamma-Globulin-Fraktion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in den auf

Gelelektrophorese basierten Untersuchungen nur eine Alpha-Globulin-Fraktion (Alberghina *et al.* 2010, Piccione *et al.* 2014) oder nur eine Beta-Globulin-Fraktion (Nagy O *et al.* 2015) für Ziegen erfasst und beschrieben. In diesen Studien und den eigenen Untersuchungen wurden Blutproben verschiedener Ziegenrassen untersucht, wodurch ebenfalls Unterschiede im Serumproteinmuster bedingt sein können. Unabhängig von der Rasse zeigte sich ein Einfluss der angewendeten Analysemethode auf die Konzentrationen von Globulin und Albumin und daher auch auf die daraus errechnete Variable  $A_{\text{tot Alb}}$ .

#### Fazit:

- Venöse Blutproben konnten erfolgreich zur Beurteilung des SBH bei gesunden Ziegen sowie zur Evaluierung der Effekte von Infektionen mit MAP respektive MAH herangezogen werden.
- Mittels Kapillarelektrophorese bestimmte Serumproteinmuster der vorliegenden Arbeit wiesen höhere Albumin-Konzentrationen im Vergleich zu in anderen Studien mittels Gelelektrophorese bestimmten auf, was zu höheren Werten für  $A_{\text{tot Alb}}$  führte.
- Nicht nur Tierart und Rasse, sondern auch die verwendeten Analyse-Verfahren sollten bei einem Vergleich von SID- und  $A_{\text{tot}}$ -Werten zwischen verschiedenen Studien berücksichtigt werden.

#### **Beurteilung der Berechnungen**

Speziesspezifische  $K_a$ - und  $A_{\text{tot}}$ -Werte für Ziegen wurden bis zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht ermittelt. Da die Untersuchungen an Jungtieren einer ruminierenden Spezies stattfanden, wurden für die Berechnungen bereits bekannte  $K_a$ -Werte von Kälbern verwendet, wobei von einer validen Anwendbarkeit aufgrund der vergleichbaren Jungtier-Physiologie ausgegangen wurde. Diese Vorgehensweise ist nicht auf ältere Tiere übertragbar, denn Unterschiede in experimentell ermittelten  $K_a$ - und  $A_{\text{tot}}$ -Werten zwischen adulten und juvenilen Tieren einer Spezies sind durchaus bekannt (Constable 2002, Constable *et al.* 2005).

Da bei der Berechnung von Standard Base Excess und Standard-Bicarbonat ein fixer Faktor aus der Humanmedizin Anwendung findet, wird die Validität dieser Werte bei anderen Spezies hinterfragt und speziespezifische Berechnungsmethoden erscheinen notwendig (Constable 2000). Unabhängig davon brachte die Berechnung von Standard Base Excess und Standard-Bicarbonat in unseren Studien keine zusätzlichen Informationen.

#### Fazit:

- $K_a$ -Werte von Kälbern können für die Berechnung von  $A_{\text{tot}}$  bei juvenilen und adulten Ziegen angewendet werden.

- Der Nutzen von Standard Base Excess und Standard-Bicarbonat in der Veterinärmedizin ist fraglich.

### 5.1.3 Beurteilung des Studiendesigns

Die Ergebnisse aus VERSUCHSREIHE I konnten in der VERSUCHSREIHE II reproduziert und bestätigt werden. Durch die lange Untersuchungszeit von bis zu 14 Monaten und die regelmäßigen Blutabnahmen im 4-Wochen-Intervall konnten sowohl verschiedene Ernährungs- und Entwicklungsphasen als auch Phasen des Infektionsverlaufes systematisch erfasst werden.

Die lange Studiendauer von über einem Jahr lieferte Hinweise, wann entwicklungsbedingte Einflüsse auf den SBH abgeschlossen sind. Durch die kontinuierliche Erfassung messbarer Parameter konnte der Einfluss der somatischen und metabolischen Entwicklung auf den SBH der heranwachsenden Ziegen während des ersten Lebensjahres in STUDIE I sehr gut dokumentiert und charakterisiert werden.

Das Studiendesign der VERSUCHSREIHEN I und II basierte auf dem etablierten Großtiermodell von Köhler *et al.* (2015). Die gesamte applizierte MAP-Inokulationsdosis von  $2,6 \times 10^8$  cfu entsprach der von Köhler *et al.* (2015) ermittelten niedrigen Infektionsdosis. Damit konnte in beiden Versuchsreihen im Untersuchungszeitraum eine chronische MAP-Infektion hervorgerufen werden. Für den im Jahr 2013/2014 ebenfalls eingesetzten ubiquitären Erreger MAH gab es vor den eigenen Untersuchungen keine Erfahrungen und Daten zu einer experimentell induzierten Infektion bzw. einer effektiven Inokulationsdosis bei Ziegen. Basierend auf der theoretischen Annahme, dass der ubiquitäre Erreger MAH eine geringere Pathogenität aufweisen sollte als MAP, wurde eine höhere Inokulationsdosis als für MAP gewählt. Die hierbei gesamte oral applizierte MAH-Inokulationsmenge ( $2,13 \times 10^{10}$  cfu) war etwa eine log-Stufe höher als die von Köhler *et al.* (2015) experimentell ermittelte hohe Inokulationsdosis für MAP und zwei log-Stufen höher als die in VERSUCHSREIHE I und II angewendete MAP-Inokulationsdosis. Unerwarteterweise induzierte die oral applizierte MAH-Dosis innerhalb weniger Tage bis Wochen Symptome einer klinisch manifesten Allgemeinerkrankung. Im weiteren Verlauf wurde bei ca. 50 % der Lämmer nach MAH-Challenge ein akut fulminanter Krankheitsverlauf beobachtet (Subgruppe MAH 1), wohingegen die anderen ca. 50 % der Tiere einen eher chronischen Verlauf der induzierten Infektion aufwiesen (Subgruppe MAH 2).

Für die mit MAP inokulierten Tiere sowie für die nicht-inokulierten Kontrolltiere konnte durch zusammenfassende Betrachtung beider Versuchsreihen die Validität der statistischen Ergebnisse erhöht werden. Das war für die mit MAH inokulierten Tieren nicht möglich, da nur

Daten aus VERSUCHSREIHE II (2013/2014) vorhanden waren. Zusätzlich war es aufgrund des akut schweren Krankheitsverlaufes bei einem Teil der Tiere statistisch nicht gerechtfertigt, alle mit MAH inokulierten Ziegen als eine Stichprobe anzusehen; vielmehr erforderten die Subgruppen MAH 1 und MAH 2 separate Betrachtungen. Die hieraus resultierende geringe Anzahl an Tieren von  $n = 6 - 9$  (MAH 1) bzw.  $n = 8 - 9$  (MAH 2) muss bei der Beurteilung der Ergebnisse kritisch beachtet werden.

Die Vier-Wochen-Intervalle der Blutabnahme erwiesen sich für die langfristige Beurteilung der chronischen Erkrankungen (MAP und Subgruppe MAH 2) als gut geeignet. Da die schwerkranken Tiere von Subgruppe MAH 1 nur maximal drei Monate lebten, konnten für diese Tiere leider nur Daten von maximal drei Blutabnahmen ausgewertet werden.

#### Fazit:

- Die Reproduzierbarkeit der VERSUCHSREIHE I in VERSUCHSREIHE II bestätigt die Validität des Versuchsaufbaues.
- Mit einer oralen Inokulationsdosis von  $2,6 \times 10^8$  cfu MAP je Tier wurde erwartungsgemäß ein chronischer, klinisch wenig prominenter Verlauf der Infektion hervorgerufen.
- Für die Etablierung eines MAH-Infektionsmodells erwies sich die orale Inokulationsdosis von  $2,13 \times 10^{10}$  cfu/Tier als so hoch, dass Tiere verstarben oder ‚humane Endpunkte‘ erreicht wurden und folglich zuvor für den Tierversuch definierte Abbruchkriterien angewandt werden mussten.
- Blutabnahme-Intervalle mit einem Zeitraum von je vier Wochen eigneten sich zur Erfassung des Einflusses physiologischer Prozesse und chronischer Infektionen auf den SBH über einen langen Zeitraum von einem Jahr.

#### **5.1.4 Physiologische Variabilität von Elektrolyten, Metaboliten und des SBH während des ersten Lebensjahres**

Bei der Betrachtung der einschlägigen Literatur zum Einfluss des somatischen Wachstums und der Reifung der Verdauungsphysiologie beim Wiederkäuer auf den SBH fiel auf, dass es vor Beginn der eigenen Untersuchungen keine Informationen gab, weder zu den traditionellen SBH-Variablen noch zu den Stewart-Variablen. Auch lagen keine Daten zum Modell der starken Ionen bei der Ziege vor. STUDIE I ist somit die erste Langzeit-Studie, bei der Daten zu den Elektrolyten, Metaboliten und dem SBH beim Übergang vom milchsaugenden zum ruminierenden Wiederkäuer unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität erhoben

wurden. Ebenso lieferte STUDIE I erstmals Informationen zu den Stewart-Variablen bei der Ziege.

Im Verlauf der Untersuchungen kam es mit zunehmendem Alter der Ziegen zu einer Umstellung der Ernährung sowie einer damit einhergehenden Reifung ihrer Verdauungsorgane. Wiederkäuer weisen als Besonderheit in ihrer Entwicklung eine grundlegende Änderung der Verdauungs- und Stoffwechselfysiologie auf. So ähneln Anatomie und Physiologie juveniler, milchsaugender Tiere jener von monogastrischen Säugetieren (Van Soest 1994). Mit zunehmendem Alter und vermehrter Aufnahme von rohfaserreichem, strukturiertem Futter kommt es zu einer morphologisch-funktionellen Reifung der Vormägen (Haube, Pansen, Blättermagen) und einer Besiedelung mit Mikroorganismen (Lyford und Huber 1988). In dieser Übergangsphase wechselt der Energiemetabolismus von Glucose als primärem Energiesubstrat zu kurzkettigen Fettsäuren aus dem Pansen (McCarthy und Kesler 1956, Knowles *et al.* 2000, Baldwin *et al.* 2004). Dies wird durch die Fermentationsleistung der kommensalen Mikroorganismen ermöglicht, welche unverdauliche Cellulose und komplexe Kohlenhydrate aufspalten. Dabei entstehen kurzkettige Fettsäuren (insbesondere Acetat, Propionat, Butyrat).

Da im Verdauungstrakt starke und schwache Ionen resorbiert werden, sind Anatomie, Ernährungsphysiologie und die Zusammensetzung der Nahrung nach dem Modell der starken Ionen wesentlich für den SBH. Neben den starken Ionen sind nach Stewart aber auch Serumproteine von Bedeutung. Daher kann sowohl von einem Einfluss durch den Prozess des Wiederkäuens als auch des somatischen Wachstums sowie der zunehmenden Reifung des Immunsystems (Bildung von Immunglobulinen) auf die Homöostase des SBH ausgegangen werden. Im standardisierten Ziegenmodell konnten die Effekte dieser physiologischen Prozesse, die das erste Lebensjahr der Tiere prägen, durch signifikante Unterschiede in den Elektrolyten, Metaboliten, Serumproteinen sowie in den traditionellen SBH-Variablen und den Stewart-Variablen bestätigt, erfasst und charakterisiert werden.

Es wurden physiologisch höhere Konzentrationen von Glucose, Calcium und Phosphor bei den juvenilen, milchsaugenden Ziegenlämmern gefunden, welche mit zunehmendem Alter sanken (Stogdale 1981b). Wie bereits bei milchsaugenden Kälbern dokumentiert, waren auch bei den milchsaugenden Ziegenlämmern signifikant höhere  $L$ -Laktat-Konzentrationen im Vergleich zu den adulten Tieren zu beobachten (Anderson *et al.* 1987, Quigley und Bernard 1992). Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit dem Abbau von Kohlenhydraten im Pansen (Quigley und Bernard 1992). Die Daten aus STUDIE I stützen diese Hypothese, da der Abfall von  $L$ -Laktat im selben Zeitraum, in welchem das Absetzen des Milchaustauschers erfolgte, auftrat. Im Gegensatz dazu konnte bei Kälbern nur ein Zusammenhang zwischen

dem Alter und einer stetig sinkenden  $L$ -Laktat-Konzentration bewiesen werden, unabhängig von Art der Fütterung und dem Absetzen (Quigley und Bernard 1992).  $L$ -Laktat kann als wertvolle Energiequelle des juvenilen Wiederkäuers angesehen werden. Die Kapazität für die Gluconeogenese aus  $L$ -Laktat in der Leber ist bei juvenilen Tieren drei- bis zehnmal höher als bei adulten Tieren (Baldwin *et al.* 2004).

Die erwartungsgemäß steigende Protein-Syntheseleistung in der somatisch wachsenden Leber wurde in unseren Untersuchungen bestätigt, indem die Konzentrationen von Albumin und Totalprotein im Blut der juvenilen Ziegen signifikant niedriger waren als im Blut der adulten Tiere. Die mit zunehmendem Alter beobachteten steigenden Gamma Globulin-Konzentrationen können der Reifung des Immunsystems zugerechnet werden (Stogdale 1981a). Die in STUDIE I erhobenen Albumin- und Totalprotein-Konzentrationen stehen im Einklang mit bereits erhobenen Daten bei gesunden juvenilen Ziegen (Piccione *et al.* 2011) und gesunden Kälbern (Nagy *et al.* 2014, Tóthová *et al.* 2014). Im Gegensatz zu Untersuchungen bei Kälbern konnte jedoch kein Einfluss des somatischen Wachstums auf die Konzentration von Alpha- oder Beta-Globulinen gesehen werden (Nagy *et al.* 2014). Die in STUDIE I ermittelten Serumproteinwerte für ruminierende Ziegen ab einem Alter von ca. 7 Monaten bestätigten bereits zuvor publizierte Serumproteinwerte adulter ruminierender Ziegen (Alberghina *et al.* 2010).

Diese physiologische Entwicklung der Serumproteine spiegelte sich in den daraus berechneten Variablen  $A_{\text{tot TP}}$  und  $A_{\text{tot Alb}}$  wider. Parallel zu physiologisch höheren Albumin-Globulin-Quotienten bei den jüngeren Tieren wurden anhand von  $A_{\text{tot TP}}$  niedrigere Werte der gesamten Menge an schwachen dissoziierten Säuren berechnet als mittels  $A_{\text{tot Alb}}$ . Dies wurde als mathematischer Effekt gewertet, bedingt durch die geringere Basenbindungsfähigkeit und den  $pK_a$  der Globuline (Van Slyke *et al.* 1928, Rossing *et al.* 1986, Figge *et al.* 1991). Nach der Stewart-Theorie führt eine Hypoproteinämie (niedriges  $A_{\text{tot}}$ ) zu einer metabolischen, nicht respiratorischen Alkalose (McAuliffe *et al.* 1986, Rossing *et al.* 1986). Es war jedoch kein Einfluss der in den ersten drei Lebensmonaten beobachteten niedrigeren Serumprotein-Konzentrationen auf den pH-Wert des Blutes oder auf die traditionellen SBH-Parameter erkennbar. Lediglich die tendenziell niedrigeren SID-Werte bei den Jungtieren im Vergleich zu den adulten Tieren können als kompensatorische Reaktion auf ein niedrigeres  $A_{\text{tot}}$  zur Erhaltung der Elektroneutralität und des pH-Wertes gewertet werden (Wilkes 1998, Gomez *et al.* 2007). Die in STUDIE I erhobenen SID-Werte der juvenilen Ziegen waren übereinstimmend mit bereits bei jungen Kälbern ermittelten SID-Werten (Constable *et al.* 2005, Bachmann *et al.* 2009). Nach den Grundsätzen der Stewart-Theorie gehen die physiologisch steigenden Serumprotein- und damit  $A_{\text{tot}}$ -Konzentrationen auch mit einer stetig höheren (und demzufolge zu kompensierenden) azidotischen Belastung auf den SBH einher (McAuliffe *et al.* 1986).

Im Alter von vier bis sechs Monaten trat bei den von uns untersuchten Ziegen – im Vergleich zu den Zeitpunkten, als dieselben Tiere adult waren – eine metabolisch-azidotische Belastung auf, die im Gruppenmittel wie folgt charakterisiert war: signifikant niedrigerer pH-Wert im Blut (allerdings noch innerhalb des physiologischen Bereichs), niedrigere  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration und verminderter Base Excess, normaler  $\text{pCO}_2$ . Diese azidotische Phase zeigte sich vier bis acht Wochen nach dem Absetzen zeitgleich zu erniedrigten SID-Werten. SBH und SID normalisierten sich stetig, parallel zu den steigenden Serumproteinen und  $A_{\text{tot}}$ , bis konstante Proteinlevel im Blut erreicht waren. Insgesamt schien die Homöostase und Gegenregulierung des SBH aufgrund der im Zuge des Absetzens sinkenden SID und durch das ansteigende  $A_{\text{tot}}$  kurzfristig überlastet.

In die Kalkulation von SIG werden sowohl  $A_{\text{tot}}$ ,  $\text{pH}(v)_T$  als auch  $\text{pK}_a$  einbezogen und haben Einfluss auf diese Variable. Daher ist von unterschiedlichen SIG-Werten bei adulten und juvenilen Tieren auszugehen. Doch weder die sich physiologisch verändernden Serumproteine noch die identifizierte azidotische Phase hatten Einfluss auf AG oder SIG; es zeigten sich auch keine altersabhängigen Tendenzen. SIG unterlag einer hohen Variabilität und die Werte aus VERSUCHSREIHE I konnten in der VERSUCHSREIHE II nicht reproduziert werden. Fast in jedem Untersuchungszeitraum waren signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsreihen bei AG und SIG erkennbar. Sowohl  $A_{\text{tot}}$ ,  $\text{pH}(v)_T$ , AG als auch  $\text{pK}_a$  werden in die Berechnung von SIG einbezogen und können diese Variable beeinflussen. Anorganisches Phosphat wird weder bei der Berechnung von  $A_{\text{tot}}$  noch in der SIG Formel von Constable berücksichtigt. Nach Constable sollte daher seine Formel für SIG nicht bei veränderten  $iP$ -Plasmakonzentrationen angewendet werden (Constable 1997). Inwieweit sich physiologisch verändernde Phosphat-Konzentrationen während des somatischen Wachstums auf die berechnete SIG auswirken, konnte anhand unserer Daten nicht evaluiert werden und macht weiterführende Untersuchungen notwendig. Theoretisch würde eine Miteinbeziehung von  $iP$  das berechnete Acid Total geringfügig erhöhen und die alkalischen Effekte von niedrigen Proteinkonzentrationen bei juvenilen Tieren teilweise ausgleichen.

#### Fazit:

- Im ersten Lebensjahr der Ziegen treten signifikante Konzentrationsänderungen der Elektrolyte, der Serumproteine sowie signifikante Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt auf.
- Die somatische Reifung der Organe, die Änderung der Ernährungsphysiologie hin zum Wiederkäuer und die Reifung des Immunsystems beeinflussen den Säure-Basen-Haushalt, erkennbar an einer azidotischen Phase im vierten bis sechsten Lebensmonat.

- Die aus den o. g. physiologischen Prozessen resultierenden Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt können nur durch die zusätzliche Beurteilung der Stewart-Variablen vollständig erfasst und erklärt werden.
- Bei juvenilen Tieren sollte Acid Total sowohl auf Basis von TP als auch auf Basis von Albumin berechnet werden, um die Gesamtmenge an schwachen Säuren richtig einzuschätzen.

### **5.1.5 Variabilität des SBH infolge einer Mykobakterien Infektion**

Bei Betrachtung der einschlägigen Literatur zum Einfluss von chronischen Infektionen auf den SBH konnten vor Beginn der eigenen Untersuchungen keine Informationen gefunden werden. Ebenso waren keine Daten zum Einfluss einer Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien auf den SBH bekannt. STUDIE II ist somit die erste Langzeit-Studie, welche die Variabilität des SBH vergleichend anhand der traditionellen sowie der Stewart-Variablen während einer bakteriellen Infektionskrankheit erfasst. Bezogen auf die mit MAP inokulierten Tiere lassen die gewonnenen Ergebnisse explizit Rückschlüsse auf Veränderungen in der Säure-Basen-Homöostase zu, wie sie beim Krankheitsbild der Paratuberkulose zu erwarten wären. Darüber hinaus liefern die in STUDIE II erhobenen longitudinalen Daten nach MAH-Exposition erstmals Erkenntnisse zum SBH bei einem akuten Krankheitsgeschehen mit schwerem bis tödlichem Verlauf, also bis zum Zusammenbruch der Homöostase.

Im Verlauf der Untersuchungen kam es bei allen mit MAP inokulierten Tieren subklinisch zu einem zunehmenden Entzündungsgeschehen und zu Gewebeveränderungen, vor allem im Gastrointestinaltrakt. Nach MAH-Inokulation hingegen entwickelte sich bei 50 % (9/18) der exponierten Ziegenlämmer unerwartet ein schwerwiegender Krankheitsverlauf, einhergehend mit massiven Entzündungsreaktionen und assoziierten Gewebeschäden (Schinköthe *et al.* 2016a). Bei sechs dieser akut erkrankten Tiere wurden in der pathologischen Begutachtung deutliche Hinweise auf ein Multiorganversagen (MODS, ‚Multi-Organ Dysfunction Syndrome‘) sowie auf ein ‚Systemic Inflammatory Response Syndrome‘ (SIRS) und auf eine Sepsis gefunden, einhergehend mit multifokalen renalen Nekrosen und multiplen Fibrinthromben in Nieren, Leber und Lunge (Schinköthe *et al.* 2016b). Die anderen 50 % der mit MAH inokulierten Ziegen wiesen im Laufe der Studie klinisch sowie histo-pathologisch eine Regression auf. Die unterschiedlichen klinischen Verläufe *post inoculationem* ermöglichten es, intraindividuelle Unterschiede in der Erreger-Wirt-Interaktion zu charakterisieren und damit einhergehende Einflüsse sowohl einer chronischen als auch einer akut verlaufenden Mykobakterien-Infektion auf den SBH zu evaluieren.



### 5.1.5.1 Intraindividuelle Erreger-Wirt-Interaktionen

Die beobachteten unterschiedlichen Krankheitsverläufe nach einer MAH-Inokulation innerhalb einer homogenen Tiergruppe und unter standardisierten Versuchsbedingungen deuten auf intraindividuelle Unterschiede in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt hin (Krüger *et al.* 2015). Aus natürlich auftretenden Tuberkulose-Infektionen bei Menschen und Rindern sind solche intraindividuellen Erreger-Wirt-Interaktionen mit unterschiedlichen Immunantworten und Krankheitsverläufen bereits bekannt (Schinköthe *et al.* 2016b). Auch die histo-pathologischen Untersuchungen der mit MAH inokulierten Ziegen offenbarten morphologische Ähnlichkeiten zur humanen wie auch zur bovinen Tuberkulose (Schinköthe *et al.* 2016a, Schinköthe *et al.* 2016b). Aus diesem Grund wurde bereits von einer interdisziplinären Arbeitsgruppe eine stärkere individuelle Immunantwort seitens des Wirtes als Schlüsselfaktor für den schweren Krankheitsverlauf bei einem Teil der Tiere in der MAH-Gruppe gedeutet (Schinköthe *et al.* 2016a, Schinköthe *et al.* 2016b). Dafür spricht auch der in STUDIE II erfasste signifikante Anstieg der Gamma Globuline in der Subgruppe MAH 1.

Generell waren die schweren Folgen einer Inokulation mit MAH bei Ziegen vorab nicht zu erwarten. Retrospektiv ist davon auszugehen, dass die gewählte Inokulationsdosis (vgl. Abschnitt 5.1.3) zu dem schnellen und prominenten Auftreten der klinischen Symptome beitrug. Berichte über einzelne Fälle von MAH-Infektionen bei Hund, Katze und Pferd beschreiben ebenfalls schwere Erkrankungen mit Durchfall, Abmagerung, Fieber und granulomatösen Veränderungen im Magendarmtrakt, welche die Euthanasie zur Folge hatten (Haist *et al.* 2008, Kriz *et al.* 2010, Klang *et al.* 2014). Hinweise für eine höhere Virulenz des angewendeten MAH-Stammes oder für eine höhere Empfänglichkeit bei Ziegen gibt es aktuell nicht (Mackintosh *et al.* 2007, Gwozdz 2010, Schinköthe *et al.* 2016b).

In der Humanmedizin werden individuelle Einflussfaktoren des Patienten auf die Erreger-Wirt-Interaktion und damit auch für die Entstehung einer Sepsis bzw. eines SIRS verantwortlich gemacht (Singer *et al.* 2016). Eine Sepsis wird als fehlregulierte, systemische Entzündungs- und Immunantwort auf einen bakteriellen Infekt mit lebensbedrohlichen Organfehlfunktionen definiert (Hotchkiss *et al.* 2016, Singer *et al.* 2016). Die im caprinen Modell (STUDIE II) erhobenen histo-pathologischen Befunde in Kombination mit den beobachteten klinischen Symptomen und den signifikant verminderten Konzentrationen von Glucose und Albumin im Blut deuten auf eine bestehende Sepsis vor dem Tod oder der Euthanasie der betroffenen Tiere hin.

Intraindividuelle Unterschiede in der Immunantwort konnten im Zuge der histo-pathologischen Untersuchungen auch bei den mit MAP inokulierten Tieren nachgewiesen werden (Krüger *et al.* 2014). Im Gegensatz zu den mit MAH inokulierten Tieren zeigten sich jedoch keine

klinischen Ausprägungen oder Veränderungen in den Elektrolyten, Metaboliten und SBH-Variablen.

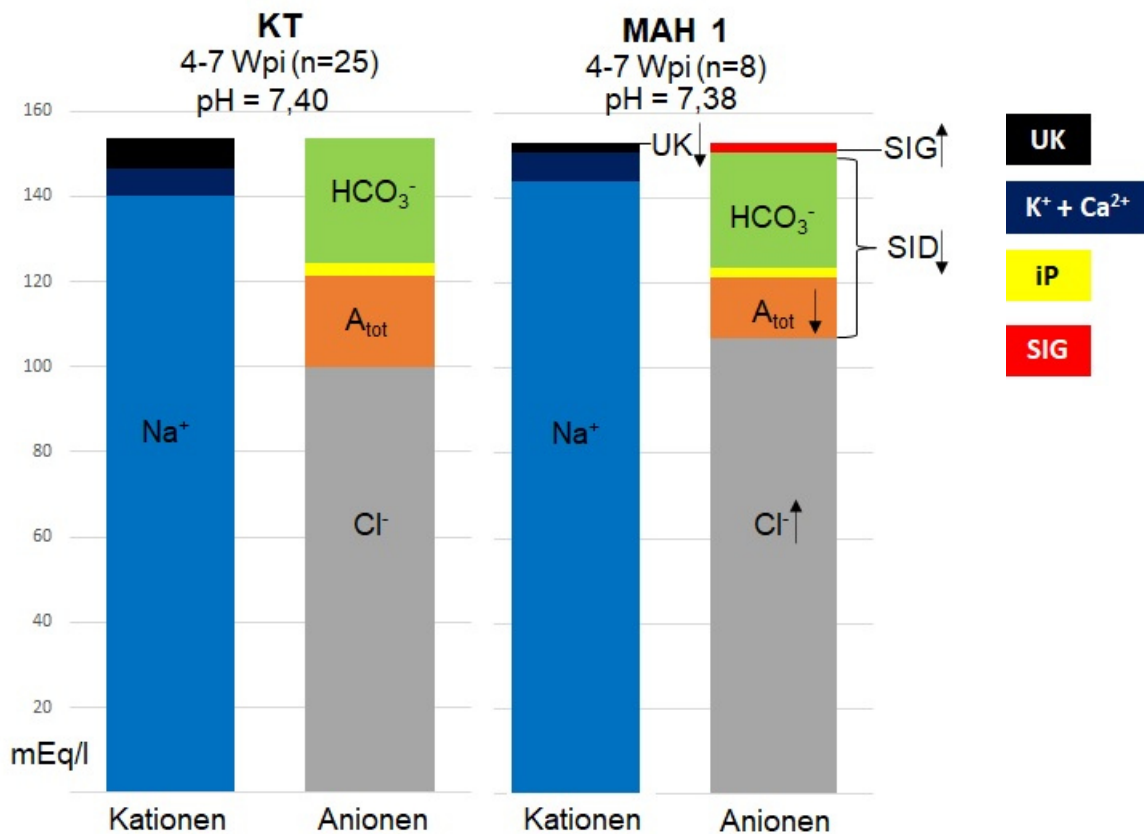
### **5.1.5.2 Allgemeine infektionsassoziierte Veränderungen**

Unabhängig vom Inokulum zeigte sich ein genereller Einfluss einer Mykobakterien Infektion auf die Quantität von Serumproteinen und auf die Serumproteinmuster. Bei allen mit Mykobakterien inokulierten Ziegen wiesen die bereits direkt nach Ende der Inokulationsperiode beobachteten niedrigen bis signifikant niedrigeren Konzentrationen von Albumin, Gamma Globulin und Totalprotein im Blut unspezifisch auf eine Akute-Phase-Reaktion und auf ein damit einhergehendes Entzündungsgeschehen hin (Stogdale 1981a, Kushner 1982). Im Allgemeinen wird das gesamte Entzündungsgeschehen durch eine Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Interferone (z. B. Interferon-Gamma) kontrolliert und moduliert (Rauch *et al.* 2013). Die Akute-Phase-Reaktion im Speziellen wird durch proinflammatorische Zytokine induziert (z. B.: Interleukin-1, Interleukin-6, TNF $\alpha$ ), welche von aktivierten Monozyten nach einem nachhaltigen Gewebeschaden sezerniert werden (Petersen *et al.* 2004). Eine positive Assoziation zwischen SIG und der Konzentration solcher inflammatorischen Zytokine ist bekannt (Zampieri *et al.* 2014). Übereinstimmend mit diesen Kenntnissen aus dem Schrifttum konnten bei allen mit Mykobakterien inokulierten Ziegen signifikant niedrigere SIG<sub>Alb</sub><sup>-</sup>, SIG<sub>TP</sub><sup>-</sup> und signifikant höhere AG-Werte in der frühen Phase der Infektion beobachtet werden. In allen MAH-exponierten Tieren blieb SIG<sub>Alb</sub> während der klinisch kritischen Zeit signifikant negativ, was für eine anhaltende Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung spricht. Erhöhte Level des proinflammatorischen Zytokins Interferon-Gamma, die im Blutserum der MAH-exponierten Ziegen gemessen wurden, unterstützen diesen postulierten Zusammenhang zwischen SIG und dem Schweregrad der Entzündung. Im Großen und Ganzen erscheinen die Einflüsse der Akute-Phase-Reaktion und des Entzündungsprozesses auf die Säure-Basen-Homöostase unspezifisch und lassen keinen Rückschluss auf Ursprung oder Lokalisation der Entzündung zu.

### **5.1.5.3 Akuter Verlauf einer mykobakteriellen Infektion**

Initial zeigten alle mit MAH inokulierten Ziegen Fieber, teilweise Durchfall und nach den traditionellen SBH-Variablen wie auch nach den Stewart-Variablen eine kompensierte, respiratorische Alkalose. Bereits im zweiten Untersuchungszeitraum (Woche 4-7 pi) waren Unterschiede im Säure-Basen-Haushalt innerhalb der mit MAH inokulierten Ziegengruppe zu erkennen. Noch bevor ein klinisch manifester, schwerer Krankheitsverlauf bei etwa 50 % der Tiere erkennbar war, wiesen die traditionellen SBH-Variablen bei diesen Tieren bereits auf eine noch kompensierte azidotische Belastung hin. Wie in Abb. 4 ersichtlich konnten anhand

der Stewart-Variablen als Ursachen für diese kompensierte metabolische Störung eine SID/SIG Azidose, verdeckt von einer durch die stetig sinkende Albumin-Konzentration entstandene  $A_{\text{tot}}$  Alkalose, identifiziert werden (McAuliffe *et al.* 1986, Rossing *et al.* 1986).



**Abbildung 4: Repräsentative Ionogramme für die Kontrollgruppe und für die Subgruppe MAH 1 (mit akutem klinischen Krankheitsverlauf) im Zeitraum 4. bis 7. Woche post inoculationem [alle Angaben in mEq/l]**

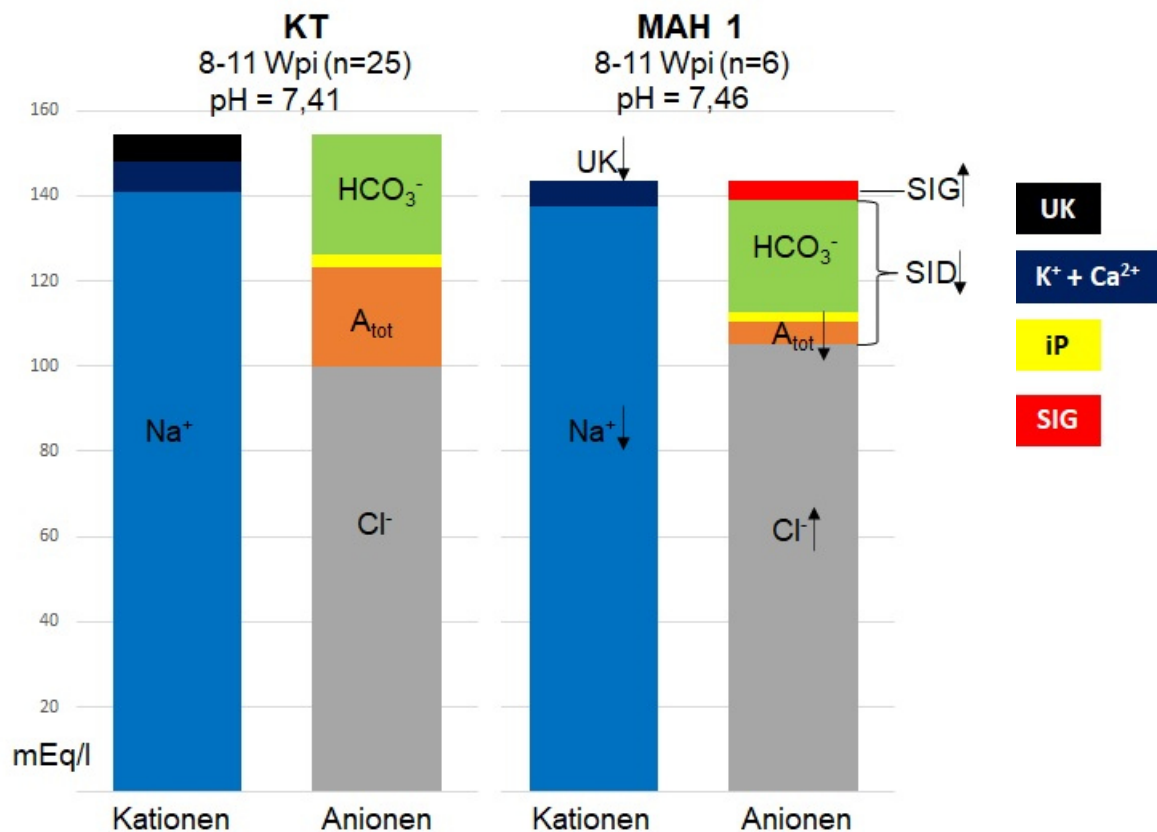
KT: Kontrolltiere; MAP: mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inokulierte Tiere; MAH 1: mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* inokulierte Tiere mit akutem Krankheitsverlauf; n: Anzahl der Tiere; mEq/l: Milliäquivalent pro Liter;  $A_{\text{tot}}$ : acid total berechnet auf Basis von Albumin; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bikarbonat; UK: ungemessene Kationen; K<sup>+</sup>+Ca<sup>2+</sup>: Kalium und Kalzium; iP: anorganisches Phosphat; SIG: strong ion gap berechnet auf Basis von Albumin; SID: strong ion difference.

Die Daten aus STUDIE II bestätigen Kritiker, wonach eine alleinige Beurteilung der traditionellen Variablen keine Rückschlüsse auf die Grundursache einer Säure-Basen-Störung zulässt (Constable 2000). Die niedrigere SID zeigte sich unabhängig von der Anzahl der in die Formel einbezogenen Ionen. Das steht im Gegensatz zu Aussagen von Constable (1997), wonach für eine klinisch brauchbare Anwendung mindestens vier starke Ionen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Lac<sup>-</sup>) in die Berechnung einbezogen werden müssen. Die Konzentrationen der jeweiligen

Elektrolyte zeigten keine signifikanten Veränderungen. Das bekannte Problem eines eventuell auftretenden kumulativen Fehlers bei der Addition der Elektrolyte zur Berechnung von SID könnte im Gegensatz auch die Sensitivität von SID erhöhen. Die niedrigen SID-Werte (Abb. 4) könnten sowohl mit dem Verlust von Kationen als auch mit der Hypoalbuminämie zur Erhaltung der Elektroneutralität im Zusammenhang stehen (Wilkes 1998, Kellum 2000).

Ein Zusammenspiel von lokalen sowie systemischen pH-Wert-Veränderungen und dem Entzündungsgeschehen wurde bereits mehrfach belegt (Miyazawa und Inoue 1990, Bellocq *et al.* 1998, Bidani *et al.* 1998, Heming *et al.* 2001, Lardner 2001, Kellum *et al.* 2004a). Beim Menschen konnte auch eine Assoziation zwischen einer niedrigen Konzentration von  $\text{HCO}_3^-$  im Blutserum und einer höheren Mortalität – unabhängig vom systemischen pH-Wert – festgestellt werden (Raphael *et al.* 2016). Wesentlich scheint hier vor allem die azidotische Belastung. Die Säure-Basen-Daten aus STUDIE II stehen im Einklang mit Untersuchungen, welche die Vermutung nahe legen, dass eine Senkung des pH-Wertes im Blut die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren stimuliert und somit eine wesentliche Rolle in der Progression eines Krankheitsgeschehens und in der Pathogenese von Sepsis spielt (Kellum *et al.* 2004b).

In der 8.-11. Woche pi entgleisten die Säure-Basen-Störungen bei den Tieren in Subgruppe MAH 1 weiter. Ein schwerer Krankheitsverlauf manifestierte sich klinisch, die Tiere entwickelten Anzeichen einer Sepsis und eines SIRS, die Homöostase versagte und sie verstarben oder wurden unter Tierschutzaspekten euthanasiert. Im Zusammenhang mit einer Sepsis sind eine Vielzahl von relevanten Säure-Basen-Störungen bekannt: primäre respiratorische Alkalose, verschiedene Formen der primären metabolischen Azidose, komplexe Säure-Basen-Störungen, das Vorhandensein von nicht messbaren Anionen sowie eine Laktatazidose (Elisaf *et al.* 1993, Kellum *et al.* 1995a, Hotchkiss *et al.* 2016). In STUDIE II zeigte sich vor dem Tod der betroffenen Tiere eine komplexe alkalotische Säure-Basen-Störung. Dabei indizierten die traditionellen Parameter (erhöhter pH-Wert, Hypokapnie, unverändertes  $\text{HCO}_3^-$  und BE) eine respiratorische Alkalose und konnten die komplexe Störung nicht erfassen. Die Stewart-Variablen hingegen ließen eine milde respiratorische Alkalose neben einer SID- und einer  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$ -Azidose, überwogen von einer  $A_{\text{tot}}$ -Alkalose (sowohl  $A_{\text{tot AlB}}$  als auch  $A_{\text{tot TP}}$ ), erkennen (Abb. 5).



**Abbildung 5: Repräsentative Ionogramme für die Kontrollgruppe und für die Subgruppe MAH 1 (mit akutem klinischen Krankheitsverlauf) im Zeitraum 8. bis 11. Woche post inoculationem [alle Angaben in mEq/l]**

KT: Kontrolltiere; MAP: mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inokulierte Tiere; MAH 1: mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* inokulierte Tiere mit akutem Krankheitsverlauf; n: Anzahl der Tiere; mEq/l: Milliäquivalent pro Liter; A<sub>tot</sub>: acid total berechnet auf Basis von Albumin; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bikarbonat; UK: ungemessene Kationen; K<sup>+</sup>+Ca<sup>2+</sup>: Kalium und Kalzium; iP: anorganisches Phosphat; SIG: strong ion gap berechnet auf Basis von Albumin; SID: strong ion difference.

Bei genauerer Betrachtung der veränderten Stewart-Variablen zeigte sich, dass die signifikant niedrigeren SID<sub>m3</sub><sup>-</sup>, SID<sub>m4</sub><sup>-</sup> und SID<sub>m5</sub><sup>-</sup>-Werte durch den dramatischen Abfall von Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> entstanden. Dies könnte sowohl durch gastrointestinale Verluste, durch renale Verluste, eine verminderte gastrointestinale Resorption sowie über Effusionen entstanden sein (Stogdale 1981b, Willard und Tvedten 2006, Herdt und Sayegh 2013a). Eine Hypokalzämie wurde bei mit Paratuberkulose infizierten Ziegen bereits dokumentiert (Smith und Sherman 2011). Theoretisch könnte auch die Sepsis zu den niedrigen SID-Werten beigetragen haben. In der Humanmedizin sind sowohl Hyponatriämie als auch Hypokalzämie bekannte Elektrolytstörungen im Zusammenhang mit einer Sepsis (Eller 2014). Ein kleiner Anteil der

massiven Elektrolytveränderungen in der Subgruppe MAH 1 war möglicherweise durch die Messung verursacht, da der Anteil an ionisiertem  $\text{Ca}^{2+}$  hauptsächlich von der Albumin-Konzentration und dem Blut pH-Wert abhängig ist (Loken *et al.* 1960, Stogdale 1981b). Obwohl eine Alkalämie bekanntermaßen mit einer Hypokaliämie und einer Hypochlorämie einhergeht (Stogdale 1981b, Robinson 2013a), wurden bei den von uns untersuchten Tieren keine signifikanten Veränderungen in der Konzentration dieser Elektrolyte beobachtet. Insgesamt erscheint der Einfluss von Hypoproteinämie, Veränderungen des pH-Wertes und der Ionenstärke auf den Ionisierungsgrad von Elektrolyten und somit auf die SID aktuell unklar.

Der massive Abfall der schwachen Säure Albumin bei den schwer kranken Ziegen kurz vor ihrem Tod oder der Euthanasie hatte einen massiv alkalisierenden Effekt (McAuliffe *et al.* 1986, Rossing *et al.* 1986, Fencel *et al.* 2000). Dies kann sowohl mit einer verminderten Albumin-Synthese in der Leber als Ausdruck der Akute-Phase-Reaktion, einer Störung der Leberfunktion, einer verminderten Futteraufnahme durch Apathie sowie einem Verlust über die Nieren und den Gastrointestinaltrakt zusammenhängen (Stogdale 1981a, Petersen *et al.* 2004, Schinköthe *et al.* 2016b). Hypoalbuminämie ist eine bekannte Komplikation bei schwer kranken Menschen und ist beim humanen Patienten mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Vincent *et al.* 2003). Der massive Abfall von  $A_{\text{tot Alb}}$  führte auch zu einem massiven Abfall von  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$ .

Sowohl STUDIE I als auch STUDIE II zeigten, dass die Gesamtmenge an schwachen Säuren zur Folge hatte, dass  $A_{\text{tot}}$  bei einem veränderten Albumin-Globulin-Quotienten zwischen den Berechnungen (basierend auf TP oder Albumin) stark variierte. Bei allen MAH-exponierten Ziegen entwickelten sich  $\text{SIG}_{\text{TP}}$  und  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  gegensätzlich, parallel zu einem konstant sinkenden Albumin-Globulin-Quotienten. Weder  $\text{SIG}_{\text{TP}}$  noch AG konnte, während der Hypoalbuminämie nichtgemessene Anionen korrekt erfassen. Dieser Effekt war für AG bereits bekannt (Figge *et al.* 1998, Feldman *et al.* 2005).  $A_{\text{tot}}$  als auch SIG sollten daher bei verändertem Albumin-Globulin-Quotienten sowohl auf Basis von Totalprotein als auch auf Basis von Albumin berechnet und gemeinsam beurteilt werden.

Überraschenderweise wurden bei den akut kranken Tieren keine veränderten  $_{\text{L}}$ -Laktat-Konzentrationen beobachtet, obwohl Schock und Sepsis meist mit erhöhtem  $_{\text{L}}$ -Laktat einher gehen (Tuhay *et al.* 2008). Dies kann im Zusammenhang mit den Blutabnahme-Intervallen stehen, die jeweils vier Wochen umfassten. Es ist möglich, dass die zuvor im Studiendesgin definierten Zeitpunkte der Blutgewinnung von der klinisch kritischsten Phase unmittelbar vor dem Tod etwas abwichen.

Die im Zusammenhang mit einem schweren Krankheitsverlauf beobachteten Säure-Basen-Veränderungen bestätigen die Kritik, wonach  $\text{HCO}_3^-$  nicht als unabhängiger Faktor für die

metabolische Komponente anzusehen ist (Constable 1997, Constable 2000). Auch der unveränderte Base Excess bestätigt Untersuchungen, wonach bei jedem sechsten Intensivpatienten eine massive Säure-Basen-Störung trotz eines normalen Base Excess besteht (Fencl *et al.* 2000).

#### Fazit:

- Vor der klinischen Manifestation eines schweren Krankheitsverlaufes zeigte sich eine kompensierte metabolische Säure-Belastung, welche nur anhand der Stewart-Variablen vollständig erfasst werden konnte.
- Nach einer kompensierten metabolischen Säuren-Belastung entwickelten die klinisch akut erkrankten Tiere Anzeichen von Sepsis, SIRS und MODS.
- Während der akuten, schweren Erkrankung kam es zu einer komplexen Säure-Base-Störung, welche anhand der traditionellen SBH-Variablen nicht identifiziert werden konnte.
- Bei verändertem Albumin-Globulin-Quotienten sollten  $A_{\text{tot}}$  und SIG basierend auf TP und Albumin berechnet und gemeinsam beurteilt werden.

#### **5.1.5.4 Chronischer Verlauf einer mykobakteriellen Infektion**

Alle MAP-exponierten Tiere entwickelten einen chronischen Infektionsverlauf. Im Vergleich zu den mit MAP infizierten Tieren zeigten die mit MAH inokulierten Tiere im Gruppenmittel im zweiten und dritten Monat nach der Inokulation signifikant niedrigere Albumin-, TP- und signifikant höhere Gamma Globulin-Konzentrationen. Dies spricht für initial stärkere Immun- und Entzündungsreaktionen nach MAH Exposition. Bei den 9/18 Ziegen, die der Subgruppe MAH 2 zuzuordnen waren, war im Zeitraum der 8.-11. Woche nach der Inokulation sowohl anhand der Blutwerte als anhand der klinischen Befunde eine Regression erkennbar, welche nachfolgend in einen chronischen Verlauf des Infektionsgeschehens mündete. Im Zusammenhang mit dem chronischen Krankheitsverlauf wiesen die Tiere der Subgruppe MAH 2 und die der MAP-Gruppe etwa ab fünf Monaten nach der Inokulation im Blut vergleichbare Trends bezüglich der Proteinfractionen auf: Tendenziell zeigten sich niedrigere Albumin- und höhere Globulin-Konzentrationen, welche sich auch im Albumin-Globulin Quotienten und in den daraus berechneten Stewart-Variablen  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$  sowie  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$ , und  $\text{SIG}_{\text{TP}}$  widerspiegelten.

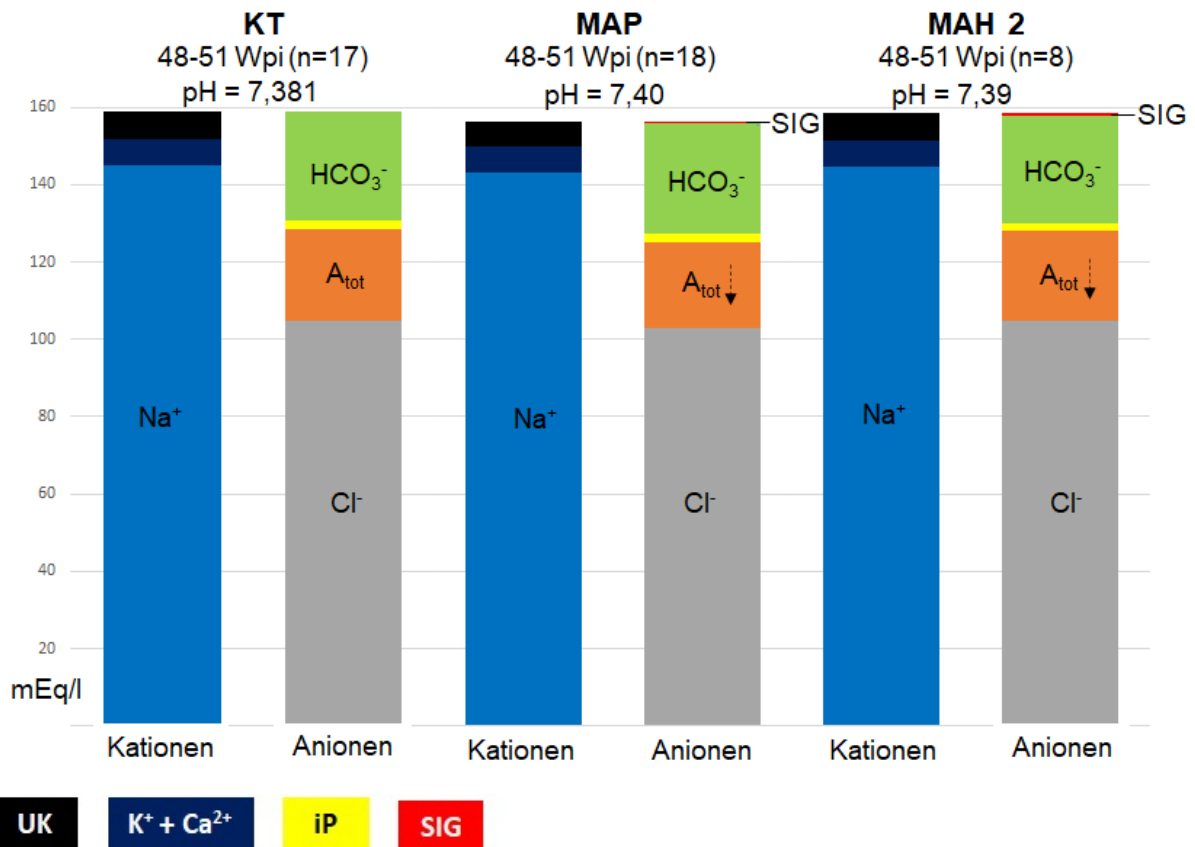
Verminderte Albumin-Konzentrationen im Zusammenhang mit chronischen Entzündungen und Erkrankungen sind ein bekanntes Phänomen (Stogdale 1981a). Dies ist bedingt durch die Synthese der Akute-Phase-Proteine in der Leber und die daher zeitgleich verminderte Synthese von Albumin (Petersen *et al.* 2004, Tothova *et al.* 2013). Die histo-pathologische

Untersuchung sowohl der MAP- als auch der MAH-exponierten Ziegen zeigte granulomatös-entzündliche Veränderungen der Darmwand (Krüger *et al.* 2014, Schinköthe *et al.* 2016a). Die niedrigen Albumin-Konzentrationen bei diesen Tieren könnten daher einerseits im Zusammenhang mit einer anhaltenden Gewebeschädigung und der Akute-Phase-Reaktion stehen, andererseits aber auch durch eine verminderte Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt bedingt sein. Auch bei an Paratuberkulose erkrankten Schafen wurden erniedrigte Konzentrationen von Albumin im Blut festgestellt (Scott *et al.* 1995). Die mit zunehmender Chronizität der Erkrankung tendenziell steigende SIG spricht jedoch eher für eine verminderte Intensität der Entzündungsreaktion (Zampieri *et al.* 2014), wobei sich analog zu den Albumin-Globulin-Quotienten Unterschiede zwischen den Berechnungsweisen für  $SIG_{TP}$  und  $SIG_{Alb}$  zeigten. Diese scheinbar widersprüchlichen Befunde ( $Alb\downarrow$ ;  $SIG\uparrow$ ) sprechen dafür, dass bei einem chronischen Erkrankungsgeschehen der langsame stetige Einfluss auf den SBH vom Organismus im Sinne der Homöostase erfolgreich ausgeglichen werden kann.

Ab etwa 7 Monate nach Exposition gegenüber den mykobakteriellen Pathogenen wiesen die steigenden Gamma Globulin-Konzentrationen auf eine vermehrte Antikörperproduktion hin (Stogdale 1981a). Diese quantitativen Veränderungen in den Serumproteingehalten führten im Gruppenmittel zu tendenziell höheren  $A_{tot TP}$ - sowie niedrigerem  $A_{tot Alb}$ -Werten, allerdings ohne gleichzeitige Veränderungen anderer SBH-Variablen und ohne Konsequenzen für den pH-Wert des Blutes. Ein Einfluss auf die traditionellen SBH-Variablen im Zusammenhang mit einer chronischen Mykobakterien-Infektion zeigte sich also nicht.

Repräsentative Ionogramme verdeutlichen hinsichtlich der Elektroneutralität, wie sich die tendenziell niedrigeren  $A_{tot Alb}$ - und höheren  $SIG_{Alb}$ -Werte ohne Beeinflussung der anderen SBH-Variablen für die Gruppen mit chronischem Infektionsverlauf (MAP, MAH 2) im Vergleich zu den Kontrolltieren darstellten (Abb. 6).





**Abbildung 6: Repräsentative Ionogramme für die Kontrolltiere sowie die beiden Tiergruppen mit chronischem Krankheitsverlauf (MAP, Subgruppe MAH 2) im Zeitraum 48. bis 51. Woche *post inoculationem* [alle Angaben in mEq/l]**

KT: Kontrolltiere; MAP: mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inokulierte Tiere; MAH 2: mit *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* inokulierte Tiere mit chronischem Krankheitsverlauf; n: Anzahl der Tiere; mEq/l: Milliäquivalent pro Liter;  $A_{tot}$ : acid total berechnet auf Basis von Albumin;  $HCO_3^-$ : Bikarbonat; UK: ungemessene Kationen;  $K^+ + Ca^{2+}$ : Kalium und Kalzium; iP: anorganisches Phosphat; SIG: strong ion gap berechnet auf Basis von Albumin.

#### Fazit:

- Chronische Mykobakterien-Infektionen führten primär zu Veränderungen des Serumproteinmusters; letztere zeigten sich nur in den Stewart-Variablen  $A_{tot\ TP}$ ,  $A_{tot\ Alb}$ ,  $SIG_{TP}$  und  $SIG_{Alb}$ .
- Die traditionellen SBH-Variablen wurden durch chronische Verläufe der induzierten mykobakteriellen Infektionen nicht signifikant beeinflusst.

### 5.1.6 Erkenntnisgewinn und Empfehlungen für weiterführende Arbeiten

In beiden dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studien konnten die Einflüsse des somatischen Wachstums, der Umstellung der Ernährungsphysiologie bei Ziegen innerhalb des ersten Lebensjahres (STUDIE I) sowie die Effekte mykobakterieller Infektionen mit sehr unterschiedlich verlaufenden klinischen Krankheitsbildern (STUDIE II) auf den Säure-Basen-Haushalt anhand der traditionellen SBH-Variablen und der Stewart-Variablen erfolgreich evaluiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass für eine korrekte Beurteilung des Säure-Basen-Status sowohl die traditionellen (auf Henderson und Hasselbalch basierenden) Berechnungen als auch das Modell der starken Ionen herangezogen werden müssen.

Die an Ziegen gewonnenen Erkenntnisse zu physiologischen Interaktionen zwischen SBH und der Anpassung der Verdauungsvorgänge in Richtung Rumination können mit Einschränkungen auf andere Wiederkäuer-Spezies, aber keinesfalls auf monogastrische Tiere übertragen werden. Unabhängig von der Tierart haben die Ergebnisse deutlich gemacht, dass physiologische Prozesse des somatischen Wachstums bei der Evaluierung des Säure-Basen-Haushaltes von juvenilen, wachsenden Tieren Beachtung finden müssen; dies betrifft insbesondere den Einfluss sich ändernder Serumproteinmuster. Weitere Untersuchungen zur korrekten Anwendung der Stewart-Variablen bei juvenilen, wachsenden Tieren sollten speziesspezifisch erfolgen.

Das gut charakterisierte Tiermodell, in dem mit Mykobakterien inokulierte Ziegen und nicht-inokulierte Kontrolltiere über ca. 14 Monate im direkten zeitlichen Vergleich parallel betrachtet wurden, erwies sich als sehr geeignet, um sowohl die physiologischen Einflüsse im ersten Lebensjahr als auch die pathophysiologischen Effekte einer chronischen Infektion longitudinal zu erfassen. Für die Untersuchung des durch MAH induzierten akuten, schweren Krankheitsverlaufes (bei einer Subgruppe) mit zum Teil tödlichem Ausgang erwies sich ein kürzerer Beobachtungszeitraum von bis zu 12 Wochen pi als ausreichend. In zukünftigen Studien sind für die Blutuntersuchungen auch engmaschigere Intervalle als die vier Wochen Zeiträume des angewandten Tiermodelles zu empfehlen.

Um die Auswirkungen anderer infektiöser oder nicht-infektiöser Erkrankungen auf den Säure-Basen-Haushalt aufzuklären, sind weiterführende longitudinale Studien innerhalb der jeweiligen Modell- bzw. Zieltierart nötig. Für experimentelle Studien wie für Feldstudien gilt, dass diese unter höchstmöglicher Vereinheitlichung von Haltungsbedingungen und Minimierung äußerer Umwelteinflüsse gestaltet werden sollten.

Sowohl die Berechnung von  $SID_{m3}$ ,  $SID_{m4}$ ,  $SID_{m5}$ ,  $A_{tot Alb}$ ,  $A_{tot TP}$ ,  $SIG_{Alb}$  und  $SIG_{TP}$  nach Constable als auch die Anwendung der von Constable ermittelten  $pK_a$ -Werte von Kälbern bei

Ziegen haben sich bewährt und können für nachfolgende Arbeiten empfohlen werden. Bei einem veränderten Albumin-Globulin-Quotienten sollten die Gesamtmenge an schwachen, nicht vollständig dissoziierten Säuren und auch die Variable SIG sowohl auf Basis von Totalprotein als auch auf Basis von Albumin berechnet werden. In STUDIE I und STUDIE II zeigte sich übereinstimmend, dass es bei Verwendung von nur einer der beiden Bezugsgrößen (also entweder Totalprotein oder Albumin) durchaus zu Fehleinschätzungen bei der Beurteilung der resultierenden Parameter kommen kann.

Weitere Untersuchungen zur Identifikation einer veränderten intraindividuellen Erreger-Wirt-Interaktion anhand der Stewart-Variablen, insbesondere SID, und eines möglichen Zusammenhanges zu Sepsis sind angezeigt. Aber auch eine weitere Klärung der Kausalität zwischen SIG und Akute-Phase-Reaktion sowie dem Entzündungsgeschehen scheint vielversprechend.

## 6 Zusammenfassung

### **Evaluierung der Säure-Basen-Homöostase während experimentell induzierter mykobakterieller Infektionen mit akutem und chronischem Verlauf bei Ziegen**

#### ***Einleitung und Aufgabenstellung***

Zwei Berechnungs- und Interpretationsweisen zur Evaluierung des Säure-Basen-Haushaltes (SBH) stehen aktuell zur Verfügung: die traditionellen Berechnungen, basierend auf der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Blutgase;  $\text{HCO}_3^-$ ; base excess, BE; Anionen Lücke, AG) und das Modell der starken Ionen (strong ion difference, SID; acid total,  $A_{\text{tot}}$ ; strong ion gap, SIG). Vor- und Nachteile beider Methoden werden kontrovers diskutiert. Die Auswirkungen von somatischem Wachstum bei Jungtieren, der Ernährungsphysiologie beim Wiederkäuer sowie die Effekte von Infektionskrankheiten auf den SBH wurden bislang nur unzureichend erfasst. Im internationalen Schrifttum waren vor Beginn dieser Untersuchungen keine altersabhängigen, speziesspezifischen SBH-Daten für Ziegen zu finden.

Die Ziele dieser Arbeit waren, die Auswirkungen von (i) somatischem Wachstum und Fütterung auf den SBH bei Ziegen im ersten Lebensjahr sowie (ii) von krankheits-assoziierten Veränderungen im Zusammenhang mit Mykobakterien-Infektionen auf den SBH zu charakterisieren. Für beide Fragestellungen bestand ein drittes Ziel darin, (iii) die traditionellen Variablen des SBH und die Stewart-Variablen vergleichend zu betrachten, um Aussagekraft und klinische Anwendbarkeit beider Betrachtungsweisen zu evaluieren.

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

Basierend auf einem etablierten und standardisierten Großtiermodell fanden zwei genehmigte Tierversuchsvorhaben an insgesamt 95 Ziegen statt. Alle Tiere wurden innerhalb des ersten Lebensmonats in die Versuchseinrichtung eingestallt. Insgesamt 70 Lämmer wurden anhand oraler Inokulation einer mykobakteriellen Exposition ausgesetzt (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP, n=49; *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, MAH, n=21). Nicht-inokulierte Kontrolltiere erhielten die übliche Milchaustauscher-Tränke (n=25). Die Dauer eines jeden Tierversuchs umfasste einen Zeitraum von bis zu 14 Monaten.

Nach statistischer Evaluierung wurden die Daten beider Versuchsreihen als eine Grundgesamtheit zusammengefasst und entsprechend zwei verschiedener Fragestellungen ausgewertet (STUDIE I und II): In STUDIE I wurden die Einflüsse von somatischem Wachstum und Ernährung innerhalb des ersten Lebensjahres bei gesunden Ziegen auf den SBH evaluiert (n=25; nicht-inokulierte Kontrolltiere). In STUDIE II wurden die Effekte der Mykobakterien-

Infektionen auf den SBH untersucht. In diese Auswertung konnten 48 der mit MAP inokulierten und 18 der mit MAH inokulierten Tiere eingeschlossen werden.

Venöse Blutproben wurden über die gesamte Versuchsdauer hinweg im Abstand von 4 Wochen gewonnen. Heparinisiertes Vollblut diente der Blutgasanalyse (inklusive der Ermittlung von BE) sowie der Messung der Konzentrationen von Elektrolyten und Metaboliten (Glucose,  $_L$ -Laktat). Im Serum wurden die Konzentrationen von anorganischem Phosphat (iP), Total Protein (TP), Globulinen und Albumin (Alb) bestimmt. Die SBH-Variablen AG, SID,  $A_{\text{tot}}$  und SIG wurden rechnerisch ermittelt.  $A_{\text{tot}}$  und SIG wurden sowohl auf Basis von Alb als auch von TP berechnet ( $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$ ,  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$ ,  $\text{SIG}_{\text{TP}}$ ).

### **Ergebnisse**

STUDIE I: Innerhalb der ersten 4–5 Lebensmonate war im Blut der gesunden Tiere ein signifikanter Abfall von Glucose,  $_L$ -Laktat und iP sowie ein signifikanter Anstieg von TP, Alb und Gamma Globulinen zu beobachten. Dadurch kam es zu einem Anstieg von  $A_{\text{tot Alb}}$  und  $A_{\text{tot TP}}$ . Nach dem 5. Lebensmonat zeigten sich über etwa 2 Monate hinweg tendenziell erniedrigte Blut-pH-Werte, die mit signifikant niedrigeren Konzentration an  $\text{HCO}_3^-$  sowie von BE einhergingen. Keine altersabhängigen Trends waren bezüglich der im Blut gemessenen Elektrolyt-Konzentrationen sowie für die SBH-Variablen AG, SID und SIG feststellbar.

STUDIE II: 50 % (9/18) der mit MAH inokulierten Ziegen entwickelten einen akuten schweren Krankheitsverlauf (Apathie, Fieber, Durchfall) und verstarben innerhalb der ersten 10 Wochen *post inoculationem* oder wurden basierend auf humanen Endpunkten euthanasiert. Dabei wurden signifikant niedrigere Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Alb, und TP sowie höhere Konzentrationen von Gamma Globulinen im Blut festgestellt. Es zeigte sich eine gemischte Säure-Base-Störung mit Alkalose (BE und  $\text{HCO}_3^-$  nicht signifikant verändert), bei signifikant niedrigeren Werten für SID,  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$  sowie erniedrigtem SIG. Die verbleibenden 9 der MAH-exponierten Tiere und alle mit MAP inokulierten Ziegen (n=48) entwickelten einen chronischen subklinischen Krankheitsverlauf. Mit zunehmender Chronizität zeigte sich ein tendenzieller Anstieg von Gamma Globulinen und TP im Blut. Zugleich war die Konzentration von Alb deutlich vermindert, woraus niedrigere  $A_{\text{tot Alb}}$  und höhere  $A_{\text{tot TP}}$  Werte resultierten.

### **Diskussion und Schlussfolgerungen**

Es wurden neue, grundlegende Erkenntnisse zum SBH bei somatisch und metabolisch reifenden Wiederkäuern im ersten Lebensjahr sowie bezüglich der Effekte mykobakterieller Infektionen gewonnen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Komplexität physiologischer oder infektions-assoziiertes Einflüsse auf den SBH nur anhand der zusätzlichen Betrachtung der Stewart-Variablen in ihrer Gesamtheit erfasst werden können und bestätigen die Bedeutung des Modells der starken Ionen für die korrekte Beurteilung des Säure-Basen-Status.

## 7 Summary

### **Acid-base homeostasis in goats during experimentally induced mycobacterial infections with acute and chronic course**

#### ***Introduction and objectives***

Two methods to evaluate acid-base-balance are currently available: the traditional Henderson-Hasselbalch centered calculations (blood gases;  $\text{HCO}_3^-$ ; base excess, BE; anion gap, AG) and the strong ion model (strong ion difference, SID; acid total,  $A_{\text{tot}}$ ; strong ion gap, SIG). The advantages and disadvantages of both methods have been discussed controversially. Effects of somatic growth, nutritional physiology in ruminants, and the effects of infections on the acid-base balance have not been evaluated sufficiently so far. There are no age-related, species-specific acid-base data in goats available in literature yet.

This work aimed to evaluate and characterize (i) effects of somatic growth and feeding on acid-base-balance in healthy goats within their first year of life as well as (ii) effects of mycobacterial infection. A third goal related to both topics was to (iii) apply and compare both Henderson-Hasselbalch centered variables and strong ion variables regarding their validity and clinical application.

#### ***Animals, material, and methods***

Two approved animal experiments were performed based on a well-known standardized goat model. Overall, 95 goats were included. All animals were introduced into the animal facility within their first month of life. In total, 70 lambs were exposed to mycobacteria via oral inoculation (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP, n=48; *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, MAH, n=18). Non-inoculated controls received normal milk replacer (n=25). Each experiment covered a period of up to 14 months.

After statistical evaluation, data of both animal experiments were combined and evaluated according to two research topics (STUDY I and II). STUDY I evaluated the effects of somatic growth and nutrition on acid-base-balance within the first year of life in healthy goats (n = 25). STUDY II evaluated the effects of mycobacterial infections on acid-base-balance in goats. In this evaluation 48 MAP inoculated and 18 MAH inoculated animals could be included.

Venous blood samples were collected every 4 weeks throughout the experiments. Heparinized whole blood was used for blood gas analyses (including evaluation of BE) as well as for measuring concentrations of electrolytes, total protein (TP), and albumin (Alb). Acid-base-

variables AG, SID,  $A_{\text{tot}}$ , and SIG were calculated.  $A_{\text{tot}}$  and SIG were calculated on basis of TP and Alb ( $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$ ,  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$ ,  $\text{SIG}_{\text{TP}}$ ).

### **Results**

STUDY I: Within the first 4–5 months of life in the blood of healthy goats, a significant decrease in concentrations of glucose, L-lactate, inorganic phosphate as well as a significant increase in concentrations of TP, Alb, and gamma globulins was observed. Consequently,  $A_{\text{tot Alb}}$  and  $A_{\text{tot TP}}$  increased. At 5 months of age, for about 2 months, blood-pH tended to be lower along with significantly lower concentrations of  $\text{HCO}_3^-$  and BE. No age-related trends were observed regarding measured concentrations of electrolytes in blood as well as in acid-base variables AG, SID, and SIG.

STUDY II: 50 % (9/18) of all goats inoculated with MAH developed acute severe clinical signs (apathy, fever, diarrhea). These animals died within the first 10 weeks *post inoculationem* or had to be euthanized based on previously defined humane endpoints. Thereby significantly lower concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Alb, and TP, as well as higher concentrations of gamma globulins were observed. A mixed acid-base-disturbance with alkalosis (BE and  $\text{HCO}_3^-$  not significantly altered), with significantly lower SID,  $A_{\text{tot Alb}}$ ,  $A_{\text{tot TP}}$  as well as lower SIG was present. The remaining 9 MAH-inoculated animals and all MAP-inoculated goats (n=48) developed a chronic subclinical course of the disease. With the progression of the disease, a tendential increase was seen concerning gamma globulin and TP. At the same time, the concentration of Alb in blood was markedly lowered, resulting in lower  $A_{\text{tot TP}}$  and higher  $A_{\text{tot TP}}$  values.

### **Discussion and Conclusions**

New, basic knowledge was obtained concerning physiological variability of acid-base-balance in somatically and metabolically maturing ruminants in their first year of life as well as related to the effects of mycobacterial infections. Results demonstrate that for the correct assessment of the acid-base-balance additional application of the Stewart variables is indispensable, especially regarding the complexity of physiological and infection-associated impacts. Results confirm the importance of the strong ion model to interpret the complexity of acid-base status.

## 8 Literaturverzeichnis

Agdestein, A., Johansen, T. B., Polaček, V., Lium, B., Holstad, G., Vidanović, D., Djonne, B. (2011):

Investigation of an outbreak of mycobacteriosis in pigs.

BMC Veterinary Research, 7(63), 1-7.

Agdestein, A., Olsen, I., Jorgensen, A., Djonne, B., und Johansen, T. B. (2014):

Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health.

Veterinary Research, 45(46).

Alberghina, D., Casella, S., Vazzana, I., Ferrantelli, V., Giannetto, C., und Piccione, G. (2010):  
Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis.

Veterinary Clinical Pathology, 39(3), 317-321.

Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J. M., und Juste, R. A. (2009):

Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle.

Foodborne Pathogens and Disease, 6(4).

Álvarez, J., de Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernández-Garayzábal, J. F., und Mateos, A. (2005):

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in fallow deer and wild boar in Spain.

Veterinary Record, 156, 212-213.

Anderson, K., Nagaraja, T., und Morrill, J. (1987):

Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early.

Journal of Dairy Science, 70(5), 1000-1005.



Arrazuria, R., Sevilla, I. A., Molina, E., Pérez, V., Garrido, J. M., Juste, R. A., und Elguezabal, N. (2015):

Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in the gut associated lymphoid tissue of slaughtered rabbits.

BMC Veterinary Research, 11(130).

Arrhenius, S. (1887):

Über die Dissoziation der in Wasser gelösten Stoffe.

Zeitschrift für Physikalische Chemie (Vol. 1, pp. 631).

Arsenault, R. J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P., und Napper, S. (2014);

From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Veterinary Research, 45(54).

Astrup, F., Andersen, O. S., Jrgensen, K., und Engel, K. (1960):

The acid-base metabolism. A new approach.

The Lancet, 275(7133), 1035-1039.

Austin, W. H., Lacombe, E., Rand, P. W., und Chatterjee, M. (1963):

Solubility of carbon dioxide in serum from 15 to 38 C.

Journal of Applied Physiology, 18(2), 301-304.

Bachmann, L., Homeier, T., Arlt, S., Brueckner, M., Rawel, H., Deiner, C., und Hartmann, H. (2009):.

Influence of different oral rehydration solutions on abomasal conditions and the acid-base status of suckling calves.

Journal of Dairy Science, 92, 1649–1659.

Baldwin, R. L. V., McLeod, K. R., Klotz, J. L., und Heitmann, R. N. (2004):

Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant.

Journal of Dairy Science, 87, E55-E65.

Bean, E. S., und Atkinson, D. E. (1984):

Regulation of the rate of urea synthesis in liver by extracellular pH. A major factor in pH homeostasis in mammals.

Journal of Biological Chemistry, 259(3), 1552-1559.

Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Sharp, J. M. (2001):

Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland.

Journal of Clinical Microbiology, 39(4), 1517–1521.

Bellocq, A., Suberville, S., Philippe, C., Bertrand, F., Perez, J., Fouqueray, B., Baud, L. (1998):  
Low Environmental pH Is Responsible for the Induction of Nitric-oxide Synthase in Macrophages: Evidence for involvement of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation.

Journal of Biological Chemistry, 273(9), 5086-5092.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., und Stryer, L. (2010).

In: Biochemie, 6. Ed.

Heidelberg: Springer.

Bidani, A., Wang, C. Z., Saggi, S. J., und Heming, T. A. (1998):

Evidence for pH Sensitivity of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Release by Alveolar Macrophages.

Lung 176(2), 111-121.

Biet, F., Boschioli, M. L., Thorel, M., und Guilloteau, L. A. (2005):

Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC).

Veterinary Research, 36, 411–436.

Biet, F., Sevilla, I. A., Cochard, T., Lefrancois, L. H., Garrido, J. M., und Heron, I. (2012):

Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains.

BMC Microbiology, 12.

- Borrmann, E., Möbius, P., Diller, R., und Köhler, H. (2011):  
Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains of type II and III in a standardized in vitro model.  
*Veterinary Microbiology*, 152(1-2), 101-111.
- Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidid-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., 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.
- Byrne, A. L., Bennett, M., Chatterji, R., Symons, R., Pace, N. L., und Thomas, P. S. (2014):  
Peripheral venous and arterial blood gas analysis in adults: are they comparable? A systematic review and meta-analysis.  
*Respirology*, 19(2), 168-175.
- Cameron, J. N. (1989).  
Acid-base homeostasis: past and present perspectives.  
*Physiological Zoology*, 62(4), 845-865.
- Clarke, C. J. (1997).  
The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species.  
*Journal of Comparative Pathology*, 116, 217-261.
- Collins, D. M., Gabric, D. M., und de Lisle, G. W. (1990):  
Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1591-1596.
- Collins, M. T. (2003):  
Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*.  
*Irish Veterinary Journal*, 56(11), 565-574.

Constable, P. D. (1997):

A simplified strong ion model for acid-base equilibria: application to horse plasma.  
Journal of Applied Physiology, 83, 297-311.

Constable, P. D. (1999):

Clinical Assessment of Acid-Base Status.  
Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 15(3), 447-471.

Constable, P. D. (2000):

Clinical assessment of acid-base status: Comparison of the Henderson-Hasselbalch and strong ion approaches.  
Veterinary Clinical Pathology, 29(4), 1-14.

Constable, P. D. (2002):

Calculation of variables describing plasma nonvolatile weak acids for use in the strong ion approach to acid-base balance in cattle.  
American Journal of Veterinary Research, 63(4), 482-490.

Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., und Muir, W. W. (1998):

Comparison of anion gap and strong ion gap as predictors of unmeasured strong ion concentration in plasma and serum from horses.  
American Journal of Veterinary Research, 59, 881-887.

Constable, P. D., und Stämpfli, H. R. (2005):

Experimental determination of net protein charge and  $A_{tot}$  and  $K_a$  of nonvolatile buffers in canine plasma.  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 19, 507-514.

Constable, P. D., Stämpfli, H. R., Navetat, H., Berchtold, J., und Schelcher, F. (2005):

Use of a quantitative strong ion approach to determine the mechanism for acid-base abnormalities in sick calves with or without diarrhea.  
Journal of Veterinary Internal Medicine, 19, 581-589.

Constable, P. D., Streeter, R. N., Koenig, G. J., Perkins, N. R., Gohar, H. M., und Morin, D. E. (1997):

Determinants and Utility of the Anion Gap in Predicting Hyperlactatemia in Cattle.  
*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(2), 71-79.

Corey, H. E. (2003):

Stewart and beyond: new models of acid-base balance.  
*Kidney International*, 64(3), 777-787.

Cullen, G. E., Keeler, H. R., und Robinson, H. W. (1925):

The pK' of the Henderson-Hasselbalch equation for hydrion concentration of serum.  
*The Journal of Biological Chemistry*, 66, 301-322.

Day, T. K. (2002):

Blood gas analysis.  
*Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 32(5), 1031-1048.

de Juan, L., Mateos, A., Domínguez, L., Sharp, J. M., und Stevenson, K. (2005):

Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis.  
*Veterinary Microbiology*, 106(3), 249-257.

Despieres, L., Cohen-Bacrie, S., Richet, H., und Drancourt, M. (2012):

Diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* mycobacteria causing lymphadenitis, France.  
*European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1373-1379.

Eisenberg, S. W., Koets, A. P., Hoeber, J., Bouman, M., Heederik, D., und Nielen, M. (2010):  
Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial dutch dairy farms.

*Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6310–6312.

Elisaf, M., Theodorou, J., Pappas, H., und Siamopoulos, K. C. (1993):

Acid-base and electrolyte abnormalities in febrile patients with bacteraemia.  
*The European journal of medicine*, 2(7), 404-407.

Eller, K. (2014):

Hypokalziämie und Hyperkalziämie: Ätiologie, Klinik, Diagnose und Therapie.

Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel.

Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 4(3), 40-45.

Falkinham III, J. O. (1996):

Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria.

Clinical Microbiology Reviews, 9(2), 177–215.

Falkinham III, J. O. (2009):

Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment.

Journal of Applied Microbiology, 107, 356–367.

Falkinham III, J. O., Norton, C. D., und Lechevallier, M. W. (2001):

Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems.

Applied and Environmental Microbiology, 67(3), 1225–1231.

Feldman, M., Soni, N., und Dickson, B. (2005):

Influence of hypoalbuminemia or hyperalbuminemia on the serum anion gap.

Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 146(6), 317-320.

Fencl, V., Jabor, A., Kazda, A., und Figge, J. (2000):

Diagnosis of metabolic acid-base disturbances in critically ill patients.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 162(6), 2246-2251.

Fencl, V., und Leith, D. E. (1993):

Stewart's quantitative acid-base chemistry: Applications in biology and medicine.

Respiration Physiology, 91(1), 1-16.

Figge, J., Jabor, A., Kazda, A., und Fencl, V. (1998):

Anion gap and hypoalbuminemia.

Critical Care Medicine, 26(11), 1807-1810.

Figge, J., Mydosh, T., und Fencl, V. (1992):

Serum proteins and acid-base equilibria: a follow-up.

Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 120(5), 713-719.

Figge, J., Rossing, T. H., und Fencl, V. (1991):

The role of serum proteins in acid-base equilibria.

Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 117(6), 453-467.

Fischer, S., Bergmann, A., Steffens, M., Trefz, P., Ziller, M., Miekisch, W., Reinhold, P. (2015):  
Impact of food intake on in vivo VOC concentrations in exhaled breath assessed in a caprine animal model.

Journal of Breath Research, 9(4), 047113.

Forde, T., Orsel, K., De Buck, J., Côté, S. D., Cuyler, C., Davison, T., Kutz, S. (2012):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in several herds of arctic caribou (*rangifer tarandus* ssp.).

Journal of Wildlife Diseases, 48(4), 918-924.

Funk, G. C. (2007):

Das Säure-Basen-Modell nach Stewart.

Wiener Klinische Wochenschrift, 119(13-14), 390-403.

Gäbel, G. (2005):

Säure-Base-Haushalt.

In: Physiologie der Haustiere. W. Engelhardt von und G. Breves (Hrsg.), 2. Ed.

Stuttgart: Enke, 268-276.

Glawischnig, W., Steineck, T., und Spargser, J. (2006):

Infections caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium* *hominissuis*, and *paratuberculosis* in free-ranging red deer (*cervus elaphus hippelaphus*) in Austria, 2001-2004.

Journal of Wildlife Diseases, 42(4), 724-731.

Gomez, J. L., Gunnerson, K. J., Song, M., Li, J., und Kellum, J. A. (2007):

Effects of hypercapnia on BP in hypoalbuminemic and Nagase analbuminemic rats.

Chest, 131(5), 1295-1300.

Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Sharp, J. M. (1999):  
Epidemiological study of Paratuberculosis in wild rabbits in Scotland.  
*Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1746–1751.

Gwozdz, J. M. (2010):  
Paratuberculosis (Johne's Disease). Australian and New Zealand Standard Diagnostic  
Procedures.  
Retrieved from [http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/jd/jd\\_home.cfm](http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/jd/jd_home.cfm)

Haist, V., Seehusen, F., Moser, I., Hotzel, H., Deschl, U., Baumgärtner, W., und Wohlsein, P.  
(2008):  
*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in 2 Pet Dogs, Germany.  
*Emerging Infectious Diseases*, 14(6), 988-990.

Hasselbalch, K. A. (1916):  
Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure  
desselben, und die Sauerstoffbindung des Blutes als Funktion der Wasserstoffzahl.  
Berlin: Julius Springer.

Hastings, A. B., und Sendroy Jr, J. (1925):  
The effect of variation in ionic strength on the apparent first and second dissociation constants  
of carbonic acid.  
*Journal of Biological Chemistry*, 65(2), 445-455.

Haussinger, D. (1997):  
Liver regulation of acid-base balance.  
*Mineral and Electrolyte Metabolism*, 23(3-6), 249-252.

Heming, T. A., Davé, S. K., Tuazon, D. M., Chopra, A. K., Peterson, J. W., und Bidani, A.  
(2001):  
Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor- $\alpha$  production by resident alveolar  
macrophages.  
*Clinical Science*, 101(3), 267-274.



Henderson, L. J. (1908):

The theory of neutrality regulation in the animal organism.

American Journal of Physiology - Legacy Content, 21(4), 427-448.

Herdt, T. H., und Sayegh, A. I. (2013a):

Digestion and Absorption: The Nonfermentative Processes.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5.Ed.

Missouri: Elsevier. 297-319.

Herdt, T. H., und Sayegh, A. I. (2013b):

Postabsorptive Nutrient Utilization.

B. G. Klein (Ed.), Cunnings Textbook of Veterinary Physiology (5th ed., pp. 342-358).

Missouri: Elsevier.

Hilborn, E. D., Yakrus, M. A., Covert, T. C., Harris, S. I., Donnelly, S. F., Schmitt, M. T., Stelma Jr., G. N. (2008):

Molecular comparison of *Mycobacterium avium* isolates from clinical and environmental sources.

Applied and Environmental Microbiology, 74(15), 4966–4968.

Hotchkiss, R. S., Moldawer, L. L., Opal, S. M., Reinhart, K., Turnbull, I. R., und Vincent, J.-L. (2016):

Sepsis and septic shock.

Nature reviews Disease primers, 2(1), 1-21.

Johansen, T. B., Agdestein, A., Lium, B., Jorgensen, A., und Djonne, B. (2014):

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in Swine Associated with Peat Used for Bedding.

BioMed Research International, 2014(189649).

Jorgensen, K., und Astrup, P. (1957):

Standard bicarbonate, its clinical significance, and a new method for its determination.

Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 9(2), 122-132.

Kellum, J. A. (2000):

Determinants of blood pH in health and disease.

Critical Care, 4(1), 6.

Kellum, J. A. (2005):

Clinical review: reunification of acid-base physiology.

Critical Care (London, England), 9(5), 500-507.

Kellum, J. A., Bellomo, R., Kramer, D. J., und Pinsky, M. R. (1995a):

Hepatic anion flux during acute endotoxemia.

Journal of Applied Physiology, 78(6), 2212-2217.

Kellum, J. A., Kramer, D. J., und Pinsky, M. R. (1995b):

Strong ion gap: A methodology for exploring unexplained anions.

Journal of Critical Care, 10(2), 51-55.

Kellum, J. A., Song, M., und Li, J. (2004a):

Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 286(4), R686-R692.

Kellum, J. A., Song, M., und Li, J. (2004b):

Science review: Extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications.

Critical Care, 8(5), 331.

Kim, J. W., Park, J. H., Park, J. W., Doh, H. J., Heo, G. S., und Lee, K. J. (1993):

Quantitative analysis of serum proteins separated by capillary electrophoresis.

Clinical Chemistry, 39(4), 689-692.

Klang, A., Staffler, C., Macherbauer, C., Spargser, J., Rütgen, B. C., Hinney, B., Künzel, F. (2014):

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection in a domestic European shorthair cat.

Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 101, 74-78.

Knowles, T. G., Edwards, J. E., Bazeley, K. J., Brown, S. N., Butterworth, A., und Warriss, P. D. (2000):

Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Veterinary Record*, 147(21), 593-598.

Koets, A. P., Eda, S., und Sreevatsan, S. (2015):

The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter.

*Veterinary Research*, 46(61).

Köhler, H., Gierke, F., und Möbius, P. (2008):

Paratuberculosis – current concepts and future of the diagnosis.

Paper presented at the XXV. Jubilee World Buiatrics Congress.

Köhler, H., Soschinka, A., Meyer, M., Kather, A., Reinhold, P., und Liebler-Tenorio, E. (2015):

Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection.

*BMC Veterinary Research*, 11(1), 1-19.

Kopecna, M., Ondrus, S., Literak, I., Klimes, J., Horvathova, A., Moravkova, M., Pavlik, I. (2006):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the central european carpathians.

*Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 691-695.

Kraut, J. A., und Madias, N. E. (2007):

Serum anion gap: its uses and limitations in clinical medicine.

*Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(1), 162-174.

Kriz, P., Jahn, P., Bezdekova, B., Blahutkova, M., Mrlik, V., Slana, I., und Pavlik, I. (2010):

*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* Infection in Horses.

*Emerging Infectious Diseases*, 16(8), 1328-1329.

Krüger, C., Köhler, H., und Liebero-Tenorio, E. M. (2014):  
Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
Veterinary Pathology Online First, 1-15.

Krüger, C., Köhler, H., und Liebler-Tenorio, E. M. (2015):  
Cellular composition of granulomatous lesions in gut-associated lymphoid tissues of goats during the first year after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.  
Veterinary Immunology and Immunopathology, 163(1), 33-45.

Kushner, I. (1982):  
The phenomenon of the acute phase response.  
Annals of the New York Academy of Sciences, 389(1), 39-48.

Landers, J. P. (1995):  
Clinical capillary electrophoresis.  
Clinical Chemistry, 41(4), 495-509.

Lardner, A. (2001):  
The effects of extracellular pH on immune function.  
Journal of Leukocyte Biology, 69(4), 522-530.

Larsen, G. (2015):  
A reliable ruminant for research.  
Lab Animal, 44(9), 337.

Liapi, M., Botsaris, G., Slana, I., Moravkova, M., Babak, V., Avraam, M., Pavlik, I. (2015):  
*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Sheep Strains Isolated from Cyprus Sheep and Goats.  
Transboundary and Emerging Diseases, 62(2), 223-227.

Linden, R. J., und Norman, J. (1971):  
The imprecision arising from the application of the Henderson-Hasselbalch relationship to the blood of anaesthetized dogs.  
The Journal of Physiology, 215, 491-507.

Loken, H., Havel, R., Gordan, G., und Whittington, S. (1960):

Ultracentrifugal analysis of protein-bound and free calcium in human serum.

Journal of Biological Chemistry, 235(12), 3654-3658.

Lyford, S., und Huber, J. T. (1988):

Digestion, metabolism and nutrient needs in preruminants.

The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition (Ed. DC Church). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 401.

Mackintosh, C. G., Labes, R. E., Clark, R. G., de Lisle, G. W., und Griffin, J. F. T. (2007):

Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

New Zealand Veterinary Journal, 55(1), 23-29.

Manning, E. J. B., und Collins, M. T. (2001):

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis.

Revue scientifique et technique Office International Epizootics, 20(1), 133-150.

Matlova, L., Dvorska, L., Ayele, W. Y., Bartos, M., Amemoir, T., und Pavlik, I. (2005):

Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with Mycobacteria as a supplement.

Journal of Clinical Microbiology, 43(3), 1261–1268.

McAuliffe, J. J., Lind, L. J., Leith, D. E., und Fencel, V. (1986):

Hypoproteinemic alkalosis.

The American Journal of Medicine, 81(1), 86-90.

McCarthy, R. D., und Kesler, E. M. (1956):

Relation between age of calf, blood glucose, blood and rumen levels of volatile fatty acids, and in vitro cellulose digestion.

Journal of Dairy Science, 39(9), 1280-1287.

McCullough, S. M., und Constable, P. D. (2003):

Calculation of the total plasma concentration of nonvolatile weak acids and the effective dissociation constant of nonvolatile buffers in plasma for use in the strong ion approach to acid-base balance in cats.

American Journal of Veterinary Research, 64(8), 1047-1051.

Merkal, R. S., und Curran, B. J. (1974):

Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Applied Microbiology, 28(2), 276-279.

Mijs, W., de Haas, P., Rossau, R., Van der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., und van Soolingen, D. (2002):

Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 1505–1518.

Miyazawa, K., und Inoue, K. (1990):

Complement activation induced by human C-reactive protein in mildly acidic conditions.

The Journal of Immunology, 145(2), 650-654.

Mortier, R., Barkema, H. W., Bystrom, J. M., Illanes, O., Orsel, K., Wolf, R., De Buck, J. (2013):

Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using pathology and tissue culture.

Veterinary Research, 44(94).

Motiwala, A. S., Amonsin, A., Strother, M., Manning, E. J. B., Kapur, V., und Sreevatsan, S. (2004):

Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animal species.

Journal of Clinical Microbiology, 42(4), 1703–1712.

Nagy O, Tóthová C, Nagyová V, und Kováč G. (2015):

Comparison of serum protein electrophoretic pattern in cows and small ruminants.

Acta Veterinaria(84), 187-195.

Nagy, O., Tóthová, C., und Kováč, G. (2014):

Age-related changes in the concentrations of serum proteins in calves.

Journal of Applied Animal Research, 42(4), 451–458.

Naser, S. A., Thanigachalam, S., Dow, C. T., und Collins, M. T. (2013):

Exploring the role of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a pilot study.

Gut Pathogens, 5(14).

Nielsen, S. S., und Toft, N. (2009):

A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe.

Preventive Veterinary Medicine, 88(1), 1-14.

Oh, M. S., und Carroll, H. J. (1977):

The Anion Gap.

New England Journal of Medicine, 297(15), 814-817.

Paladini, G., und Sala, P. G. (1981):

Effect of Chemotherapy on the Anion Gap in Multiple Myeloma.

Acta Haematologica, 66(1), 31-34.

Petersen, H. H., Nielsen, J. P., und Heegaard, P. M. H. (2004):

Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry.

Veterinary Research, 35(2), 163-187.

Piccione, G., Monteverde, V., Rizzo, M., Vazzana, I., Assenza, A., Zumbo, A., und Niutta, P. P. (2014):

Reference intervals of some electrophoretic and haematological parameters in Italian goats: comparison between Girgentana and Aspromontana breeds.

Journal of Applied Animal Research, 42(4), 434-439.

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

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

Annals of Animal Science, 11(2), 251-260.

Putnam, R. W., und Roos, A. (1991):

Which value for the first dissociation constant of carbonic acid should be used in biological work?

American Journal of Physiology-Cell Physiology, 260(5), C1113-C1116.

Quigley, J. D., und Bernard, J. K. (1992):

Effects of nutrient source and time of feeding on changes in blood metabolites in young calves.

Journal of Animal Science, 70(5), 1543-1549.

Raphael, K. L., Murphy, R. A., Shlipak, M. G., Satterfield, S., Huston, H. K., Sebastian, A., Fried, L. F. (2016):

Bicarbonate Concentration, Acid-Base Status, and Mortality in the Health, Aging, and Body Composition Study.

Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 11(2), 308-316.

Rauch, I., Müller, M., Decker, T. (2013):

The regulation of inflammation by interferons and their STATs.

JAK-STAT, 2(1)

Reinhold, P., Hartmann, H., und Constable, P. D. (2010):

Characterisation of acid-base abnormalities in pigs experimentally infected with *Chlamydia suis*.

Veterinary Journal, 184(2), 212-218.

Rixen, D., Raum, M., Bouillon, B., Lefering, R., und Neugebauer, E. (2001):

Base deficit development and its prognostic significance in posttrauma critical illness: an analysis by the trauma registry of the Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie.

Shock, 15(2), 83-89.

Robinson, N. E. (2013a):

Acid-Base Homeostasis.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5. Ed.

Missouri: Elsevier. 549-558



Robinson, N. E. (2013b):

Control of Ventilation.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5. Ed.

Missouri: Elsevier. 529-535

Robinson, N. E. (2013c):

Gas Transport in the Blood.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5. Ed.

Missouri: Elsevier. 522-528

Rossing, T. H., Maffeo, N., und Fencl, V. (1986):

Acid-base effects of altering plasma protein concentration in human blood in vitro.

Journal of Applied Physiology, 61(6), 2260-2265.

Rowe, M. T., und Grant, I. R. (2006):

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics.

Letters in Applied Microbiology, 42, 305–311.

Scanu, A. M., Bull, T. J., Cannas, S., Sanderson, J. D., Sechi, L. A., Dettori, G., Hermon-Taylor, J. (2007):

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cases of Irritable Bowel Syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: Common neural and immune pathogenicities.

Journal of Clinical Microbiology, 45(12), 3883–3890.

Schinköthe, J., Köhler, H., und Liebler-Tenorio, E. M. (2016a):

Characterization of tuberculous granulomas in different stages of progression and associated tertiary lymphoid tissue in goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 47, 41-51.

Schinköthe, J., Möbius, P., Köhler, H., und Liebler-Tenorio, E. M. (2016b):

Experimental Infection of Goats with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*: a Model for Comparative Tuberculosis Research.

Journal of Comparative Pathology, 155(2-3), 218-230.

Scott, P., Clarke, C., und King, T. (1995):

Serum protein concentrations in clinical cases of ovine paratuberculosis (Johne's disease).  
Veterinary Record (United Kingdom).

Servinghaus, J. W., Astrup, P., und Murray, J. F. (1998):

Blood Gas Analysis and Critical Care Medicine.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 157(4), S114-S122.

Siggaard-Andersen, O., und Fogh-Andersen, N. (1995):

Base excess or buffer base (strong ion difference) as measure of a non-respiratory acid-base disturbance.

Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 39, 123-128.

Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., und et al. (2016):

The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3).

JAMA, 315(8), 801-810.

Singer, R. B., und Hastings, A. B. (1948):

An improved clinical method for the estimation of disturbances of the acid-base balance of human blood.

Medicine, 27(2), 223.

Smith, I., Kumar, P., Molloy, S., Rhodes, A., Newman, P. J., Grounds, R. M., und Bennett, E. D. (2001):

Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care.

Intensive Care Medicine, 27(1), 74-83.

Smith, M. C., und Sherman, D. M. (2011):

Wasting Diseases.

In: Goat medicine: John Wiley und Sons. 691-700

Sorensen, S. (1909):

Enzyme studies II. The measurement and importance of the hydrogen ion concentration in enzyme reactions.

Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, 8(1).

Sörensen, S. P. L. (1912):

Über die Messung und Bedeutung der Wasserstoffionen-konzentration bei biologischen Prozessen.

Ergebnisse der Physiologie, 12(1), 393-532.

Stämpfli, H. R., und Constable, P. D. (2003):

Experimental determination of net protein charge and  $A_{tot}$  and  $K_a$  of nonvolatile buffers in human plasma.

Journal of Applied Physiology, 95(2), 620-630.

Stämpfli, H. R., Misiaszek, S., Lumsden, J. H., Carlson, G. P., und Heigenhauser, G. J. (1999):

Weak acid-concentration  $A_{tot}$  and dissociation constant  $K_a$  of plasma proteins in racehorses.

Equine Veterinary Journal. Supplement (30), 438-442.

Stämpfli, H. R., Schoster, A., und Constable, P. D. (2014):

Clinical utility of serum biochemical variables for predicting acid–base balance in critically ill horses.

Veterinary Clinical Pathology, 43(4), 547-556.

Stämpfli, H. R., Taylor, M., McNicoll, C., Gancz, A. Y., und Constable, P. D. (2006):

Experimental determination of net protein charge,  $[A]_{tot}$ , and  $K_a$  of nonvolatile buffers in bird plasma.

Journal of Applied Physiology, 100, 1831–1836.

Stevenson, K. (2015):

Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review.

Veterinary Research, 46(64).

Stewart, D., Vaughan, J., Stiles, P., Noske, P., Tizard, M., Prowse, S., Jones, S. (2007):

A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats.

Veterinary Microbiology, 122(1), 83-96.

Stewart, P. A. (1978):

Independent and dependent variables of acid-base control.

Respiration Physiology, 33(1), 9-26.

Stewart, P. A. (1983):

Modern quantitative acid–base chemistry.

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 61(12), 1444-1461.

Stewart, P. A. (2009a):

Strong Ion plus Carbon Dioxide.

In: Stewart's Textbook of Acid-Base. J. A. Kellum und P. W. Elbers (Hrsg.), 2 ed.

Amsterdam: AcidBase.org 111-132.

Stewart, P. A. (2009b):

Strong Ions and the Strong ion Difference.

In: Stewart's Textbook of Acid-Base. J. A. Kellum und P. W. Elbers (Hrsg.), 2 ed.

Amsterdam: AcidBase.org. 55-70.

Stewart, P. A. (2009c):

Strong Ions plus Carbon Dioxide plus Weak Acid.

In: Stewart's Textbook of Acid-Base. J. A. Kellum und P. W. Elbers (Hrsg.), 2 ed.

Amsterdam: AcidBase.org. 133-166.

Stewart, P. A. (2009d):

Weak Electrolytes and Buffers.

In: Stewart's Textbook of Acid-Base. J. A. Kellum und P. W. Elbers (Hrsg.), 2 ed., 71-110.

Amsterdam: AcidBase.org.

Stogdale, L. (1981a):

Correlation of Changes in Blood Chemistry with Pathological Changes in the Animal's Body: I  
Serum Nutrients and Proteins.

Journal of the South African Veterinary Association, 52(1), 57-63.

Stogdale, L. (1981b):

Correlation of Changes in Blood Chemistry with Pathological Changes in the Animal's Body: II  
Electrolytes, Kinde Function Tests, Serum Enzymes, and Liver Function Tests.

Journal of the South African Veterinary Association, 52(2), 155-164.

Sweeney, R. W. (1996):

Transmission of paratuberculosis.

Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 12(2), 305-312.

Sweeney, R. W., Collins, M. T., Koets, A. P., McGuirk, S. M., und Roussel, A. J. (2012):

Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species.

Journal of Veterinary Internal Medicine, 26, 1239-1250.

Thorel, M., Krichevsky, M., und Lévy-Frébault, V. 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.

Tothova, C., Nagy, O., und Kovac, G. (2013):

The serum protein electrophoretic pattern and acute phase protein concentrations in calves  
with chronic respiratory diseases.

Polish Journal of Veterinary Sciences, 16(2), 385-386.

Tóthová, C., Nagy, O., und Kováč, G. (2014):

Changes in the concentrations of serum protein fractions in calves with age and nutrition.

Italian Journal of Animal Science, 13(2993), 107-111.

Tuhay, G., Pein, M. C., Masevicius, F. D., Kutscherauer, D. O., und Dubin, A. (2008):

Severe hyperlactatemia with normal base excess: a quantitative analysis using conventional  
and Stewart approaches.

Critical Care, 12(3), 1-7.

Van Slyke, D. D., Hastings, A. B., Hiller, A., und Sendroy, J. (1928):

Studies of gas and electrolyte equilibria in blood: XIV. the amount of alkali bound by serum albumin and globulin.

Journal of Biological Chemistry, 79, 769-780.

Van Slyke, D. D., und Neill, J. M. (2002):

The determination of gases in blood and other solutions by vacuum extraction and manometric measurement. I.

Journal of Biological Chemistry, 277(27), e16.

Van Slyke, D. D., und Sendroy, J. (1928):

Studies of gas and electrolyte equilibria in blood: XV. Line charts for graphic calculations by the Henderson-Hasselbalch equation, and for calculating plasma carbon dioxide content from whole blood content.

Journal of Biological Chemistry, 79(2), 781-798.

Van Slyke, D. D., Wu, H., und McLean, F. C. (1923).

Studies of gas and electrolyte equilibria in the blood V. Factors controlling the electrolyte and water distribution in the blood.

Journal of Biological Chemistry, 56(3), 765-849.

Van Soest, P. J. (1994):

Nutritional ecology of the ruminant.

Cornell university press.

Verlander, J. W. (2013a):

Acid-Base Balance.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5. Ed.

Missouri: Elsevier. 488-494

Verlander, J. W. (2013b):

Solute Reabsorption.

In: Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology. B. G. Klein (Hrsg.), 5. Ed.

Missouri: Elsevier. 469-480

- Vincent, J.-L., Dubois, M.-J., Navickis, R. J., und Wilkes, M. M. (2003):  
Hypoalbuminemia in Acute Illness: Is There a Rationale for Intervention? A Meta-Analysis of Cohort Studies and Controlled Trials.  
*Annals of Surgery*, 237(3), 319-334.
- Waisman, Y., Eichacker, P. Q., Banks, S. M., Hoffman, W. D., MacVittie, T. J., und Natanson, C. (1993):  
Acute hemorrhage in dogs: construction and validation of models to quantify blood loss.  
*Journal of Applied Physiology*, 74(2), 510-519.
- Watson, P. D. (1999):  
Modeling the effects of proteins on pH in plasma.  
*Journal of Applied Physiology*, 86(4), 1421-1427.
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., und Reddacliff, L. A. (2004):  
Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment.  
*Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2989-3004.
- Whittington, R. J., und Windsor, P. A. (2009):  
In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis.  
*Veterinary Journal*, 179(1), 60-69.
- Wilkes, P. (1998):  
Hypoproteinemia, strong-ion difference, and acid-base status in critically ill patients.  
*Journal of Applied Physiology*, 84(5), 1740-1748.
- Willard, M. D., und Tvedten, H. (2006):  
Ergüsse und andere Flüssigkeitsansammlungen.  
*Labordiagnostik in der Kleintierpraxis* (1 ed., pp. 305-310). München: Elsevier.
- Windsor, P. A., und Whittington, R. J. (2010):  
Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease.  
*Veterinary Journal*, 184(1), 37-44.

Wohl, J. S., Baggs, A., Lin, J. L., Fink, M. P., und Dhupa, N. (1997):

Use of jugular venous blood, compared with mixed venous blood, for measurement of venous oxygenation indices in a porcine model of endotoxic shock.

American Journal of Veterinary Research, 58(8), 910-914.

Worthley, L. (1999):

Strong ion difference: a new paradigm or new clothes for the Acid-base emperor.

Critical Care and Resuscitation, 1(2), 211.

Zampieri, F. G., Kellum, J. A., Park, M., Ranzani, O. T., Barbeiro, H. V., de Souza, H. P., Pinheiro da Silva, F. (2014):

Relationship between acid–base status and inflammation in the critically ill.

Critical Care, 18(4), R154-R154.

Zander, R. (1992):

Meßfehler bei der Bestimmung von Elektrolytkonzentrationen mit ionenselektiven Elektroden (ISE) bei Anwesenheit von anorganischen oder metabolisierbaren Anionen.

Transfusion Medicine and Hemotherapy, 19(5), 221-225.

Zander, R. (1995):

Die korrekte Bestimmung des Base Excess (BE, mmol/l) im Blut.

Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie, 30 (Suppl. 1), 36-38.

Zander, R. (2002):

Diagnostische und therapeutische Bedeutung von Base Excess und Laktatkonzentration. [Relevance of Base Excess and Lactate Concentration on Diagnosis and Treatment].

Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie, 37(06), 343-346.

Zweens, J., Frankena, H., van Kampen, E. J., Rispens, P., und Zijlstra, W. G. (1977):

Ionic composition of arterial and mixed venous plasma in the unanesthetized dog.

American Journal of Physiology - Renal Physiology, 233(5), F412-F415.



## 9 Anhang

### Anlage A1

In der Software des Blutanalysegerätes ABL7 Series der Firma inkludierte Formeln  
(aus dem Reference Manual, 9. Kapitel, Parameters, Equations)

**$c\text{HCO}_3^-$ , aktuelles Bicarbonat:**

$$c\text{HCO}_3^- = 0,23 \times p\text{CO}_2 \times 10^{(\text{pH}-\text{pKp})} \dots\dots\dots (\text{A1.1})$$

wobei:

$$\text{pKp} = 6,125 - \log[1 + 10^{(\text{pH}-8,7)}]$$

(der so kalkulierte  $c\text{HCO}_3^-$  Wert beinhaltet: Bicarbonat, Karbonat, und Carbamate im Plasma)

**$c\text{HCO}_3^-$  (st), Standard-Bicarbonat:**

$$c\text{HCO}_3^-(\text{P, st}) = 24,47 + 0,919Z + Z a'(Z - 8) \dots\dots\dots (\text{A1.2})$$

wobei

$$a' = 4,04 \times 10^{-3} + 4,25 \times 10^{-4} \text{ctHb}$$

$$Z = c\text{Base}(\text{B}) - 0,3062 \times \text{ctHb} \times (1 - s\text{O}_2^2)$$

**$c\text{Base}(\text{B})$ , Aktueller Base Excess:**

$$c\text{Base}(\text{B}) = \frac{0,5 \times (8a' - 0,919)}{a' + 0,5 \sqrt{\left(\frac{0,919 - 8a'}{a'}\right)^2 - \left(\frac{4 \times (24,47 - c\text{HCO}_3^-(5,33))}{a'}\right)}} \dots\dots\dots (\text{A1.3})$$

wobei

$$a' = 4,04 \times 10^{-3} + 4,25 \times 10^{-4} \text{ctHb}$$

$$c\text{HCO}_3^-(5,33) = 0,23 \times 5,33 \times 10^{\left[\frac{\text{pH}(\text{st}) - 6,161}{0,9524}\right]}$$

$$\text{pH}(\text{st}) = \text{pH} + \log\left(\frac{5,33}{p\text{CO}_2}\right) \left(\frac{\text{pH}(\text{Hb}) - \text{pH}}{\log p\text{CO}_2(\text{Hb}) - \log(7,5066 p\text{CO}_2)}\right)$$

$$\log p\text{CO}_2^2(\text{Hb}) = -1,7674 \times 10^{-2} \text{ctHb} + 3,4046 + 2,12 \times 10^{(-0,15158 \text{ctHb})}$$

**$c\text{Base}(\text{Ecf})$ , Standard Base Excess, BE (extracellular fluid – ecf):**

$$c\text{Base}(\text{Ecf}) = c\text{Base}(\text{B}) \text{for ctHb} = 3 \text{mmol/l} \dots\dots\dots (\text{A1.4})$$

## **Anlage A2**

### **Poster**

**Redlberger, S.;** Fischer, S.; Köher, H.; Reinhold, P. (2018)

*Acid-base homeostasis in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in goats.*

Tagung der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie",  
21. – 23. Februar 2018, Wien (Österreich).

# Acid-base homeostasis in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in goats

Stefanie Redlberger<sup>1,2</sup>, Sina Fischer<sup>1</sup>, Heike Köhler<sup>1</sup>, Petra Reinhold<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for animal health, Institute of Molekulare Pathogenesis, Jena, Germany  
<sup>2</sup> University of Veterinary Medicine Vienna, Anaesthesiology and Perioperative Intensive-Care Medicine, Vienna, Austria

## 1. Introduction

In the current literature, data assessing the acid-base equilibrium in animals infected with nontuberculous Mycobacteria (NTM) are rare.

Traditionally acid-base status is evaluated by application of the **Henderson-Hasselbalch equation**. pH, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Anion Gap (AG) and Base Excess (BE) are interpreted for respiratory, metabolic or mixed disorders<sup>(1)</sup>. According to the novel **strong ion model**<sup>(Fig.1)</sup> acid-base status in plasma is determined by changes in electrolytes (strong ion difference, SID), plasma proteins (acid total, A<sub>tot</sub>) and not measurable cations and anions in plasma (strong ion gap, SIG)<sup>(2,3)</sup>.

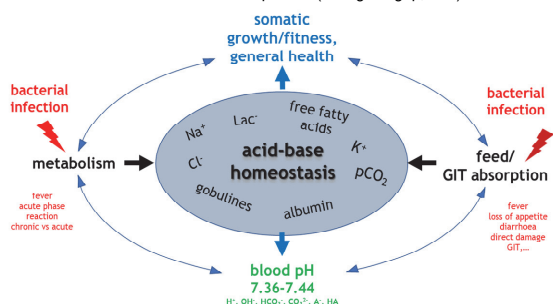


Figure 1: Acid-base homeostasis according to Stewart, keeping blood pH in physiological ranges

## 2. Objective, Hypothesis

This study aimed to evaluate and compare traditional and strong ion model acid-base variables in healthy goats and goats infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) or *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH). We suggested that (i) significant differences in acid-base equilibrium between healthy and NTM infected goats will be found, and (ii) that the strong ion variables are superior compared to Henderson Hasselbalch variables.

## 3. Animals, Material and Method

### 3.1. Study design

Blood samples of 91 goats (48 inoculated with MAP, 18 MAH and 25 controls) were collected within 4 week-intervals during their first 15 months of life<sup>(Fig.2)</sup>.

	blood sampling											
	inoculation			1st interval			2nd interval			3rd interval		
	n=48	n=47	n=36	n=34	n=23	n=18	n=25	n=23	n=20	n=17	n=9	n=8
MAP												
MAH	n=18	n=17	n=15									
controls												
wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23	24-27	28-31	32-35	36-39	40-43	44-47
wl	2-6	7-9	10-13	14-17	18-21	22-25	26-29	30-33	34-37	38-41	42-45	46-49
												50-53
												54-57

Figure 2: study design, wpi = week post infectionem, wl = week of life

### measured values

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, L-Lactate, pH, pCO<sub>2</sub>, BE\*  
Total protein, inorganic Phosphate\*\*  
Albumin, Globuline\*\*\*

\* blood-gas analyzer ABL725 Series, Radiometer Copenhagen \*\*Spectrophotometry  
\*\*\* Capillaryelectrophoresis

### calculated values

→ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
→ AG  
→ SID, SIG



Fig. 3: Goat kid receiving milk replacer, Foto: FLI Jena

### 3.2. Inoculation

orally via milk replacer<sup>(Fig.3)</sup>, 10 x every 2-3 days from the 2<sup>nd</sup> to the 6<sup>th</sup> week of life  
total inoculation dosage per animal:  
MAP = 2.6 x 10<sup>8</sup> colony forming units (cfu)  
MAH = 5.4 x 10<sup>8</sup> cfu  
Controls received pure milk replacer

## 4. Results

2 forms of infection

observed clinically<sup>(4)</sup>  
confirmed by pathological examination<sup>(4,5)</sup>  
reflected by acid-base variables

acute severe

chronic

- 50 % of MAH infected (9/18)
- death or euthanasia bevor 11<sup>th</sup> wpi
- signs of multi-organ-failure, systemic inflammatory response syndrom<sup>(4,5)</sup>
- failure of acid-base homeostasis

- all MAP infected (48/48)
- 50 % of MAH infected (9/18)
- changes in serum protein profiles affecting acid-base homeostasis, fully compensated

### 4.3. Acid-base equilibrium during acute severe NTM-infection

Within the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi significantly lower blood concentrations of albumin, gamma globulin and total protein associated by a significantly reduced albumin: globulin ratio compared to controls and chronic NTM-infection were found. Concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> were significantly lower compared to controls and chronic NTM-infection. This resulted in significantly reduced levels of SID and A<sub>tot</sub><sup>(Fig.4)</sup>.

Acid-base status indicated alkalosis, but normal BE- and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-concentrations.

Only the strong ion model revealed a mixed acid-base disorder: a SID acidosis overwhelmed by an A<sub>tot</sub> alkalosis.

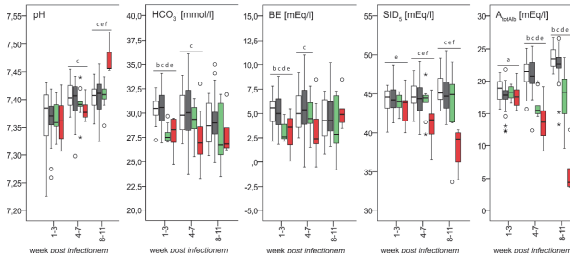


Figure 4: pH values and concentrations of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BE, SID<sub>s</sub> and A<sub>tot</sub> evaluated within the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> wpi up to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> wpi; assessed in controls (white), MAP infected (grey), MAH infected with chronic infection (green), and MAH infected with acute severe infection (red); significant differences between groups within time point (Mann-Whitney-U test, p<0.05) a: controls/MAP, b: controls/MAH chr inf, c: controls/MAH ac inf, d: MAP/MAH chr inf, e: MAP/MAH ac inf, f: MAH ac inf/MAH chr inf.

### 4.4. Changes acid-base equilibrium associated to chronic infection



## 5. Conclusions

- (i) Acute and chronic form of NTM-infection do effect acid-base equilibrium.
- (ii) Acute form of infection leading to failure of homeostasis, death or euthanasia was mainly characterised by alkalosis, significantly lower SID and A<sub>tot</sub>.
- (iii) Only the strong ion variables were able to differentiate alterations in acid-base equilibrium during acute and chronic NTM-infection.

## 6. Literature

- (1) Constable, P. D. (2000). *Veterinary Clinical Pathology* 29(4): 1-14.
- (2) Stewart, P. A. (1983). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 61(12): 1444-1461.
- (3) Constable, P. D. (1997). *Journal of Applied Physiology* 83: 297-311.
- (4) Schinköthe, J., et al. (2016). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 41-51
- (5) Schinköthe, J., et al. (2016). *J. Comp. Pathol.* 155(2-3): 218-230.



contact: s.redl@hotmail.com, petra.reinhold@fli.de

**Anlage A3**

**Supporting material STUDIE II, S1 Table**

**S1 Table: Feeding regime**

age	feed				
<b>1<sup>st</sup> – 6<sup>th</sup> week of life</b>	colostrum, milk - raised conventionally with their mothers				
<b>6<sup>th</sup> – 51<sup>st</sup> week of life</b>	meadow hay ad libitum				
age	feedstuff	manufacturer	content		
<b>6<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> week of life</b>	milk replacer	Denkamilk Capri-Ovi (Germany)	analytical	raw protein	21.5 %
			key	crude fat	24.2 %
			constitutions	crude fiber	0.0 %
				crude ash	7.6 %
				phosphorus	0.63 %
			food additives	copper sulfate	2 mg
			per kg	vitamin A	6.000 UI
				vitamin D3	2.000 UI
				vitamin E	150 UI
			composition	whey flour, vegetable oil (coconut, palm, rape), wheat protein hydrolyzed, wheat flour	
<b>6<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> week of life</b>	concentrates for goat kids	LHG Schmölln (Germany)	analytical	raw protein	16.0 %
			key	crude fat	2.2 %
			constitutions	crude fiber	6.1 %
				crude ash	7.0 %
				calcium	1.1 %
				phosphorus	0.5 %
			food additives	sodium	0.15 %
			per kg	vitamin A	15.000 UI
				vitamin D3	1.500 UI
				vitamin E	13.0 mg
			composition	barley, wheat, soya beans extract meal, wheat bran, dried sugar beet plump, sugar beet molasses	
<b>6<sup>th</sup> – 51<sup>st</sup> week of life</b>	dairy concentrates for goats	LHG Schmölln (Germany)	analytical	raw protein	18.0 %
			key	crude fat	2.5 %
			constitutions	crude fiber	8.1 %
				crude ash	7.2 %
				calcium	1.0 %
				phosphorus	0.65 %
			food additives	sodium	0.25 %
			per kg	vitamin A	7.000 UI
				vitamin D3	800 UI
				vitamin E	10.0 mg
				ion sulfate	20.0 mg
				zinc oxide	90.0 mg
				manganese oxide	20.0 mg
				calcium iodate	0.5 mg
				selenium	0.4 mg
				cobalt carbonate	0.3 mg
			composition	barley, rapeseed extraction meal, sunflower seed extraction meal, wheat bran, dried sugar beet plump, sugar beet molasses	

## Anlage A4

## Supporting material STUDIE II, S2 Table

**S2 Table: Concentrations of L-lactate, glucose, inorganic phosphate in mmol/L assessed in venous blood and rectally measured body temperature.**

wpi	group	n	[L-Lac]	[Gluc]	[iP]	body temperature
			mmol/L	mmol/L	mmol/L	°C
			median (min/max)	median (min/max)	median (min/max)	median (min/max)
1-3	CG	25	1.2 (0.5/3.7) a	5.2 (4.3/7.4) a	3.15 (1.60/4.16) a	39.3 (38.9/40.2) ab
	MAP	48	1.7 (0.6/4.0) b	5.8 (4.3/9.3) b	3.59 (2.91/4.62) c	39.2 (38.5/40.0) a
	MAH 2	9	1.6 (0.6/2.7) ab	5.5 (4.8/8.0) ab	3.06 (2.44/3.68) ab	39.5 (39.0/40.6) bc
	MAH 1	9	1.1 (0.6/3.2) ab	5.6 (4.2/6.5) ab	3.13 (2.69/3.39) ab	39.7 (39.3/40.5) c
4-7	CG	25	0.8 (0.5/1.8) c	4.9 (3.6/6.0) c	2.86 (1.84/3.96)	39.1 (38.6/39.6) a
	MAP	48	0.7 (0.2/3.1) bc	4.7 (2.8/6.9) bc	2.64 (1.52/3.99) n.s.	39.2 (38.6/40.3) ab
	MAH 2	9	0.4 (0.4/2.3) a	4.0 (3.0/5.3) ab	2.72 (1.61/3.29)	39.5 (39.3/40.9) bc
	MAH 1	8	0.6 (0.3/1.6) abc	3.4 (2.8/5.0) a	2.42 (1.26/2.91)	40.3 (39.5/40.5) c
8-11	CG	25	0.8 (0.4/1.5)	4.4 (3.8/5.2) c	2.76 (1.52/3.60) b	38.9 (38.4/39.7) a
	MAP	47	0.8 (0.4/2.3) n.s.	4.5 (3.5/5.0) bc	2.54 (1.86/3.34) ab	39.1 (38.3/39.4) b
	MAH 2	9	0.8 (0.5/2.3) n.s.	4.2 (3.7/4.9) abc	2.64 (1.95/2.97) ab	39.0 (38.8/39.7) c
	MAH 1	6	0.7 (0.5/0.9)	2.9 (1.7/4.0) a	2.17 (1.64/2.87) a	40.2 (39.2/41.1) c
12-15	CG	25	0.5 (0.2/1.5)	3.9 (3.4/4.4) ab	2.06 (1.12/2.95)	38.9 (38.5/39.9)
	MAP	47	0.5 (0.2/3.2) n.s.	3.9 (3.4/4.5) a	2.16 (1.47/3.13) n.s.	38.7 (38.1/40.2) n.s.
	MAH 2	9	0.5 (0.3/0.8)	4.0 (3.8/4.3) b	2.08 (1.29/3.04)	38.9 (38.4/39.4)
16-19	CG	25	0.5 (0.2/1.7)	3.8 (3.4/4.4)	1.79 (1.09/2.47)	38.9 (38.5/39.7) a
	MAP	35	0.5 (0.2/1.2) n.s.	3.8 (3.3/4.3) n.s.	1.96 (0.96/2.75) n.s.	38.9 (38.1/40.8) a
	MAH 2	9	0.5 (0.3/0.7)	3.8 (3.3/4.1)	1.70 (1.50/2.67)	39.2 (38.6/39.4) b
20-23	CG	23	0.5 (0.2/0.9) a	3.6 (2.8/4.8)	1.83 (1.26/2.27)	39.0 (38.5/40.2)
	MAP	34	0.5 (0.3/1.1) b	3.8 (2.8/6.0) n.s.	1.92 (1.20/2.61) n.s.	39.0 (38.4/39.7) n.s.
	MAH 2	9	0.5 (0.4/0.8) ab	3.6 (3.2/6.6)	2.00 (1.29/2.37)	38.8 (38.0/39.4)
24-27	CG	23	0.4 (0.3/1.2)	3.6 (2.8/4.1)	1.89 (1.10/2.37)	38.8 (38.3/39.4) ab
	MAP	34	0.5 (0.2/0.8) n.s.	3.5 (2.2/4.3) n.s.	1.95 (1.13/2.90) n.s.	39.0 (38.5/39.7) b
	MAH 2	9	0.4 (0.3/1.2)	3.2 (2.7/4.1)	1.92 (0.97/2.92)	38.8 (38.4/39.5) a
28-31	CG	20	0.5 (0.2/0.8)	3.7 (3.1/4.2)	1.92 (0.97/2.74)	38.9 (38.6/39.5)
	MAP	23	0.5 (0.3/1.1)	3.7 (3.3/4.6)	1.99 (1.43/2.42)	39.1 (38.5/39.5)
	MAH 2	9	0.5 (0.4/0.6)	3.5 (3.1/3.9)	2.17 (1.18/2.85)	38.9 (38.2/39.2)
32-35	CG	20	0.5 (0.3/0.7)	3.7 (3.2/4.3)	2.14 (1.23/2.77)	38.8 (38.5/39.3)
	MAP	23	0.6 (0.4/0.9)	3.5 (3.1/4.0)	2.06 (1.21/2.62)	38.8 (38.5/39.3)
	MAH 2	9	0.5 (0.3/0.9)	3.8 (3.6/3.9)	1.91 (1.55/3.44)	38.8 (38.3/39.3)
36-39	CG	15	0.5 (0.3/1.3)	3.8 (3.2/4.3)	2.34 (1.74/2.74)	38.8 (38.4/39.4)
	MAP	18	0.7 (0.3/1.2)	3.7 (3.3/4.3)	2.26 (1.94/2.82)	39.0 (38.6/39.7)
	MAH 2	9	0.4 (0.3/0.5)	3.8 (3.7/4.0)	2.08 (1.75/3.41)	38.9 (38.4/39.3)
40-43	CG	17	0.5 (0.4/1.2)	3.8 (3.4/4.4)	2.08 (1.44/2.96)	38.5 (38.2/39.0)
	MAP	17	0.6 (0.3/0.9)	3.8 (3.5/4.1)	2.10 (1.49/2.70)	39.0 (38.3/39.8)
	MAH 2	9	0.4 (0.3/0.6)	3.7 (3.5/4.2)	2.11 (1.80/2.87)	38.9 (38.7/39.6)
44-47	CG	17	0.4 (0.3/2.2)	3.7 (3.5/4.1)	2.20 (0.73/3.07)	38.7 (38.4/39.2)
	MAP	17	0.5 (0.3/1.2)	3.7 (3.4/4.1)	2.14 (1.20/2.85)	38.8 (38.4/39.6)
	MAH 2	9	0.4 (0.3/2.6)	3.7 (3.4/3.9)	2.32 (1.49/2.92)	38.6 (38.1/39.0)
48-51	CG	17	0.4 (0.3/0.7)	3.5 (3.3/4.0)	2.07 (1.53/2.91)	38.6 (38.3/39.3)
	MAP	18	0.6 (0.2/1.3)	3.6 (3.2/4.1)	2.17 (1.43/2.83)	38.7 (38.2/39.3)
	MAH 2	8	0.5 (0.2/1.9)	3.7 (3.5/4.4)	2.09 (1.45/3.30)	38.6 (38.4/38.8)

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3, S4, S5 and S10 Tables.

## Anlage A5

### Supporting material STUDIE II, S3 Tables

**S3 Tables: P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to controls (CG) from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).**

**S3 A: CG [Gluc]** (Friedman test:  $P = <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.001					
8-11	<0.001	0.016				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.570		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	0.028	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001	0.322

**S3 B: CG [Na<sup>+</sup>]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.983					
8-11	0.114	0.180				
12-15	0.724	0.567	0.134			
16-19	0.059	0.127	0.624	0.015		
20-23	0.032	0.045	0.237	0.011	0.473	
24-27	0.002	0.003	<0.001	0.010	<0.001	<0.001

**S3 C: CG [Cl<sup>-</sup>]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.064					
8-11	0.002	0.117				
12-15	0.028	<0.001	<0.001			
16-19	0.821	0.044	0.002	0.015		
20-23	0.066	0.441	0.300	<0.001	0.029	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.062	0.003	<0.001

**S3 D: CG [K<sup>+</sup>]** (Friedman test:  $P = 0.004$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	0.958	0.005				
12-15	0.728	0.001	0.676			
16-19	0.236	0.004	0.280	0.206		
20-23	0.035	0.107	0.072	0.012	0.186	
24-27	0.055	0.026	0.140	0.036	0.337	0.589

**S3 E: CG [Ca<sup>2+</sup>]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	20-23	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.464				
12-15	0.002	0.094	0.111			
16-19	<0.001	0.097	0.415	0.466		
20-23	<0.001	0.961	0.577	0.044	0.073	
24-27	<0.001	0.148	0.246	0.197	0.837	0.062

**S3 F: CG [L-Lac]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.009					
8-11	0.001	0.321				
12-15	<0.001	0.002	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	0.005	0.569		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.480	0.680	
24-27	<0.001	0.001	0.004	0.793	0.751	0.913

**S3 G: CG Hct** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	0.002	0.009				
12-15	0.201	<0.001	<0.001			
16-19	0.002	<0.001	<0.001	<0.001		
20-23	0.019	<0.001	<0.001	0.065	0.018	
24-27	0.475	<0.001	0.002	0.394	<0.001	0.004

**S3 H: CG [iP]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.006					
8-11	0.001	0.280				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.140		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.136	0.417	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.212	0.506	0.235

**S3 I: CG body temperature** (Friedman test:  $P = <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.002					
8-11	<0.001	0.041				
12-15	<0.001	0.347	0.692			
16-19	<0.001	0.454	0.486	0.601		
20-23	0.005	0.958	0.075	0.296	0.486	
24-27	<0.001	0.019	0.431	0.314	0.084	0.045

**S3 J: CG pCO<sub>2</sub>(v)<sub>BT</sub>** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.085				
12-15	<0.001	0.123	0.758			
16-19	<0.001	0.020	0.260	0.235		
20-23	<0.001	0.064	0.475	0.692	0.715	
24-27	<0.001	0.019	0.049	0.186	0.749	0.523

**S3 K: CG [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]** (Friedman test:  $P = 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.045					
8-11	0.003	0.009				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	0.001	0.784		
20-23	<0.001	<0.001	0.042	0.038	0.005	
24-27	<0.001	0.005	0.048	0.007	0.006	0.107

**S3 L: CG [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)]** (Friedman test:  $P <0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.603					
8-11	0.420	0.041				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.681		
20-23	<0.001	<0.001	0.036	0.019	0.006	
24-27	0.03	0.026	0.078	0.003	0.005	0.094

**Fortsetzung A5 Supporting material STUDIE II, S3 Tables**

**S3 M:** CG [BE] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.637					
8-11	0.287	0.031				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.703		
20-23	<0.001	<0.001	0.031	0.027	0.003	
24-27	0.006	0.012	0.061	0.003	0.004	0.115

**S3 O:** CG AG (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.073					
8-11	0.003	0.015				
12-15	<0.001	<0.001	0.301			
16-19	<0.001	<0.001	0.293	0.681		
20-23	<0.001	0.002	0.345	0.485	0.858	
24-27	<0.001	0.005	0.581	0.353	0.217	0.139

**S3 Q:** CG [TP] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.007				
12-15	<0.001	0.003	0.062			
16-19	<0.001	0.002	0.189	0.346		
20-23	<0.001	<0.001	0.052	0.891	0.648	
24-27	<0.001	0.002	0.236	0.465	0.831	0.594

**S3 S:** CG [Gamma glob] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.094				
12-15	<0.001	0.091	0.267			
16-19	<0.001	0.061	0.11	0.414		
20-23	<0.001	0.04	0.191	0.951	0.550	
24-27	<0.001	0.14	0.315	0.465	0.181	0.098

**S3 U:** CG [Beta 1] (Friedman test:  $P = 0.013$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.088					
8-11	0.843	0.026				
12-15	0.573	0.118	0.548			
16-19	0.765	0.211	0.270	0.875		
20-23	0.006	0.654	0.027	0.009	0.045	
24-27	0.006	0.703	0.042	0.022	0.073	0.649

**S3 W:** CG  $A_{tot TP}$  (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.009				
12-15	<0.001	0.004	0.065			
16-19	<0.001	0.002	0.205	0.338		
20-23	<0.001	<0.001	0.049	0.855	0.626	
24-27	<0.001	0.002	0.229	0.526	0.832	0.537

**S3 N:** CG [BE<sub>Ecf</sub>] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.958					
8-11	0.136	0.014				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.784		
20-23	<0.001	<0.001	0.021	0.029	0.004	
24-27	0.002	0.007	0.046	0.003	0.006	0.091

**S3 P:** CG pH(v)<sub>BT</sub> (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	0.009	0.224				
12-15	0.229	<0.001	<0.001			
16-19	0.447	<0.001	<0.001	0.702		
20-23	0.260	<0.001	0.007	0.010	0.002	
24-27	0.049	0.064	0.128	<0.001	0.002	0.046

**S3 R:** CG [Alb] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	0.002	0.537			
16-19	<0.001	<0.001	0.161	0.581		
20-23	<0.001	<0.001	0.248	0.659	0.935	
24-27	<0.001	<0.001	0.315	0.761	0.808	0.846

**S3 T:** CG [Alpha 2] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.113				
12-15	0.002	0.889	0.079			
16-19	<0.001	0.489	0.282	0.688		
20-23	0.012	0.444	0.115	0.626	0.428	
24-27	<0.001	0.845	0.139	0.741	0.626	0.888

**S3 V:** CG [Beta 2] (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.121				
12-15	<0.001	0.064	0.122			
16-19	<0.001	0.767	0.041	0.007		
20-23	<0.001	0.503	0.121	0.135	0.601	
24-27	<0.001	0.779	0.118	0.066	0.399	0.464

**S3 X:** CG  $A_{tot Alb}$  (Friedman test:  $P < 0.001$ , P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	0.002	0.559			
16-19	<0.001	<0.001	0.153	0.548		
20-23	<0.001	<0.001	0.284	0.670	0.986	
24-27	<0.001	<0.001	0.33	0.684	0.833	0.961

**Fortsetzung A5 Supporting material STUDIE II, S3 Tables**

**S3 Y:** CG SID<sub>m3</sub> (Friedman test: P = 0.001, P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.455					
8-11	0.053	0.196				
12-15	0.042	0.004	<0.001			
16-19	0.037	0.008	<0.001	0.703		
20-23	0.573	0.548	0.076	0.104	0.032	
24-27	1.000	0.456	0.149	0.181	0.094	0.648

**S3 AA:** CG SID<sub>m5</sub> (Friedman test: P <0.001, P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.048					
8-11	<0.001	0.097				
12-15	0.308	0.012	0.002			
16-19	0.603	0.026	0.002	0.659		
20-23	0.103	0.808	0.420	0.115	0.035	
24-27	0.378	0.595	0.211	0.136	0.097	0.721

**S3 Z:** CG SID<sub>m4</sub> (Friedman test: P = <0.001, P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.041					
8-11	<0.001	0.107				
12-15	0.338	0.011	0.002			
16-19	0.721	0.023	0.002	0.616		
20-23	0.094	0.858	0.354	0.108	0.034	
24-27	0.323	0.595	0.199	0.128	0.097	0.397

**S3 AB:** CG SIG<sub>TP</sub> (Friedman test: P = 0.017, P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.011					
8-11	0.128	0.212				
12-15	0.976	0.007	0.212			
16-19	0.891	0.007	0.236	0.563		
20-23	1.000	0.014	0.465	0.715	0.715	
24-27	0.171	0.287	0.738	0.503	0.181	0.308

**Additional information to S3 Tables:** P-values > 0.05 were considered not significant.

CG [Alpha 1] (Friedman test: P = 0.075)

CG Alb/Glob (Friedman test: P = 0.546)

CG SIG<sub>Alb</sub> (Friedman test: P = 0.431)



# Anlage A6

## Supporting material STUDIE II, S4 Tables

**S4 Tables: P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to group MAP from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).**

**S4 A:** MAP [Gluc] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.388				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.037		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.468	0.846	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

**S4 B:** MAP [Na<sup>+</sup>] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.011					
8-11	0.001	0.005				
12-15	0.530	0.573	<0.001			
16-19	0.012	0.223	0.182	0.002		
20-23	<0.001	<0.001	0.836	<0.001	0.004	
24-27	0.005	0.133	0.611	<0.001	0.419	0.047

**S4 C:** MAP [Cl<sup>-</sup>] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.031					
8-11	<0.001	0.014				
12-15	0.165	0.471	0.003			
16-19	0.716	0.021	<0.001	0.214		
20-23	0.001	0.077	0.191	0.032	0.009	
24-27	0.006	0.033	0.235	0.237	<0.001	0.700

**S4 D:** MAP [K<sup>+</sup>] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.482				
12-15	0.013	0.124	0.145			
16-19	0.015	0.483	0.551	0.456		
20-23	<0.001	0.754	0.434	0.021	0.054	
24-27	<0.001	0.389	0.206	0.003	0.006	0.600

**S4 E:** MAP [Ca<sup>2+</sup>] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.084				
12-15	<0.001	0.149	0.655			
16-19	<0.001	0.029	0.883	0.879		
20-23	<0.001	<0.001	0.037	0.016	0.034	
24-27	<0.001	0.002	0.039	0.016	0.037	0.584

**S4 F:** MAP [L-Lac] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.048				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.437		
20-23	<0.001	0.002	<0.001	0.238	0.059	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.109	0.334	<0.001

**S4 G:** MAP Hct (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	0.001	<0.001	<0.001			
16-19	0.003	<0.001	<0.001	<0.001		
20-23	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	0.986	
24-27	0.182	<0.001	<0.001	<0.001	0.027	0.007

**S4 H:** MAP [iP] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.904				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.013		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.614	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.003	0.661	0.573

**S4 I:** MAP body temperature (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.476					
8-11	0.003	0.012				
12-15	0.006	0.004	0.064			
16-19	0.006	0.004	0.131	0.721		
20-23	<0.001	0.006	0.235	0.603	0.623	
24-27	<0.001	0.025	0.588	0.318	0.471	0.419

**S4 J:** MAP pCO<sub>2(v)</sub>BT (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.138				
12-15	<0.001	0.003	0.245			
16-19	<0.001	0.010	0.437	0.620		
20-23	<0.001	0.033	0.891	0.248	0.406	
24-27	<0.001	0.193	0.543	0.055	0.143	0.367

**S4 K:** MAP [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.158					
8-11	<0.001	0.013				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.114		
20-23	<0.001	<0.001	0.002	0.602	0.179	
24-27	<0.001	<0.001	0.118	0.013	<0.001	<0.001

**S4 L:** MAP [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.141					
8-11	0.183	0.028				
12-15	<0.001	<0.001	0.005			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.122		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.573	0.137	
24-27	0.004	<0.001	0.286	0.018	<0.001	<0.001

**Fortsetzung A6 Supporting material STUDIE II, S4 Tables**

**S4 M: MAP [BE]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.188					
8-11	0.168	0.023				
12-15	<0.001	<0.001	0.002			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.118		
20-23	<0.001	<0.001	0.001	0.543	0.161	
24-27	<0.001	<0.001	0.124	0.022	<0.001	<0.001

**S4 O: MAP AG** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.097					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	0.084	0.013		
20-23	<0.001	<0.001	0.079	0.004	0.851	
24-27	<0.001	<0.001	0.421	<0.001	0.235	0.118

**S4 Q: MAP [TP]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	<0.001	0.029			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.402		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	0.022	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	0.005	0.891

**S4 S: MAP [Gamma glob]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.010				
12-15	<0.001	0.002	0.043			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.004		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.016

**S4 U: MAP [Alpha 2]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.004					
8-11	<0.001	0.462				
12-15	0.023	0.326	0.242			
16-19	0.291	0.007	0.001	0.013		
20-23	0.587	0.004	<0.001	0.016	0.469	
24-27	0.189	0.033	0.004	0.079	0.033	0.017

**S4 W: MAP [Beta 2]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	<0.001	0.115			
16-19	<0.001	<0.001	0.009	0.249		
20-23	<0.001	<0.001	0.254	0.455	0.188	
24-27	<0.001	<0.001	0.245	0.962	0.117	0.641

**S4 N: MAP [BE<sub>Ecf</sub>]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.441					
8-11	0.033	0.018				
12-15	<0.001	<0.001	<0.001			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.114		
20-23	<0.001	<0.001	0.001	0.467	0.155	
24-27	<0.001	<0.001	0.095	0.022	<0.001	<0.001

**S4 P: MAP pH(v)<sub>BT</sub>** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.274				
12-15	0.069	<0.001	0.013			
16-19	0.809	<0.001	<0.001	0.116		
20-23	0.379	<0.001	0.002	0.259	0.437	
24-27	0.001	0.002	0.085	0.289	<0.001	0.001

**S4 R: MAP [Alb]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.006				
12-15	<0.001	0.002	0.043			
16-19	<0.001	0.939	0.106	0.025		
20-23	<0.001	0.037	0.979	0.301	0.026	
24-27	<0.001	0.043	0.447	0.069	0.124	0.521

**S4 T: MAP [Alpha 1]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.849					
8-11	<0.001	0.037				
12-15	0.006	0.229	0.144			
16-19	<0.001	<0.001	0.012	<0.001		
20-23	<0.001	0.017	0.986	0.261	0.058	
24-27	<0.001	0.144	0.206	0.914	0.006	0.158

**S4 V: MAP [Beta 1]** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.468					
8-11	0.063	0.851				
12-15	0.042	0.157	0.815			
16-19	<0.001	0.007	0.043	0.092		
20-23	<0.001	0.004	0.026	0.027	0.745	
24-27	<0.001	0.004	0.010	0.019	0.979	0.731

**S4 X: MAP Alb/Glob** (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.667					
8-11	0.339	0.242				
12-15	0.292	0.108	0.527			
16-19	<0.001	<0.001	0.003	0.008		
20-23	<0.001	<0.001	0.002	0.004	0.326	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.642	0.326

Fortsetzung A6 Supporting material STUDIE II, S4 Tables

S4 Y: MAP A<sub>tot TP</sub> (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	<0.001				
12-15	<0.001	<0.001	0.033			
16-19	<0.001	<0.001	<0.001	0.432		
20-23	<0.001	<0.001	<0.001	0.007	0.022	
24-27	<0.001	<0.001	<0.001	0.008	0.006	0.844

S4 Z: MAP A<sub>tot Alb</sub> (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.005				
12-15	<0.001	0.002	0.043			
16-19	<0.001	0.952	0.101	0.027		
20-23	<0.001	0.036	0.964	0.313	0.026	
24-27	<0.001	0.044	0.469	0.068	0.131	0.499

S4 AA: MAP SID<sub>m3</sub> (Friedman test: P = 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.063					
8-11	0.270	0.707				
12-15	0.966	0.222	0.608			
16-19	<0.001	0.008	0.004	0.003		
20-23	0.001	0.102	0.033	0.015	0.231	
24-27	0.022	0.809	0.668	0.225	0.009	0.012

S4 AB: MAP SID<sub>m4</sub> (Friedman test: P = 0.009; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.417					
8-11	0.388	0.964				
12-15	0.038	0.222	0.249			
16-19	0.124	0.016	0.007	0.005		
20-23	0.561	0.197	0.084	0.026	0.305	
24-27	0.053	0.427	0.629	0.329	0.006	0.006

S4 AC: MAP SID<sub>m5</sub> (Friedman test: P = 0.011; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.567					
8-11	0.503	0.943				
12-15	0.048	0.215	0.245			
16-19	0.089	0.018	0.007	0.005		
20-23	0.388	0.189	0.075	0.022	0.334	
24-27	0.08	0.483	0.681	0.313	0.008	0.006

S4 AD: MAP SIG<sub>TP</sub> (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.045				
12-15	<0.001	<0.001	0.002			
16-19	<0.001	<0.001	0.279	0.009		
20-23	<0.001	0.035	0.939	<0.001	0.360	
24-27	<0.001	0.228	0.169	<0.001	0.032	0.068

S4 AE: MAP SIG<sub>Alb</sub> (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	<0.001					
8-11	<0.001	0.017				
12-15	0.330	<0.001	0.001			
16-19	0.383	<0.001	0.001	0.964		
20-23	0.006	<0.001	0.037	0.045	0.145	
24-27	<0.001	0.002	0.351	0.004	0.022	0.083

Additional information to S4 Tables: P-values > 0.05 were considered not significant.

## Anlage A7

### Supporting material STUDIE II, S5 Tables

**S5 Tables: P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to sub-group MAH 2 from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).**

**S5 A: MAH 2 [Gluc]** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.012	0.889				
12-15	0.012	0.674	0.046			
16-19	0.012	0.263	0.012	0.018		
20-23	0.036	0.575	0.575	0.674	0.779	
24-27	0.012	0.036	0.012	0.017	0.035	0.017

**S5 B: MAH 2 [Cl<sup>-</sup>]** (Friedman test: P = 0.007; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.733					
8-11	0.442	0.527				
12-15	0.017	0.020	0.071			
16-19	0.159	0.041	0.551	0.229		
20-23	0.018	0.019	0.024	0.230	0.173	
24-27	0.027	0.291	0.246	0.553	1.000	0.126

**S5 C: MAH 2 [K<sup>+</sup>]** (Friedman test: P = 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.018					
8-11	0.018	0.866				
12-15	0.028	0.012	0.018			
16-19	0.080	0.263	0.123	0.017		
20-23	0.049	0.932	0.623	0.012	0.398	
24-27	0.400	0.063	0.401	0.024	0.833	0.310

**S5 D: MAH 2 [L-Lac]** (Friedman test: P = 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.050					
8-11	0.050	0.237				
12-15	0.018	0.670	0.017			
16-19	0.017	0.551	0.012	0.861		
20-23	0.017	0.944	0.043	0.196	0.066	
24-27	0.012	0.599	0.080	0.932	0.854	0.498

**S5 E: MAH 2 Hct** (Friedman test: P = 0.01; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.036					
8-11	0.069	0.208				
12-15	0.574	0.025	0.176			
16-19	0.058	0.093	0.401	0.043		
20-23	0.107	0.036	0.161	0.161	0.401	
24-27	0.161	0.012	0.161	0.575	0.093	0.018

**S5 F: MAH 2 [iP]** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.018	0.484				
12-15	0.012	0.050	0.128			
16-19	0.012	0.036	0.069	0.575		
20-23	0.012	0.025	0.017	0.401	0.779	
24-27	0.012	0.036	0.012	0.327	1.000	0.779

**S5 G: MAH 2 body temperature** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.498					
8-11	0.018	0.011				
12-15	0.008	0.008	0.031			
16-19	0.033	0.013	0.734	0.207		
20-23	0.008	0.008	0.018	0.232	0.049	
24-27	0.008	0.008	0.012	0.439	0.021	0.722

**S5 H: MAH 2 pCO<sub>2</sub>(v)<sub>BT</sub>** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.575					
8-11	0.017	0.017				
12-15	0.012	0.012	0.263			
16-19	0.012	0.017	0.575	0.093		
20-23	0.017	0.025	1.000	0.263	0.674	
24-27	0.327	0.327	0.025	0.012	0.018	0.012

**S5 I: MAH 2 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.025					
8-11	1.000	0.208				
12-15	0.036	0.012	0.017			
16-19	0.012	0.012	0.025	0.161		
20-23	0.012	0.012	0.017	0.263	0.779	
24-27	0.123	0.017	0.401	0.069	0.012	0.017

**S5 J: MAH 2 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)]** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.017					
8-11	0.263	0.483				
12-15	0.058	0.012	0.012			
16-19	0.012	0.012	0.025	0.093		
20-23	0.025	0.017	0.017	0.141	0.344	
24-27	0.091	0.012	0.183	0.161	0.012	0.025

**S5 K: MAH 2 [BE]** (Friedman test: P = 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.017					
8-11	0.263	0.484				
12-15	0.058	0.012	0.012			
16-19	0.012	0.012	0.017	0.092		
20-23	0.017	0.012	0.017	0.093	0.327	
24-27	0.106	0.012	0.161	0.208	0.012	0.017

**S5 L: MAH 2 [BE<sub>Fcr</sub>]** (Friedman test: P < 0.001; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.025					
8-11	0.263	0.401				
12-15	0.050	0.012	0.012			
16-19	0.012	0.012	0.021	0.123		
20-23	0.017	0.012	0.017	0.183	0.484	
24-27	0.123	0.017	0.263	0.123	0.012	0.017

**Fortsetzung A7 Supporting material STUDIE II, S5 Tables**

**S5 M:** MAH 2 AG (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.036					
8-11	1.000	0.161				
12-15	0.012	0.012	0.012			
16-19	0.017	0.012	0.017	1.000		
20-23	0.866	0.208	0.674	0.093	0.161	
24-27	0.674	0.050	0.779	0.025	0.028	0.674

**S5 O:** MAH 2 [TP] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.012	0.025				
12-15	0.012	0.012	0.263			
16-19	0.012	0.012	0.092	0.624		
20-23	0.012	0.017	0.017	0.398	0.779	
24-27	0.012	0.012	0.05	0.141	0.401	0.484

**S5 Q:** MAH 2 [Gamma glob] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.012	0.012				
12-15	0.012	0.028	0.484			
16-19	0.012	0.036	0.263	0.484		
20-23	0.012	0.036	0.141	0.574	0.612	
24-27	0.012	0.093	0.069	0.042	0.050	0.069

**S5 S:** MAH 2 [Beta 2] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.008					
8-11	0.008	0.373				
12-15	0.008	0.123	0.674			
16-19	0.008	0.069	0.173	0.109		
20-23	0.012	0.015	0.008	0.008	0.091	
24-27	0.011	0.015	0.028	0.017	0.259	1.000

**S5 U:** MAH 2  $A_{\text{tot TP}}$  (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.012	0.025				
12-15	0.012	0.012	0.262			
16-19	0.012	0.012	0.092	0.624		
20-23	0.012	0.017	0.017	0.398	0.779	
24-27	0.012	0.012	0.050	0.160	0.401	0.499

**S5 W:** MAH 2  $\text{SIG}_{\text{TP}}$  (Friedman test:  $P = 0.004$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.025	0.889				
12-15	0.208	0.050	0.017			
16-19	0.674	0.017	0.025	0.889		
20-23	0.093	0.889	0.779	0.093	0.093	
24-27	0.012	0.674	0.779	0.025	0.036	0.779

**S5 N:** MAH 2  $\text{pH}(v)_{\text{BT}}$  (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.017					
8-11	0.025	0.161				
12-15	0.484	0.401	0.012			
16-19	0.123	0.017	0.017	0.068		
20-23	0.161	0.050	0.012	0.028	0.208	
24-27	0.889	0.123	0.017	0.779	0.035	0.025

**S5 P:** MAH 2 [Alb] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.036					
8-11	1.000	0.208				
12-15	0.018	0.012	0.043			
16-19	0.017	0.012	0.012	0.263		
20-23	0.012	0.012	0.012	0.093	0.293	
24-27	0.012	0.012	0.012	0.036	0.093	0.093

**S5 R:** MAH 2 [Alpha 2] (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.292					
8-11	0.866	0.309				
12-15	0.050	0.025	0.058			
16-19	0.091	0.018	0.028	0.889		
20-23	0.012	0.018	0.018	0.293	0.498	
24-27	0.018	0.012	0.012	0.149	0.463	0.400

**S5 T:** MAH 2 Alb/Glob (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.012					
8-11	0.012	0.735				
12-15	0.021	0.161	0.093			
16-19	0.069	0.012	0.012	0.208		
20-23	0.069	0.018	0.018	0.021	0.483	
24-27	0.160	0.012	0.012	0.012	0.028	0.011

**S5 V:** MAH 2  $A_{\text{tot Alb}}$  (Friedman test:  $P < 0.001$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.035					
8-11	0.944	0.208				
12-15	0.018	0.012	0.046			
16-19	0.017	0.012	0.012	0.263		
20-23	0.012	0.012	0.012	0.063	0.327	
24-27	0.012	0.012	0.012	0.03	0.093	0.080

**S5 X:** MAH 2  $\text{SIG}_{\text{Alb}}$  (Friedman test:  $P = 0.007$ ; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7	8-11	12-15	16-19	20-23
4-7	0.208					
8-11	0.612	0.779				
12-15	0.327	0.123	0.208			
16-19	0.327	0.182	0.327	0.726		
20-23	0.161	0.401	0.161	0.021	0.063	
24-27	0.012	0.012	0.025	0.012	0.018	0.674

## Fortsetzung A7 Supporting material STUDIE II, S5 Tables

**Additional information to S5 Tables:** P-values > 0.05 were considered not significant.

MAH 2 [Na<sup>+</sup>] (Friedman test: P = 0.08)

MAH 2 [Alpha 1] (Friedman test: P = 0.187)

MAH 2 SID<sub>m3</sub> (Friedman test: P = 0.132)

MAH 2 SID<sub>m5</sub> (Friedman test: P = 0.07)

MAH 2 [Ca<sup>2+</sup>] (Friedman test: P = 0.08)

MAH 2 [Beta 1] P (Friedman test: P = 0.396)

MAH 2 SID<sub>m4</sub> (Friedman test: P = 0.06)

## Anlage A8

## Supporting material STUDIE II, S6 Table

S6 Table: Concentrations of total protein, albumin, gamma globulin in g/dL, and strong ion gap calculated on basis of total protein (SIG<sub>TP</sub>) in mEq/L assessed in venous blood.

wpi	group	n	[TP] g/dL		[Alb] g/dL		[Gamma glob] g/dl		SIG <sub>TP</sub> mEq/L	
			median (min/max)		median (min/max)		median (min/max)		median (min/max)	
1-3	CG	25	51.1 (45.3/58.0)	c	30.4 (25.2/34.3)	b	5.6 (2.6/12.4)	c	-1.87 (-6.29/2.01)	b
	MAP	48	47.9 (43.6/53.9)	a	28.6 (19.6/35.1)	a	4.4 (1.5/12.3)	b	-3.41 (-6.01/1.16)	c
	MAH 2	9	50.2 (48.3/52.5)	bc	28.8 (26.7/31.4)	ab	3.9 (2.8/6.6)	ab	-4.95 (-7.90/-2.70)	a
	MAH 1	9	48.0 (42.1/53.1)	abc	28.5 (24.9/34.1)	ab	4.0 (2.4/6.7)	ab	-4.45 (-6.64/-2.26)	a
4-7	CG	25	59.6 (47.0/72.8)	b	34.5 (25.2/40.4)	b	10.5 (4.6/18.9)	b	-0.18 (-5.68/3.97)	
	MAP	48	56.4 (48.8/67.2)	a	33.3 (19.9/40.8)	b	7.6 (2.9/20.1)	a	-0.33 (-5.77/4.56)	n.s.
	MAH 2	9	55.1 (52.0/65.4)	ab	25.1 (23.7/31.8)	a	12.5 (6.6/21.1)	b	-0.78 (-5.00/1.54)	
	MAH 1	8	61.1 (46.1/78.0)	ab	22.8 (14.8/30.7)	a	16.9 (14.2/34.1)	c	0.12 (-0.60/4.23)	
8-11	CG	25	65.0 (54.6/73.3)	c	37.6 (33.9/43.0)	c	11.9 (7.8/17.7)	b	-1.30 (-3.82/3.12)	a
	MAP	47	61.5 (52.5/76.7)	b	36.4 (21.4/42.7)	c	9.3 (6.2/32.4)	a	-1.09 (-6.17/6.75)	ab
	MAH 2	9	65.2 (54.1/71.7)	bc	30.2 (19.5/37.9)	b	19.4 (9.3/22.5)	c	-1.49 (-5.60/1.52)	ab
	MAH 1	6	33.5 (28.0/68.2)	a	8.8 (6.0/20.1)	a	10.85 (8.6/27.9)	abc	0.60 (-5.39/4.39)	b
12-15	CG	25	66.6 (56.9/76.7)	b	38.9 (33.3/44.6)	b	12.3 (9.1/18.9)	b	-1.49 (-7.56/2.41)	
	MAP	47	64.1 (49.7/73.3)	a	38.6 (21.0/42.7)	b	10.2 (6.8/19.3)	a	-3.35 (-8.15/3.46)	n.s.
	MAH 2	9	67.6 (63.1/74.1)	ab	35.2 (30.7/39.9)	a	16.8 (9.9/20.9)	c	-5.02 (-6.41/-0.40)	
16-19	CG	25	67.2 (56.8/75.9)	b	39.3 (26.0/43.2)	b	12.3 (9.7/17.5)	ab	-0.74 (-9.09/2.41)	ab
	MAP	35	64.8 (56.6/76.9)	a	35.3 (23.6/45.1)	a	11.3 (7.1/17.5)	a	-1.43 (-7.70/2.18)	b
	MAH 2	9	66.0 (62.8/74.7)	ab	37.0 (29.4/39.5)	a	14.4 (10.1/22.8)	b	-3.97 (-6.98/-1.19)	a
20-23	CG	23	66.6 (59.9/73.3)		39.2 (28.6/44.6)	b	12.3 (10.4/17.5)	a	-1.22 (-5.66/3.75)	
	MAP	34	67.6 (56.9/72.6)	n.s.	37.6 (28.0/43.5)	a	13.2 (7.6/19.3)	ab	-0.30 (-5.45/2.98)	n.s.
	MAH 2	9	68.0 (61.3/76.4)		37.6 (34.2/39.6)	ab	15.8 (11.2/23.3)	b	-2.77 (-5.04/6.44)	
24-27	CG	23	65.3 (60.5/75.6)	a	39.0 (34.3/43.9)	b	11.9 (9.6/17.0)	a	-1.03 (-4.17/1.94)	
	MAP	34	66.3 (61.2/73.9)	a	36.1 (29.8/41.4)	a	13.7 (9.2/19.5)	b	-0.28 (-3.84/2.64)	n.s.
	MAH 2	9	70.1 (62.7/75.4)	b	38.6 (36.1/43.0)	b	14.0 (9.8/22.1)	b	-0.72 (-2.37/1.23)	
28-31	CG	20	64.6 (59.0/71.6)		37.4 (34.5/42.5)		12.0 (9.5/14.6)		-0.22 (-1.55/3.23)	
	MAP	23	66.4 (60.2/70.6)		36.4 (30.8/42.4)		14.1 (8.9/18.0)		-0.42 (-4.66/2.02)	
	MAH 2	9	67.7 (64.2/77.8)		38.8 (34.6/42.9)		14.0 (10.9/21.3)		0.86 (-1.10/2.63)	
32-35	CG	20	66.3 (62.3/71.9)		37.9 (35.7/41.8)		12.3 (9.9/17.5)		-0.22 (-2.17/4.04)	
	MAP	23	65.9 (62.2/70.9)		36.7 (31.4/41.3)		12.3 (10.4/18.7)		-0.40 (-2.49/2.54)	
	MAH 2	9	67.1 (62.9/78.0)		38.1 (36.2/45.9)		12.6 (9.8/20.8)		0.30 (-0.80/3.06)	
36-39	CG	15	65.8 (50.3/68.5)		37.2 (29.5/40.5)		11.6 (8.7/15.8)		-0.07 (-1.75/0.99)	
	MAP	18	66.3 (61.2/69.9)		36.4 (29.0/42.7)		13.0 (9.6/19.0)		-0.42 (-3.28/2.81)	
	MAH 2	9	65.3 (61.2/72.7)		37.6 (31.6/40.4)		13.5 (11.6/19.2)		0.99 (-0.21/2.18)	
40-43	CG	17	63.9 (57.6/70.1)		38.0 (32.1/42.8)		12.1 (8.7/14.0)		0.11 (-3.77/1.95)	
	MAP	17	65.0 (60.7/81.4)		35.2 (28.6/40.7)		14.2 (10.5/25.5)		-0.38 (-3.88/4.09)	
	MAH 2	9	66.5 (62.8/70.1)		35.6 (34.6/40.0)		12.8 (10.4/17.3)		-2.70 (-4.02/-0.83)	
44-47	CG	17	64.8 (57.7/69.4)		38.2 (31.7/42.5)		11.4 (9.4/14.2)		-0.30 (-4.32/2.31)	
	MAP	17	66.4 (60.2/75.3)		35.6 (29.4/40.0)		14.3 (11.2/22.4)		-0.47 (-2.84/3.35)	
	MAH 2	9	67.5 (62.1/72.9)		37.9 (37.1/39.8)		12.9 (9.6/17.2)		-1.92 (-2.73/-0.03)	
48-51	CG	17	64.5 (57.3/73.6)		38.0 (31.9/41.4)		12.1 (9.1/15.3)		-1.93 (-4.02/2.22)	
	MAP	18	67.9 (61.4/77.0)		35.7 (29.3/42.8)		15.2 (11.2/22.9)		0.69 (-2.09/3.00)	
	MAH 2	8	67.7 (63.6/80.8)		36.9 (35.2/42.6)		14.3 (9.8/24.6)		-0.98 (-2.49/2.57)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3, S4, S5 and S10 Tables.

**Anlage A9**

**Supporting material STUDIE II, S7 Table**

**S7 Table: Concentrations of sodium, chloride, potassium, and calcium in mmol/L assessed in venous blood.**

wpi	group	n	[Na <sup>+</sup> ] mmol/L		[Cl <sup>-</sup> ] mmol/L		[K <sup>+</sup> ] mmol/L		[Ca <sup>2+</sup> ] mmol/L	
			median (min/max)		median (min/max)		median (min/max)		median (min/max)	
1-3	CG	25	140 (137/147)	a	102 (97/106)	a	4.3 (3.5/5.9)		1.34 (1.27/1.49)	
	MAP	48	143 (140/146)	b	103 (100/105)	b	4.6 (4.0/5.6)	n.s.	1.38 (1.27/1.52)	n.s.
	MAH 2	9	143 (141/145)	ab	103 (102/107)	bc	4.7 (4.0/5.2)		1.36 (1.28/1.45)	
	MAH 1	9	143 (141/147)	ab	105 (101/107)	c	4.5 (3.9/5)		1.38 (1.35/1.47)	
CG	25	140 (136/148)		100 (96/107)	a	4 (3.4/4.7)	1.27 (1.14/1.42)		a	
4-7	MAP	48	142 (137/148)		102 (96/111)	b	4.1 (3.1/5.2)	n.s.	1.32 (1.10/1.44)	bc
	MAH 2	9	144 (142/146)	n.s.	104 (102/108)	bc	4.0 (3.8/4.5)		1.32 (1.28/1.35)	c
	MAH 1	8	144 (141/145)		107 (104/109)	c	4.1 (3.6/4.6)		1.30 (1.23/1.35)	abc
	CG	25	141 (137/147)	b	100 (95/104)	a	4.3 (3.6/5.2)		1.29 (1.18/1.39)	b
8-11	MAP	47	139 (136/148)	ab	100 (95/108)	a	4.2 (3.2/5.4)	n.s.	1.29 (1.13/1.43)	bc
	MAH 2	9	144 (142/149)	c	104 (100/107)	b	4.1 (3.3/4.6)		1.29 (1.19/1.34)	bc
	MAH 1	6	138 (135/143)	a	105 (101/109)	b	4.0 (3.2/4.3)		1.06 (0.90/1.23)	a
	CG	25	139 (137/150)	a	104 (98/108)	a	4.4 (3.7/5.6)		a	1.31 (1.20/1.40)
12-15	MAP	47	143 (136/149)	ab	102 (94/110)	a	4.3 (3.5/5.6)		1.30 (1.11/1.43)	ab
	MAH 2	9	145 (144/148)	b	106 (104/109)	b	5.1 (4.5/6.0)	b	1.31 (1.26/1.37)	b
	CG	25	139 (134/147)	a	100 (97/109)	a	4.3 (3.5/5.0)		1.29 (1.17/1.39)	a
16-19	MAP	35	140 (134/148)	ab	103 (97/109)	a	4.2 (3.3/5.8)	n.s.	1.30 (1.14/1.45)	ab
	MAH 2	9	145 (142/146)	b	106 (102/108)	b	4.6 (3.7/4.7)		1.33 (1.26/1.42)	b
	CG	23	140 (134/146)	a	100 (94/111)	a	4.1 (3.3/4.9)		1.27 (1.19/1.39)	a
20-23	MAP	34	140 (136/145)	a	101 (97/109)	a	4.1 (3.3/5.0)	n.s.	1.27 (1.16/1.43)	a
	MAH 2	9	142 (141/147)	b	107 (104/112)	b	4.2 (3.7/4.7)		1.34 (1.21/1.38)	b
	CG	23	144 (139/148)	b	104 (99/109)	b	4.3 (3.3/4.8)		ab	1.30 (1.23/1.35)
24-27	MAP	34	140 (134/148)	a	102 (95/109)	a	4.1 (3.5/5.3)	a	1.28 (1.17/1.36)	a
	MAH 2	9	145 (142/147)	b	105 (103/110)	b	4.3 (3.9/5.5)	b	1.31 (1.26/1.36)	b
	CG	20	143 (141/146)		103 (99/106)		4.2 (3.7/5.8)		1.25 (1.16/1.32)	
28-31	MAP	23	144 (143/147)		103 (100/106)		4.1 (3.3/4.7)		1.25 (1.18/1.36)	
	MAH 2	9	143 (142/145)		103 (100/108)		4.3 (4.0/5.2)		1.24 (1.12/1.30)	
	CG	20	143 (141/146)		104 (101/108)		4.1 (3.7/5.2)		1.26 (1.21/1.32)	
32-35	MAP	23	144 (142/145)		103 (100/108)		4.0 (3.6/4.8)		1.24 (1.17/1.38)	
	MAH 2	9	143 (142/146)		104 (102/105)		4.5 (3.8/5.0)		1.24 (1.16/1.27)	
	CG	15	143 (140/145)		102 (100/107)		4.0 (3.6/5.6)		1.25 (1.17/1.33)	
36-39	MAP	18	143 (141/145)		103 (100/107)		4.1 (3.3/4.7)		1.24 (1.12/1.33)	
	MAH 2	9	143 (142/144)		103 (101/105)		4.3 (3.8/4.4)		1.19 (1.08/1.20)	
	CG	17	142 (140/147)		103 (99/106)		4.1 (3.6/5.8)		1.22 (1.17/1.27)	
40-43	MAP	17	143 (142/146)		102 (100/105)		4.1 (3.4/4.6)		1.23 (1.12/1.26)	
	MAH 2	9	145 (145/146)		103 (102/107)		4.5 (3.9/4.7)		1.22 (1.11/1.24)	
	CG	17	144 (140/148)		103 (101/107)		4.1 (3.6/5.6)		1.25 (1.16/1.31)	
44-47	MAP	17	145 (139/148)		103 (101/106)		4.2 (3.7/5.0)		1.24 (1.19/1.32)	
	MAH 2	9	146 (144/148)		105 (104/107)		4.2 (3.8/4.5)		1.22 (1.12/1.35)	
	CG	17	145 (143/150)		105 (100/108)		4.2 (3.8/4.7)		1.31 (1.21/1.37)	
48-51	MAP	18	143 (141/146)		103 (99/108)		4.3 (3.4/4.7)		1.28 (1.13/1.34)	
	MAH 2	8	145 (143/147)		105 (102/108)		4.4 (3.7/4.8)		1.31 (1.14/1.33)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test, *P* < 0.05). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test, *P* < 0.05) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3, S4, S5 and S10 Tables.



Anlage A10

Supporting material STUDIE II, S8 Table

S8 Table: Concentrations of standard bicarbonate and standard base excess in mmol/L and hematocrit assessed in venous blood.

wpi	group	n	[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (st)] mmol/L		[BE <sub>Ecf</sub> ] mmol/L		Hct %	
			median (min/max)		median(min/max)		median (min/max)	
1-3	CG	25	28.4 (24.5/30.6)	b	5.9 (3.1/8.3)	b	35.3 (29.3/41.2)	n.s.
	MAP	48	28.1 (25.3/31.5)	b	5.8 (2.2/9.4)	b	34.9 (27.1/43.1)	
	MAH 2	9	26.2 (25.4/28.0)	a	2.9 (2.4/5.4)	a	35.8 (29.9/41.2)	
	MAH 1	9	26.9 (23.9/28.6)	a	3.7 (0.2/5.7)	a	34.6 (29.6/42.9)	
4-7	CG	25	28.1 (25.4/32.2)	b	5.5 (3.0/9.6)	b	40.1 (32.5/42.8)	b
	MAP	48	28.5 (23.3/33.5)	ab	5.8 (-0.6/11.7)	ab	40.5 (33.2/46.3)	b
	MAH 2	9	27.7 (25.0/31.0)	ab	4.9 (1.5/7.8)	ab	32.2 (20.9/36.1)	a
	MAH 1	8	26.0 (23.1/31.7)	a	2.7 (-0.7/8.7)	a	33.5 (21.4/35.5)	a
8-11	CG	25	27.6 (24.4/30.4)		4.5 (1.1/7.8)		37.4 (31.6/42.8)	bc
	MAP	47	27.3 (25.0/33.0)	n.s.	4.6 (1.3/10.8)	n.s.	38.2 (32.4/48.9)	c
	MAH 2	9	26.5 (23.1/30.3)		2.9 (-0.8/7.7)		31.8 (26.9/38.2)	ab
	MAH 1	6	27.8 (25.5/31.8)		3.8 (1.5/8.5)		31.7 (29.0/39.4)	a
12-15	CG	25	24.4 (20.6/27.7)	a	1.0 (-3.3/4.9)	a	34.4 (30.6/42.1)	a
	MAP	47	25.5 (19.7/30.6)	b	2.6 (-4.1/8.3)	b	36.1 (30.7/46.6)	b
	MAH 2	9	24.5 (22.2/28.6)	a	1.1 (-2.3/5.3)	a	33.7 (30.7/37.9)	a
16-19	CG	25	24.9 (21.2/28.3)	ab	1.6 (-3.0/5.8)	ab	32.5 (27.0/36.9)	
	MAP	35	24.8 (21.2/30.2)	b	1.4 (-3.1/7.4)	b	32.2 (24.6/38.7)	n.s.
	MAH 2	9	23.3 (22.4/24.9)	a	-0.8 (-1.4/1.2)	a	32.9 (27.8/34.6)	
20-23	CG	23	26.1 (21.1/28.9)	b	3.1 (-3.2/5.8)	b	33.2 (29.1/38.3)	
	MAP	34	25.9 (21.5/29.9)	b	2.7 (-2.9/7.4)	b	32.6 (26.2/39.6)	n.s.
	MAH 2	9	22.5 (20.9/27.2)	a	-1.4 (-3.7/3.8)	a	33.7 (28.4/37.0)	
24-27	CG	23	27.2 (20.8/30.8)	ab	4.1 (-3.6/8.0)	ab	34.7 (31.6/38.7)	
	MAP	34	27.1 (23.9/30.3)	b	4.1 (0.7/7.3)	b	34.0 (25.6/38.6)	n.s.
	MAH 2	9	25.5 (24.3/27.4)	a	2.5 (0.9/4.4)	a	34.1 (29.0/38.2)	
28-31	CG	20	28.0 (25.8/31.6)		5.0 (2.5/8.8)		36.1 (32.2/41.9)	
	MAP	23	28.1 (24.7/32.0)		5.3 (1.2/9.5)		35.2 (29.3/42.3)	
	MAH 2	9	27.8 (23.0/31.9)		4.6 (-0.8/9.2)		35.7 (30.1/38.5)	
32-35	CG	20	27.0 (25.7/29.7)		3.9 (2.4/7.0)		37.0 (31.5/47.9)	
	MAP	23	27.9 (24.4/29.7)		5.3 (1.0/7.0)		35.8 (29.6/40.6)	
	MAH 2	9	27.7 (25.9/28.7)		5.0 (2.6/6.2)		34.4 (31.4/40.3)	
36-39	CG	15	27.4 (25.0/31.3)		4.5 (1.9/9.2)		37.0 (31.9/41.5)	
	MAP	18	26.7 (23.5/30.3)		4.0 (0.1/7.6)		36.9 (32.6/40.4)	
	MAH 2	9	28.6 (26.7/28.8)		5.7 (3.5/6.0)		32.9 (30.7/33.6)	
40-43	CG	17	27.7 (24.5/30.1)		4.6 (1.8/7.6)		35.8 (31.1/40.4)	
	MAP	17	27.9 (24.5/29.4)		5.2 (1.0/6.4)		36.6 (31.0/40.9)	
	MAH 2	9	26.6 (25.3/28.3)		3.4 (2.0/5.4)		34.2 (31.7/38.5)	
44-47	CG	17	26.9 (25.0/30.2)		4.3 (1.7/7.5)		34.8 (30.5/40.7)	
	MAP	17	27.9 (25.7/29.5)		5.5 (2.6/6.6)		35.3 (29.7/40.7)	
	MAH 2	9	26.5 (25.9/27.5)		3.5 (2.6/4.6)		34.1 (32.4/41.4)	
48-51	CG	17	27.1 (25.0/32.2)		4.5 (2.1/9.7)		35.5 (31.3/40.8)	
	MAP	18	28.2 (23.9/30.3)		5.1 (0.1/7.9)		35.8 (27.3/42.7)	
	MAH 2	8	26.9 (23.2/28.6)		3.9 (-0.7/5.7)		35.2 (31.0/39.6)	

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test, *P* < 0.05). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test, *P* < 0.05) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3, S4, S5 and S10 Tables.

Anlage A11

Supporting material STUDIE II, S9 Table

S9 Table: Concentrations of beta 1, beta 2, alpha 1, and alpha 2 globulin in g/dL assessed in venous blood.

wpi	group	n	[Beta 1]	[Beta 2]	[Alpha 1]	[Alpha 2]
			g/dL	g/dL	g/dL	g/dL
			median (min/max)	median (min/max)	median (min/max)	median (min/max)
1-3	CG	25	35.3 (29.3/41.2)	1.1 (0.5/1.9)	1.3 (0.6/1.6)	5.9 (4.3/6.8)
	MAP	48	34.9 (27.1/43.1)	1.0 (0.6/1.8)	1.4 (0.7/2.1)	5.7 (3.3/7.7)
	MAH 2	9	35.8 (29.9/41.2)	1.3 (0.7/1.6)	1.4 (0.7/2.0)	6.6 (5.3/8.1)
	MAH 1	9	34.6 (29.6/42.9)	1.1 (0.7/1.2)	1.1 (0.7/1.8)	5.4 (3.8/8.4)
4-7	CG	25	40.1 (32.5/43.9)	1.6 (1.0/3.0)	1.5 (0.7/2.1)	5.0 (3.1/6.8)
	MAP	48	40.5 (33.2/46.3)	1.4 (0.7/2.5)	1.4 (0.6/3.6)	5.3 (2.3/8.6)
	MAH 2	9	32.2 (20.9/36.1)	2.2 (1.6/3.8)	1.4 (1.0/2.2)	7.0 (5.1/8.4)
	MAH 1	8	33.5 (21.4/35.5)	2.0 (1.0/4.6)	1.9 (1.3/3.0)	6.7 (3.8/8.5)
8-11	CG	25	37.4 (31.6/42.8)	1.8 (1.0/2.4)	1.4 (0.8/2.3)	4.9 (2.8/7.2)
	MAP	47	38.2 (32.4/48.9)	1.9 (1.0/4.2)	1.6 (0.8/2.6)	5.4 (2.3/7.9)
	MAH 2	9	31.8 (26.9/38.2)	2.1 (1.5/3.7)	1.8 (1.3/2.0)	6.5 (5.1/7.8)
	MAH 1	6	31.7 (29.0/39.4)	1.4 (0.4/5.0)	1.2 (1.0/2.2)	5.7 (3.8/7.0)
12-15	CG	25	34.4 (30.6/42.1)	1.7 (1.3/7.0)	1.5 (0.9/4.3)	4.9 (3.0/7.2)
	MAP	47	36.1 (30.7/46.6)	1.9 (1.0/9.5)	1.5 (0.9/2.3)	5.6 (2.4/8.1)
	MAH 2	9	33.7 (30.7/37.9)	2.0 (1.3/3.0)	1.6 (1.1/1.8)	6.3 (4.3/7.2)
16-19	CG	25	32.5 (27.0/36.9)	1.6 (1.0/2.5)	1.2 (0.8/3.0)	5.2 (2.6/7.0)
	MAP	35	32.2 (24.6/38.7)	2.1 (1.2/10.4)	1.9 (1.0/3.9)	6.1 (2.7/8.7)
	MAH 2	9	32.9 (27.8/34.6)	1.8 (1.2/4.0)	1.3 (1.1/1.9)	6.4 (3.9/7.0)
20-23	CG	23	33.2 (29.1/38.3)	1.6 (1.2/5.5)	1.5 (0.9/2.6)	5.4 (2.9/6.9)
	MAP	34	32.6 (26.2/39.6)	1.9 (1.4/6.9)	1.6 (1.0/2.9)	5.8 (2.4/9.3)
	MAH 2	9	33.7 (28.4/37.0)	1.9 (1.2/2.4)	1.3 (1.1/1.9)	6.0 (4.2/6.9)
24-27	CG	23	34.7 (31.6/38.7)	1.6 (0.9/2.8)	1.4 (1.0/2.0)	4.8 (3.2/6.5)
	MAP	34	34.0 (25.6/38.6)	1.9 (1.4/5.8)	1.5 (1.0/2.2)	5.6 (2.8/8.0)
	MAH 2	9	34.1 (29.0/38.2)	1.7 (0.9/2.6)	1.3 (1.2/2.0)	6.0 (4.4/6.8)
28-31	CG	20	36.1 (32.2/41.9)	1.6 (1.1/2.1)	1.4 (0.8/1.8)	5.2 (3.2/6.7)
	MAP	23	35.2 (29.3/42.3)	1.8 (1.2/2.8)	1.8 (1.1/2.3)	5.6 (2.6/8.5)
	MAH 2	9	35.7 (30.1/38.5)	1.4 (1.0/2.8)	1.4 (1.0/1.8)	5.7 (4.7/7.4)
32-35	CG	20	37.0 (31.5/47.9)	1.8 (0.9/3.5)	1.6 (0.9/2.3)	5.4 (2.8/6.7)
	MAP	23	35.8 (29.6/40.6)	1.8 (1.1/2.9)	1.5 (0.9/2.2)	5.3 (2.4/8.4)
	MAH 2	9	34.4 (31.4/40.3)	1.7 (1.0/3.3)	1.5 (1.0/1.7)	5.9 (4.6/7.9)
36-39	CG	15	37.0 (31.9/41.5)	1.6 (0.9/4.0)	1.3 (0.9/2.0)	5.1 (3.7/7.7)
	MAP	18	36.9 (32.6/40.4)	1.9 (1.1/5.4)	1.7 (0.9/2.4)	5.7 (2.5/7.7)
	MAH 2	9	32.9 (30.7/33.6)	2.3 (1.7/3.9)	1.5 (1.2/1.7)	5.6 (4.8/6.4)
40-43	CG	17	35.8 (31.1/40.4)	1.6 (0.9/2.2)	1.2 (0.9/1.7)	4.6 (3.1/6.0)
	MAP	17	36.6 (31.0/40.9)	1.9 (1.2/4.0)	1.6 (0.8/2.6)	5.1 (2.5/8.6)
	MAH 2	9	34.2 (31.7/38.5)	1.5 (1.3/2.5)	1.3 (1.1/1.7)	5.3 (4.4/7.2)
44-47	CG	17	34.8 (30.5/40.7)	1.4 (0.7/2.5)	1.2 (0.5/2.2)	4.9 (3.1/6.1)
	MAP	17	35.3 (29.7/40.7)	1.5 (1.3/3.5)	1.6 (1.0/2.7)	5.2 (2.4/8.1)
	MAH 2	9	34.1 (32.4/41.4)	1.4 (0.9/2.6)	1.3 (1.1/1.8)	5.5 (4.1/7.2)
48-51	CG	17	35.5 (31.3/40.8)	1.3 (0.9/3.7)	1.5 (1.0/2.2)	5.0 (3.0/6.5)
	MAP	18	35.8 (27.3/42.7)	1.5 (1.0/3.0)	1.5 (0.9/2.4)	5.3 (3.6/8.3)
	MAH 2	8	35.2 (31.0/39.6)	1.4 (0.9/3.6)	1.6 (1.3/2.0)	6.0 (4.6/7.6)

wpi, week post-inoculation. CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 1, sub-group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with acute, severe form of infection. MAH 2, sub-group with chronic form of infection. Different letters indicate significant differences between groups within one period (Mann-Whitney *U*-test,  $P < 0.05$ ). n.s., no significant differences between groups in the given period. From 28<sup>th</sup> week onwards Mann-Whitney *U*-test was not performed due to reduced numbers of observations. Significant differences within groups (Friedman test,  $P < 0.05$ ) from 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> wpi are given in S3, S4, S5 and S10 Tables.

## Anlage A12

### Supporting material STUDIE II, S10 Tables

**S10 Tables: P-values of Friedman test and consequently followed post hoc Wilcoxon rank-sum test applied to sub-group MAH 1 from the 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> to the 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> week post-inoculation (wpi).**

**S10 A:** MAH 1 [Gluc] (Friedman test: P = 0.009; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.028	0.345

**S10 C:** MAH 1 [K<sup>+</sup>] (Friedman test: P = 0.018; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.043	0.463

**S10 E:** MAH 1 [L-Lac] (Friedman test: P = 0.042; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.248	
8-11	0.027	0.917

**S10 G:** MAH 1 pCO<sub>2</sub> (Friedman test: P = 0.006; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.138	
8-11	0.028	0.028

**S10 I:** MAH 1 pH(v)<sub>BT</sub> (Friedman test: P = 0.009; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.116	
8-11	0.028	0.028

**S10 K:** MAH 1 [Alb] (Friedman test: P = 0.006; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.058	
8-11	0.028	0.028

**S10 M:** MAH 1 Alb/Glob (Friedman test: P = 0.002; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.028	0.028

**S10 O:** MAH 1 A<sub>tot Alb</sub> (Friedman test: P = 0.006; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.046	
8-11	0.028	0.028

**S10 Q:** MAH 1 SID<sub>m4</sub> (Friedman test: P = 0.03; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.141	
8-11	0.028	0.075

**S10 B:** MAH 1 [Na<sup>+</sup>] (Friedman test: P = 0.032; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.68	
8-11	0.046	0.027

**S10 D:** MAH 1 [Ca<sup>2+</sup>] (Friedman test: P = 0.003; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.028	0.028

**S10 F:** MAH 1 [iP] (Friedman test: P = 0.03; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.046	
8-11	0.028	0.917

**S10 H:** MAH 1 AG (Friedman test: P = 0.03; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.116	
8-11	0.028	0.046

**S10 J:** MAH 1 [TP] (Friedman test: P = 0.04; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.462	0.046

**S10 L:** MAH 1 [Gamma glob] (Friedman test: P = 0.006; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.027	
8-11	0.028	0.345

**S10 N:** MAH 1 A<sub>tot TP</sub> (Friedman test: P = 0.042; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.463	0.046

**S10 P:** MAH 1 SID<sub>m3</sub> (Friedman test: P = 0.03; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.173	
8-11	0.028	0.075

**S10 R:** MAH 1 SID<sub>m5</sub> (Friedman test: P = 0.03; P-values of Wilcoxon rank-sum test are given below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.116	
8-11	0.028	0.074

## Fortsetzung Supporting material STUDIE II, S10 Tables

**S10 S:** MAH 1 SIG<sub>TP</sub> (Friedman test: P = 0.042;  
P-values of Wilcoxon rank-sum test are given  
below)

wpi	1-3	4-7
4-7	0.028	
8-11	0.046	0.753

**Additional information to S6 Tables:** P-values > 0.05 were considered not significant.

MAH 1 Hct (Friedman test: P = 0.51)

MAH 1 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (Friedman test: P = 0.51)

MAH 1 [BE] (Friedman test: P = 0.61)

MAH 1 body temp. (Friedman test: P = 0.2)

MAH 1 [Beta 1] (Friedman test: P = 0.87)

MAH 1 SIG<sub>A1b</sub> (Friedman test: P = 0.85)

MAH 1 [Cl<sup>-</sup>] (Friedman test: P = 0.28)

MAH 1 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(st)] (Friedman test: P = 0.61)

MAH 1 [BE<sub>Ecf</sub>] (Friedman test: P = 0.85)

MAH 1 [Alpha 1] (Friedman test: P = 0.112)

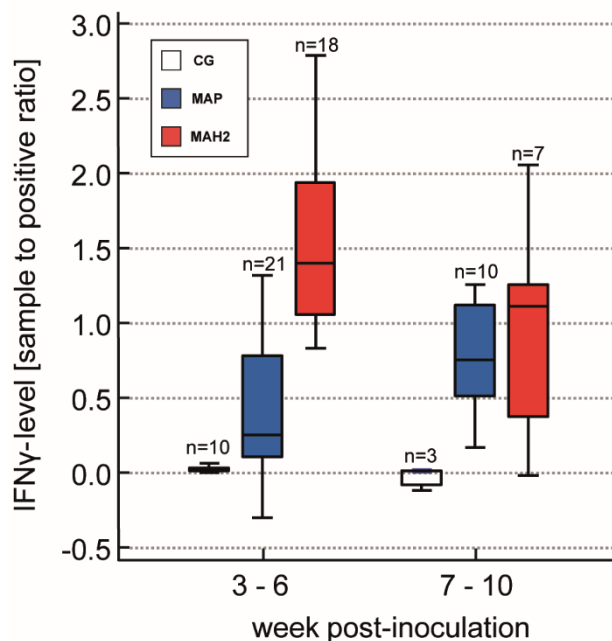
MAH 1 [Alpha 2] (Friedman test: P = 0.119)

MAH 1 [Beta 2] (Friedman test: P = 0.07)

Anlage A13

Supporting material STUDIE II, S1 Fig.

**S1 Fig. Levels of the pro-inflammatory cytokine IFN $\gamma$  (interferon-gamma) assessed in blood serum of goats.**



CG, control group. MAP, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. MAH 2, group infected with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* with chronic form of infection.

## 10 Publikationsverzeichnis

### 10.1 Publikationen mit Peer-Review-Verfahren

**Redlberger, S.;** Fischer, S.; Köhler, H.; Diller, R.; Reinhold, P. (2017):

*Age-dependent physiological dynamics in acid–base balance, electrolytes, and blood metabolites in growing goats.*

The Veterinary Journal 229; 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.017>

**Bassis, S.;** Fischer, S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2020)

*Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial infection in growing goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* or *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.*

PLoS ONE 15(12): e0243892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243892>

### 10.2 Publizierte Abstracts

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

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

Tagungsband der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie",  
30. März – 01. April 2016, Berlin (Deutschland), Vortrag.

**Redlberger, S.;** Fischer, S.; Köhler, H.; Reinhold, P. (2018)

Acid-base variables in acute and chronic form of nontuberculous mycobacterial Infection in goats experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Tagungsband der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie",  
21. – 23. Februar 2018, Wien (Österreich), Poster.

## 11 Danksagung

An erster Stelle gilt mein aufrichtiger Dank Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die exzellente fachliche Betreuung. Danke für die lehrreiche Unterstützung, die Anregungen sowie die ermunternden Worte zur richtigen Zeit.

Des Weiteren danke ich sehr herzlich Frau Dr. Heike Köhler für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung sowie die stets freundliche und aufmunternde Hilfe.

Ein großes Dankeschön gilt dem gesamten Team des Tierhauses für die stets sorgfältige Betreuung der Tiere. Mein Dank gilt auch Annelie Langenberg und Ines Lemser für die Vorbereitung und technische Unterstützung bei der Gewinnung und Aufarbeitung der Proben.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für molekulare Pathogenese, welche ich in der gemeinsamen Arbeit persönlich kennen lernen durfte, danke ich für die freundliche Aufnahme und die herzliche Atmosphäre. Ebenso gilt allen meinen Mitdoktoranden am Institut ein herzliches Dankeschön für den Erfahrungsaustausch, die freundschaftliche Unterstützung und die unvergessliche, gemeinsame Zeit.

Mein Dankeschön gilt außerdem Herrn Dr. Diller, Herrn Professor Dr. Doherr sowie Herrn Dr. Alexander Tichy für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der Statistik und für die Hilfe bei so mancher kniffligen Fragestellung.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich auch bei Frau Dr. Barbara Rabeling, bei der ich innerhalb meiner Promotionsphase angestellt war, dass ich jederzeit auf ihre Unterstützung während dieser herausfordernden Zeit bauen konnte.

Meinem Mann danke ich von ganzem Herzen, dass er in dieser ganzen Zeit für mich moralisch und unterstützend da war, für seine Rücksichtnahme und Geduld, sowie für die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Ein großer Dank gilt aber auch meinen Eltern, dass Sie mir mein Studium ermöglicht haben und immer in allen Lebenslagen für mich da sind.

## **12 Interessenskonflikte und Selbständigkeitserklärung**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

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

Berlin, den 08.04.2022

Stefanie Bassis









