

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

---

Eingereicht über das Institut für Veterinärphysiologie des Fachbereichs  
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Etablierung eines caprinen Infektionsmodells für die Paratuberkulose  
sowie Nachweis und Charakteristik der spezifischen Immunantwort  
gegenüber *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) unter  
Berücksichtigung verschiedener diagnostischer Fragestellungen**

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

vorgelegt von  
**Anneka Soschinka**  
Tierärztin  
aus Potsdam

Berlin 2016  
Journal-Nr.: 3854

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Kerstin E. Müller  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Peter Valentin-Weigand

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

goats; animal models; paratuberculosis; immune response; early diagnosis;  
diagnostic antigens; interferon; interleukin 10; cytokines; ELISA; real time PCR;  
antibody testing

Tag der Promotion: 14.10.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-800-9

**Zugl.: Berlin; Freie Univ.; Diss.; 2016**

Dissertation; Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte; auch die der Übersetzung; des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches; oder Teilen daraus; vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet; vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen; Warenbezeichnungen; usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme; dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Man hat mir beigebracht,  
mich strebend zu bemühen.  
Nicht weil es irgendwelche Garantien  
gäbe,  
sondern  
weil es die einzige Möglichkeit ist,  
dem Leben gegenüber Wort zu  
halten.*

*(M. Albright,  
2003)*

**Meinen Eltern  
in Dankbarkeit und Liebe**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung und Zielsetzung</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Literaturübersicht</i></b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Paratuberkulose</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Historischer Überblick und Bedeutung.....	3
2.1.2	Erreger .....	4
2.1.3	Epidemiologie .....	5
2.1.3.1	Tenazität, Übertragungswege, Wirtsspektrum und Prävalenz .....	5
2.1.3.2	Natürliche Infektionsdosen und Empfänglichkeit .....	7
2.1.4	Pathogenese und Immunologie der Paratuberkulose .....	8
2.1.4.1	Erregeraufnahme, Infektionsausbreitung, Entstehung pathohistologischer Veränderungen und klinischer Symptome .....	9
2.1.4.2	Interaktionen von MAP mit den Zielzellen .....	11
2.1.4.3	Aktivierung der zellulären Immunantwort im Gewebe .....	13
2.1.4.4	Untersuchung von Parametern der lokalen Immunreaktion im Blut und Rückschlüsse auf intestinale Reaktionsmechanismen .....	15
2.1.5	Pathologie .....	19
2.1.5.1	Rind .....	19
2.1.5.2	Schaf .....	19
2.1.5.3	Ziege.....	20
2.1.6	Klinische Symptome .....	21
2.1.6.1	Rind .....	21
2.1.6.2	Kleine Wiederkäuer .....	23
2.1.7	Diagnostik .....	23
2.1.7.1	Direkter MAP-Nachweis.....	23
2.1.7.2	Indirekte Nachweisverfahren .....	28
2.1.8	Prophylaxe und Therapie.....	33
2.1.8.1	Impfungen .....	36
<b>2.2</b>	<b>Infektionsmodelle</b> .....	<b>38</b>
<b>3</b>	<b><i>Arbeitshypothesen</i></b> .....	<b>42</b>
<b>4</b>	<b><i>Eigene Untersuchungen</i></b> .....	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Tiere, Materialien und Methoden</b> .....	<b>43</b>
4.1.1	Tiere .....	43
4.1.1.1	Identität und Herkunft.....	43
4.1.1.2	Umstallung und Einstellungsmanagement .....	43
4.1.1.3	Fütterung.....	44
4.1.1.4	Gruppeneinteilung.....	44
4.1.1.5	Betreuung und Hygieneregime .....	45
4.1.2	Materialien .....	46

4.1.2.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände, Verbrauchs- und Gebrauchs- materialien, Chemikalien und Reagenzien .....	46
4.1.2.2	Kits und Fertiglösungen, Medien und Lösungen zur PBMC-Isolation, PBMC-Restimulantien, Antikörper- und Reaktionskomponenten für die Zytokin-ELISAs .....	46
4.1.2.3	Primer.....	46
4.1.2.4	Puffer, Lösungen, Medien.....	46
4.1.2.5	Programme, Datenbanken, Online-Ressourcen.....	47
4.1.3	Methoden .....	47
4.1.3.1	Allgemeine Vorbemerkungen zu den verwendeten Methoden.....	47
4.1.3.2	Herstellung der Inokulationsdosis und Inokulation .....	47
4.1.3.3	Versuchsaufbau .....	49
4.1.3.4	Gewinnung von Kotproben und Untersuchung auf MAP .....	51
4.1.3.5	Gewinnung von Blut und Serum.....	52
4.1.3.6	PBMC-Isolierung und deren Re-Stimulation .....	52
4.1.3.7	Zytokinbestimmung auf Gen-Ebene mittels relativer real-time RT-PCR.....	54
4.1.3.8	Zytokinbestimmungen auf Proteinebene mittels hauseigener ELISAs .....	57
4.1.3.9	Antikörperbestimmung mittels eines kommerziellen ELISA-Testsystems .....	59
4.1.4	Weitere im Rahmen der Etablierung des Tiermodells durchgeführte Untersuchungen	59
4.1.4.1	Pathologische Untersuchung und Untersuchung von Gewebeproben auf MAP59	
4.1.4.2	Anzüchtung von MAP aus Gewebeproben.....	60
4.1.4.3	Klinische Untersuchung.....	60
4.1.5	Statistische Auswertung .....	61
5	<b>Ergebnisse</b> .....	62
5.1	<b>Etablierung des Tiermodells</b> .....	62
5.1.1	Ergebnisse der klinischen Untersuchung.....	62
5.1.2	Ergebnisse der pathologischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchungen.....	62
5.1.3	Ergebnisse der kulturellen Anzüchtung von MAP aus Gewebeproben verschiedener Organe	64
5.1.4	Ergebnisse der kulturellen Anzüchtung von MAP aus dem Kot .....	69
5.1.5	Angaben zur Messunsicherheit der <i>in-house</i> -ELISAs zur Bestimmung von IFN- $\gamma$ und IL-10	71
5.1.6	Ergebnisse der Bestimmung von IFN- $\gamma$ und IL-10 auf Proteinebene mittels quantitativer <i>in-house</i> -ELISAs .....	72
5.1.6.1	Fähigkeit der PBMC zur Sekretion von IFN- $\gamma$ nach einer Restimulation mit ConA oder SEB.....	72
5.1.6.2	Fähigkeit der PBMC zur Sekretion von IL-10 nach einer Restimulation mit ConA oder SEB.....	76
5.1.6.3	Unterschiede zwischen den IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Abhängigkeit von den zur Restimulation eingesetzten Konzentrationen von jPPD bzw. aPPD .....	79

5.1.6.4	Unterschiede zwischen den IL-10-Konzentrationen in Abhängigkeit von den zur Restimulation eingesetzten Konzentrationen von jPPD bzw. aPPD .....	81
5.1.6.5	Spezifität der IFN- $\gamma$ -Reaktion nach der Inokulation mit MAP .....	83
5.1.6.6	Spezifität der IL-10-Reaktion nach der Inokulation mit MAP .....	84
5.1.6.7	Kinetik der IFN- $\gamma$ -Reaktion im Versuchsverlauf .....	85
5.1.6.8	Kinetik der IL-10-Reaktion im Versuchsverlauf .....	88
5.1.7	Ergebnisse der mittels relativer real-time PCR bestimmten Expression verschiedener Zytokine .....	90
5.1.7.1	Vergleich der Transkriptionsrate der Gene einzelner Zytokine durch PBMC in Abhängigkeit vom Restimulans .....	91
5.2	Ergebnisse der Antikörperbestimmung .....	98
5.3	Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Zytokin- und Antikörperkonzentrationen sowie der Ausscheidung des Erregers mit dem Kot .....	100
5.4	Darstellung der Zusammenhänge zwischen pathologischen Befunden, Erregernachweis im Kot und den Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand ..	101
5.4.1	Gruppeneinteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit von den histologischen Gewebeeränderungen und den Ergebnissen des immunhistochemischen Mykobakteriennachweises in den Darmabschnitten und den zugehörigen Lymphknoten ...	101
5.4.2	Vergleich der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung der Gewebeeränderungen am Darm ..	101
5.4.3	Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung der Gewebeeränderungen in den Lymphknoten des Darmes .....	102
5.4.4	Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung des Mykobakteriennachweises am Darm	105
5.4.5	Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung des Mykobakteriennachweises in den Lymphknoten des Darmes .....	107
5.5	Auswertungen der Daten zu diagnostischen Fragestellungen .....	108
5.5.1	Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die Neutralisation von sekretiertem IL-10 in Überständen unstimulierter und jPPD-restimulierter PBMC .....	108
5.5.2	Unterscheidung inokulierter und nicht inokulierter Tiere anhand von Genexpressionsprofilen .....	112
5.5.3	Effekte einer PBMC-Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ und IL-10 .....	112
6	<i>Diskussion</i> .....	119
6.1	Eignung des Tiermodells .....	119
6.2	Immunologische und pathogenetische Reaktionsmechanismen .....	131

---

6.2.1	Grundlegende Überlegungen zur Interpretation der Ergebnisse der Zytokinbestimmung auf Protein- und Genexpressionsebene .....	131
6.2.2	Auswahl einer geeigneten Konzentration jPPD und aPPD .....	136
6.2.3	Spezifität der Reaktion .....	138
6.2.4	Abhängigkeit der Immunreaktion, der MAP-Ausscheidung, der klinischen Symptome und der pathologischen Befunde vom Alter der Tiere und der Inokulationsdosis 139	
6.2.5	Beurteilung und Interpretation des Infektionsverlaufs .....	143
6.2.5.1	IFN- $\gamma$ .....	143
6.2.5.2	IL-10 .....	145
6.2.5.3	Antikörperreaktion .....	146
6.2.5.4	Ausscheidung von MAP mit dem Kot .....	149
6.2.6	Zusammenhänge zwischen Parametern der Immunantwort, der Ausscheidung von MAP mit dem Kot und pathohistologischen Veränderungen im Darmgewebe und in den intestinalen Lymphknoten .....	152
6.3	Diskussion verschiedener diagnostischer Fragestellungen .....	160
6.3.1	Eignung des IFN- $\gamma$ -Tests zur Diagnostik der Frühstadien der Paratuberkulose .....	160
6.3.2	Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die Neutralisation von sekretiertem IL-10 in Überständen unstimulierter und jPPD-restimulierter PBMC .....	162
6.3.3	Eignung der getesteten rekombinanten MAP-Proteine als diagnostische Antigene zur Steigerung der Spezifität des IFN- $\gamma$ -Tests .....	165
6.3.4	Identifikation infizierter Ziegen mittels Genexpressionsprofils verschiedener Zytokine .....	168
6.4	Schlussfolgerungen und Empfehlungen für weiterführende Untersuchungen	171
7	<i>Zusammenfassung</i> .....	172
8	<i>Summary</i> .....	174
9	<i>Literaturverzeichnis</i> .....	176
10	<i>Anhang</i> .....	230
10.1	Materialien und Methoden .....	230
10.1.1	Charakterisierung der Einzeltiere, Ergebnisse der mikrobiologischen und parasitologischen Untersuchungen sowie Auswahl der Tiere für die real-time PCR .....	230
10.1.2	Materialien .....	232
10.1.2.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände .....	232
10.1.2.2	Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien .....	234
10.1.2.3	Chemikalien und Reagenzien .....	237
10.1.2.4	Kits und Fertiglösungen .....	239
10.1.2.5	Reagenzien für die Zellisolation .....	240
10.1.2.6	Antikörper und ELISA-Komponenten .....	241
10.1.2.7	Primer .....	242
10.1.2.8	Puffer, Lösungen, Medien .....	244



---

10.1.3	Durchführung der Zytokin-ELISAs.....	247
10.1.4	Beurteilungskriterien und Graduierung der pathohistologischen Veränderungen, Übersicht über entnommene Gewebeproben.....	248
10.2	Ergebnisse.....	250
10.2.1	Ergebnisse der Zytokinbestimmung mittels <i>in-house</i> ELISAs .....	250
10.2.2	Expressionsbestimmung verschiedener Zytokine mittels real-time PCR .....	258
10.2.3	Ergebnisse der Antikörperkonzentrationsbestimmung.....	263
10.2.4	Darstellung der Zusammenhänge zwischen pathologischen Befunden, Erregernachweis im Kot und den Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand .....	264
10.2.5	Zytokinsekretion nach PBMC-Restimulation mit vier rekombinanten MAP-Proteinen.....	265
10.3	Abbildungsverzeichnis .....	267
10.4	Tabellenverzeichnis .....	272
11	<i>Publikationsverzeichnis</i> .....	275
12	<i>Danksagung</i> .....	278
13	<i>Selbstständigkeitserklärung</i> .....	280

## Abkürzungsverzeichnis

a	aviär
°C	Grad Celsius
A	Absorption
b	Lichtweg
BFM	Bakterienfeuchtmasse
BZP	Beprobungszeitpunkt
c	Nukleinsäurekonzentration
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-II-Ionen
CC	Zellklon ( <i>cell clone</i> )
CD	Unterscheidungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
cv	Variationskoeffizient
d	Tag ( <i>day</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
e	wellenlängenabhängiger molarer Extinktionskoeffizient
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et. al	und andere ( <i>et alii</i> )
f	gemessener RNA-Gehalt
FAE	follikelassoziiertes Epithel ( <i>follicle associated epithelium</i> )
FAP	fibronectinbindendes Protein ( <i>fibronectin attachment protein</i> )
FLI	Friedrich-Loeffler Institut
GALT	Immungewebe des Darmes ( <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
h	Stunde
h	Menge umzuschreibender RNA pro Gesamtansatzvolumen pro Reaktionsgefäß
i	zu pipettierende RNA-Menge
ICK	<i>Ileocaecal</i> klappe
IE	Internationale Einheit

---

IFN	Interferon
IL	Interleukin
insg.	insgesamt
IPP	Ileale Peyer'sche Platte
IS	Insertionssegment
j	Johnin
<i>j</i>	Gesamtansatzvolumen pro Reaktionsgefäß
K	Kontrollgruppe
<i>k</i>	Gesamtansatzvolumen des Mastermixes pro Reaktionsgefäß
KbE	Kolonie bildende Einheiten
L	Ligand
<i>l</i>	Volumen der Differenz zum Gesamtansatz pro Reaktionsgefäß
LAA	Laborarbeitsanweisung
LAM	Lipoarabinomannan
<i>Ln.</i>	Lymphknoten ( <i>lymphonodulus</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lebenstag
M	Masse
<i>M.</i>	Mycobacterium
MAC	Mycobakterium avium Komplex
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspezies <i>paratuberculosis</i>
MAPKp38	Mitogenaktivierte Preoteinkinase p38
MAT	Milchaustauscher
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-II-Ionen
MHC	<i>Major Histokompatibilitätscomplex</i>
Min	Minimum
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<i>n</i>	Volumen zu pipettierenden Wassers
NK	Natürliche Killerzelle
NTC	Negativkontrolle ohne Probe ( <i>non template control</i> )
n. u.	nicht untersucht

---

OD	Optische Dichte
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit ( <i>Office International de Epizooties</i> )
p	Signifikanzniveau
<i>p</i>	25 µl RNA-Lösung
<i>p. i.</i>	nach der Inokulation ( <i>post inoculationem</i> )
PBMC	periphere mononukleäre Zellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PP	Peyer'sche Platte
PPD	Purified protein derivate
QS	Qualitätssicherung
<i>r</i>	Zellzahl pro Milliliter
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
Rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
RTK	Probe ohne reverse Transkriptase, Kontrolle
RTNTC	Probe ohne RNA für Reverse Transkription, Kontrolle ( <i>reverse transcription non template control</i> )
S	Score
s	Standardabweichung
Se	Sensitivität
SEB	<i>Staphylococcus aureus Enterotoxin B</i>
Sp	Spezifität
spp.	Unterart ( <i>subspecies</i> )
Tab.	Tabelle
TGF	Transformierender Wachstunmsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor

---

TNF	Tumornekrosefaktor ( <i>tumor necrosis factor</i> )
<i>u</i>	Milliliter Medium
U	Einheit ( <i>unit</i> )
V	Versuchsgruppe
VO	Verordnung
WI	Wachstumsindex
x	Anzahl
y	Milliliter Ursprungssuspension
z	Anzahl lebender PBMC
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Bei der Paratuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP), handelt es sich um eine unheilbare, chronische Erkrankung des Magen-Darm-Traktes der Haus- und Wildwiederkäuer. Sie geht mit großen wirtschaftlichen Verlusten, insbesondere in betroffenen Milchviehbetrieben, einher und steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Erkrankung Morbus Crohn des Menschen.

Die Regulation der Immunantwort des Wirtstieres gegenüber MAP wird bisher nur unzureichend verstanden. Eine sichere Diagnostik ist deshalb bis heute nicht möglich. Die Erkrankung ist nach der Infektion im Jungtieralter durch ein bis zu zehn Jahre andauerndes subklinisches Erkrankungsstadium gekennzeichnet. Anschließend auftretende klinische Symptome sind u. a. unstillbarer, infektiöser Durchfall und progressive Abmagerung. Infizierte Tiere sind in frühen Erkrankungsstadien nicht sicher identifizierbar. Dies liegt zum einen daran, dass sowohl die fäkale und z. T. intermittierende Erregerausscheidung als auch die Antikörperbildung erst in der späten subklinischen Phase einsetzen. Antikörper treten außerdem nicht bei allen Tieren auf. Zum anderen weist der kulturelle Erregernachweis zwar eine 100%ige Spezifität auf, ist jedoch aufgrund der Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium nicht 100%ig sensitiv. Die erhältlichen Antikörpertests weisen ebenfalls unzureichende Sensitivitäten und Spezifitäten auf.

Eine potentielle Möglichkeit infizierte Tiere auch im Frühstadium der Paratuberkulose zu identifizieren, ist der Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )-Test. Dabei werden spezielle Zellen aus dem Blut isoliert. Sie werden mit einem Gemisch aus MAP-Antigenen angeregt, bestimmte Botenstoffe (Zytokine), die der Kommunikation zwischen verschiedenen Immunzellen dienen, zu bilden. Eines dieser Zytokine ist das IFN- $\gamma$ , das als Marker für die Stärke der rasch nach der Infektion einsetzenden, protektiven, zellulären Immunantwort gilt. Das eingesetzte Proteingemisch ist das derzeit zur Verfügung stehende spezifischste MAP-Antigen. Aufgrund der hohen genetischen Verwandtschaft mit anderen Mykobakterienspezies kommt es jedoch häufig zu Kreuzreaktionen. Nach spezifischeren Antigenen zur Verbesserung der Testeigenschaften wird intensiv gesucht. Als Gegenspieler des IFN- $\gamma$  gilt Interleukin-10 (IL-10), das eine Rolle beim Übergang der frühen zellulären Immunität zur später einsetzenden Antikörperbildung spielen soll.

Voraussetzung um pathogenetische, diagnostische und therapeutische Fragestellungen zu beantworten, ist ein zuverlässiges Infektionsmodell an der Zielspezies von MAP. Derzeit etablierte Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Inokulationsdosis, des Inokulationszeitpunktes und der Infektionsrate, was einen Ergebnisvergleich erschwert. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein reproduzierbares, zuverlässiges Infektionsmodell

bei der Ziege zu etablieren, das internationalen Standards entspricht. Durch die Beurteilung der Immunantwort gegenüber zwei Inokulationsdosen und zwei -zeitpunkten sollte ein geeigneter Inokulationsmodus gefunden werden. Die zelluläre und humorale Immunantwort wurden auch hinsichtlich ihrer Abhängigkeit vom Erregergehalt in verschiedenen Organen und von der Schwere der pathohistologischen Befunde untersucht. Außerdem wurden vier potentiell antigenetisch wirkende MAP-Proteine auf ihre diagnostische Eignung im IFN- $\gamma$ -Test untersucht. Die Sensitivität des IFN- $\gamma$ -Tests sollte außerdem durch die Neutralisation von IL-10 erhöht werden. Die Genexpressionsanalyse weiterer Zytokine diente der intensiveren Charakteristik der Immunreaktion. Es wurden Paratuberkulose-spezifische Zytokinmuster als neue frühdiagnostische Marker gesucht.

Diese Arbeit soll zukünftigen Forschungsvorhaben zur Diagnostik und zur Pathogenese der Paratuberkulose ein standardisiertes Infektionsmodell zur Verfügung stellen. Ihre Ergebnisse sollen außerdem dazu beitragen, die Zusammenhänge zwischen Immunreaktion und Erkrankungsausprägung besser zu verstehen, den IFN- $\gamma$ -Test für die Routinediagnostik zu optimieren und neue Diagnostika für die Frühstadien der Paratuberkulose zu entwickeln.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Paratuberkulose

#### 2.1.1 Historischer Überblick und Bedeutung

Die erste wissenschaftliche Schilderung des Krankheitsbildes der Paratuberkulose erfolgte 1895 durch Johne und Frothingham. Dass es sich bei dem Erkrankungsbild nicht um Tuberkulose handelte, erkannte Bang (1906). Die Isolierung des ursächlichen Agens „*Mycobacterium (M.) enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne*“ gelang erst 1912 (Twort und Ingram 1912). Thorel et al. (1990) zeigten, dass es sich bei dem heute als „*M. avium* subspecies (spp.) *paratuberculosis*“ bezeichneten Erreger um eine Unterart von *M. avium* handelt.

Die Paratuberkulose ist eine der verlustreichsten Erkrankungen in Rinderbeständen (Collins 1994; Chi et al. 2002) und verursacht im Vergleich zu anderen bedeutenden Rinderkrankheiten die höchsten Gesamtkosten pro Herde und Jahr (Chi et al. 2002). Der ökonomische Schaden für die Milchwirtschaft der USA wurde mit 200 Millionen US\$ pro Jahr beziffert (Ott et al. 1999), französische Autoren gaben jährliche Mehrkosten von 1940 € pro klinisch erkranktem Milchrind an (Dufour et al. 2004), der Verlust australischer Schafhalter durch Paratuberkulose-bedingte Todesfälle betrug 13715 AU\$ im Jahr (Bush et al. 2006). Direkte Verluste werden durch erhöhte Todesraten, frühzeitige Schlachtungen sowie reduzierte Schlachtgewichte und eine geringere Milchleistung verursacht (Ott et al. 1999; Whitlock et al. 1985; Benedictus et al. 1987; Körmendy 1989; Hendrick et al. 2005; Gonda et al. 2007; Raizman 2007; Raizman 2009). Der Einfluss der Infektion auf die Milchinhaltsstoffe ist derzeit noch unklar (Hendrick et al. 2005; Gonda et al. 2007; Nordlund et al. 1996; Lombard et al. 2005). Eine geringere Futtermittelverwertung wurde dokumentiert (Körmendy et al. 1989).

Indirekt entstehen wirtschaftliche Schäden durch Zuchtausfälle, den Verlust genetischen Potentials, Remontierungskosten sowie Aufwendungen für Diagnostik, Behandlung und zur Durchführung von Kontrollmaßnahmen (Hasanova und Pavlik 2006).

Klinisch erkrankte Tiere waren anfälliger für Pneumonien (Raizman et al. 2007). Keine eindeutige Schlussfolgerung ließ sich in Bezug auf die Verknüpfung von Paratuberkulose und Eutergesundheit (Lombard et al. 2005; Nordlund et al. 1996; De Lisle und Milestone 1989; McNab et al. 1991a; Wilson et al. 1993; Merkal et al. 1975) und der Fruchtbarkeit von Hauswiederkäuern ziehen (Merkal et al. 1975; Johnson-Ifeorundu et al. 2000; Tiwari et al. 2003; Gonda et al. 2007; Kostoulas et al. 2006).

Eine Beteiligung von MAP an der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn des Menschen ist nicht auszuschließen. Dafür spricht, dass sich das klinische und

pathologische Bild beider Erkrankungen ähneln (Dalziel 1913) und MAP häufiger aus Darmbiopsien von Morbus Crohn-Patienten als aus Proben von Kontrollpersonen angezüchtet wurde (Schwartz et al. 2000; Bull et al. 2003). Außerdem gelang die Infektion verschiedener Tierarten mit humanen MAP-Isolaten (Chiodini et al. 1984a; McFadden et al. 1987). Antimykobakterielle Substanzen bewirkten bei Morbus Crohn-Patienten z. T. eine Verbesserung der Symptome, was eine Beteiligung von MAP an der Erkrankung vermuten lässt (Shafran et al. 2002; Borody et al. 2002). Ob es sich um einen kausalen Zusammenhang oder einen Faktor in einer multifaktoriellen Genese handelt, ist u. a. aufgrund der unzureichenden Evidenz vieler Studien derzeit nicht einschätzbar (Grant 2005; Schrauder et al. 2003; Waddell et al 2008).

### 2.1.2 Erreger

MAP gehört zur Ordnung *Actinomycetales*, der Familie *Mycobacteriaceae* und dem Genus *Mycobacterium*. Es ist dem genetisch homogenen *M.-avium*-Komplex (MAC) zuzuordnen. Die zu diesem Komplex gehörigen Erreger sind aufgrund spezifischer Genomabschnitte voneinander differenzierbar (Möbius und Köhler 2004).

MAP besitzt ein einsträngiges zirkuläres, guanin- und cytosinreiches Genom mit 4.829.781 Basenpaaren (Li et al. 2005). MAP-spezifisch sind die Insertionssequenzen (IS)900 (Green et al 1989), IS*Mav2* (Strommenger et al. 2001), IS*MAP02* (Stabel und Bannantine 2005) und weitere Genomabschnitte wie, *f57*- und *hspX70* (Poupart et al. 1993; Ellingson et al 1998).

Aufgrund genetischer und kulturmorphologischer Unterschiede ist MAP in zwei Biotypen einteilbar (Alexander et al. 2008; de Juan et al. 2005; Stevenson et al. 2002; Merkal und Curran 1974). Die einzelnen Typen bevorzugen bestimmte Wirte, sind jedoch nicht wirtsspezifisch (Stevenson et al. 2002). Typ-II kommt vorwiegend bei Rindern, aber auch bei Ziegen (de Juan et al. 2005), Schafen (Pavlik et al. 1999) und Wildwiederkäuern vor (Pavlik et al. 2000). Typ-I wird in erster Linie bei Schafen nachgewiesen, jedoch auch bei Ziegen und Rindern gefunden (de Juan et al. 2005; Whittington et al. 2001; Stevenson 2002). Es ist umstritten, ob es sich bei einer bestimmten Untergruppe einiger Schafstämme um einen dritten, vorwiegend aus Ziegen isolierten Biotyp handelte (de Juan et al. 2005; Stevenson 2015).

MAP ist ein schwach grampositives, aerobes, unbewegliches und nicht Sporenbildendes Stäbchenbakterium (Manning und Collins 2001), das eine für Mykobakterien typische komplexe Zellwandstruktur mit langkettigen Mykolsäuren aufweist. Die Zellwand besteht aus einer inneren, dicht gelagerten und einer weniger kompakten äußeren Lipidschicht (Jalier und Nikaido 1994; Brennan und Nikaido 1995). In der Zellmembran sind Lipoarabinomannan- und Arabinomannanmoleküle mit antigenetischen Eigenschaften verankert (Azuma et al. 1970; Jolly et al. 2011). Aufgrund ihrer Struktur ist die Zellwand hydrophob. Sie limitiert den Stoffaustausch lipophiler Substanzen zeitlich, woraus u. a. das langsame Wachstum von MAP (Jalier und Nikaido 1994), aber auch der evolutionäre Vorteil der Resistenz gegen

Umweltreize resultieren (Kapitel 2.1.3.1). Es wurden 309 zellwandassoziierte MAP-Proteine mit unklarer Funktion identifiziert (He und de Buck 2010). Anhand von Genomanalysen wurden verschiedene codierbare Proteine hinsichtlich ihrer möglichen Funktion mit denen anderer Bakterienspezies verglichen (Alexander et al. 2008; Amon et al. 2008); über die Stoffwechselfvorgänge von MAP ist jedoch wenig bekannt. Im Gegensatz zu anderen Mykobakterien fehlt ihm das essentielle, Eisen-Ionen bindende Mykobaktin.

### **2.1.3 Epidemiologie**

#### **2.1.3.1 Tenazität, Übertragungswege, Wirtsspektrum und Prävalenz**

Die Alkohol- und Säurefestigkeit von MAP schränkte die Wirksamkeit wasserlöslicher Desinfektionsmittel und Antibiotika ein (Chiodini et al. 1974; Jalier und Nikaido, 1994). Auch gegenüber Wärme, Kälte und einem sauren Boden-pH-Wert erwies sich MAP als sehr widerstandsfähig (Larsen et al 1956; Richards und Thoen 1977; Khare et al. 2008; Whittington et al. 2004; Ayele et al. 2005). Der Erreger überlebte die Pasteurisierung von Milch (Grant et al 1998; Hammer et al 2003; Ayele et al. 2005). Angaben zur Überlebenszeit von MAP in Rinderkot auf der Weide, in Gülle, Kompost, im Ferment von Biogasanlagen, Ab- und Leitungswasser schwankten zwischen 100 Stunden (h) und 13 Monaten (Lovell et al 1944; Gay und Sherman 1992; Whittington et al. 2004; Jørgensen 1977; Grewal et al 2006; Whan et al. 2005; Slana et al. 2011). Steigende Temperaturen und ultraviolette Strahlung sowie ein hoher Ammoniakgehalt in der Umgebung beeinflussten die Abtötung positiv (Larsen et al. 1956). Unter anaeroben Silierungsbedingungen wurde MAP trotz eines sauren pH-Werts innerhalb von 14 Tagen abgetötet (Katayama et al. 2000).

Die Paratuberkulose betrifft hauptsächlich Haus- und Wildwiederkäuer (Clarke 1997). In Gatterwildhaltungen wird eine steigende Anzahl klinischer Erkrankungen als Problem wahrgenommen (Mackintosh et al. 2003). Auch monogastrische Wildsäuger und Vögel wurden infiziert (Corn et al. 2005; Deutz et al. 2005; Beard et al. 2001a; Beard et al. 2001b; Judge et al. 2005; Raizman et al. 2005). Kaninchen gelten regional als MAP-Reservoir (Judge et al. 2006; Raizman et al. 2005). Es existieren Berichte zum Erkrankungsnachweis bei Hund (Vogel, 1977), Esel (van Ulsen 1970; Stief et al. 2012) und Schwein (Runnels 1955). Die Katze gilt als asymptomatischer Träger (Palmer et al 2005). Eine experimentelle Infektion von Hühnern (Larsen und Moon 1971), Mäusen und anderen Labortieren war möglich (Chandler 1961; Larsen und Miller 1979, Kapitel 2.2).

MAP wurde im Kot von exponierten Kälbern (Antognoli et al. 2007; van Roermund et al. 2007), subklinisch infizierten und klinisch erkrankten adulten Tieren (Rosenberger 1978; Chiodini 1984) ausgeschieden und wird oral aus der Umgebung (Sweeney 1996; van Roermund et al. 2007; Marcé et al. 2011) oder über das verunreinigte Euter der Mutter vom Jungtier aufgenommen (Sweeney 1996). Die direkte Übertragung von Kalb

zu Kalb wurde nachgewiesen, bei sehr hohem Erregerdruck war sie auch zwischen adulten Rindern möglich (van Roermund et al. 2007; Wells et al. 2012).

MAP wird in Abhängigkeit von der Intensität der fäkalen Ausscheidung über die Milch (insbesondere Kolostrum) von klinisch erkrankten und subklinisch infizierten Tieren ausgeschieden (Taylor et al. 1981; Sweeney et al. 1992a; Streeter et al. 1995; Thompson et al. 2007; Lambeth et al. 2004).

Eine intrauterine Infektion wurde bei Rindern, Wildwiederkäuern und Schafen bewiesen (Pearson und Mc Clelland 1955; Lawrence 1956; Sweeney et al. 1992b; Thompson et al. 2007; Deutz et al. 2005; Lambeth et al. 2004). Bisher gelang kein MAP-Nachweis in Oozyten und kryokonservierten Embryonen (Kruip et al. 2003; Perry et al. 2006). Aus Geschlechtsorganen und Sperma klinisch erkrankter und subklinisch infizierter Bullen konnte MAP angezüchtet werden (Ayele et al. 2004; Larsen et al. 1981, Münster et al. 2013). Eine Übertragung durch natürliche oder künstliche Besamung ist bisher nicht dokumentiert. Da eine nasale und intratracheale Infektion von Kälbern gelang, wird die aerogene Verbreitung von MAP diskutiert (Eisenberg et al. 2011).

Das Übertragungsrisiko vom kleinen Wiederkäuer auf Rinder wird kontrovers diskutiert (Muskens et al. 2000; Heuer et al. 2012; Moloney und Whittington 2008). Zwischen verschiedenen Nutztierbeständen stellt der Zukauf latent infizierter oder subklinisch erkrankter Rinder das größte Übertragungsrisiko dar (Bang 1906; Sweeney 1996; Whittington und Sergeant 2001). Die Übertragung von MAP zwischen Wildtierpopulationen und benachbarten Nutztierhaltungen scheint möglich (Beard et al. 2001a; Judge et al. 2005, 2006; Pavlik et al. 2000; Deutz et al. 2005; Raizman et al. 2005; Florou et al. 2008; Greig et al. 1999; Fritsch et al. 2012).

Die Paratuberkulose wird von der Weltorganisation für Tiergesundheit (*Office International des Epizooties*, OIE) als Erkrankung mit sozioökonomischer Bedeutung und Relevanz für die menschliche Gesundheit eingestuft (OIE 2014). Sie kommt in Nord- und Südamerika (Kruze et al. 2006; Ristow et al. 2007; Paolichii et al. 2003), Australien, Asien und Afrika vor (Benazzi et al. 1995; Michel und Bastianello 2000). Auch die meisten europäischen Staaten sind von der Erkrankung betroffen (Holstad et al. 2005; Fridriksdottir et al. 2000; Nielsen 2003; Woodbine et al. 2009; Clegg et al. 2009; Muskens et al. 2000; Boelaert et al. 2000; Mercier et al. 2010; Pozzato et al. 2011; Falconi et al. 2009; Liapi et al. 2011; Ocepek et al. 2002; Pavlik et al. 1994; Khol et al. 2007). Schweden hat eine sehr geringe Prävalenz und galt lange Zeit als frei von der Erkrankung (Holmström und Stenlund 2005; Viske et al. 1996).

Die Einzeltierprävalenz beim Rind in verschiedenen europäischen Ländern schwankt zwischen 0,0 % und 19,8 %, beim Schaf zwischen 0,3 % und 0,6 % und bei der Ziege zwischen 0,0 % und 1,7 % (Nielsen und Toft 2008). In den Jahren 1997 bis 2007 waren bis zu 68,0 % der Rinderherden, 52 % der Ziegenbestände und 24 % der Schafherden in Europa von Paratuberkulose betroffen (Nielsen und Toft 2008). Es existiert keine

deutschlandweite Prävalenzstudie. Insbesondere aus Gebieten mit erhöhtem Meldeaufkommen fehlen Angaben zur Verbreitung der Erkrankung. Es wird davon ausgegangen, dass die Paratuberkulose in Mutterkuhbeständen weniger stark verbreitet ist als in Milchviehherden.

### 2.1.3.2 Natürliche Infektionsdosen und Empfänglichkeit

Die Erregermenge, die für eine natürliche Infektion mindestens notwendig ist, ist unbekannt. Es wird angenommen, dass kurz nach der Geburt wenige MAP für die Etablierung einer chronischen Infektion ausreichen, während mit zunehmendem Alter höhere Dosen nötig sind (Sweeney et al. 1996). Eine Altersabhängigkeit der Empfänglichkeit für die Infektion wird diskutiert (Sweeney 1996; Chiodini et al. 1984b). Unterstützt wird diese Hypothese durch Studienergebnisse an Rindern und Wildwiederkäuern, da der Grad pathologischer Veränderungen bei diesen Tierarten mit zunehmendem Alter ebenso sank (Larsen et al. 1975) wie die Wahrscheinlichkeit einer subklinischen Infektion oder klinischen Erkrankung (Rankin 1961a; Macintosh et al. 2010). Clarke (1997) ermittelte die höchste Empfänglichkeit von Kälbern unter 30 Tagen und eine sich später entwickelnde altersabhängige Resistenz. Eine altersabhängige Empfänglichkeit bei Schafen wird angenommen (Brotherston et al. 1961).

Als Gründe für die erhöhte Jungtierempfänglichkeit werden die erhöhte Aufnahmefähigkeit von Makromolekülen über den Darm in den ersten Lebensstunden und eine damit verbundene Herabsetzung der mukosalen Barriere (Sweeney 1996), das funktionell noch nicht ausgereifte neonatale Immunsystem (Cocito 1994), weniger M-Zellen im *Ileum* adulter Tiere (Chiodini et al. 1996) und die Altersinvolution der Peyer'schen Platten genannt (Lepper und Wilks 1988). Eine Opsonierung von MAP durch kolostrale Antikörper führte zu einer erhöhten Erregeraufnahme (Momotani et al. 1988). Unabhängig vom Alter korrelierte das Infektionsrisiko positiv mit einer steigenden Einzeltierprävalenz in der Herde (Koets et al. 2000).

Empfänglichkeitsunterschiede gegenüber der Paratuberkulose zwischen einzelnen Rinderrassen (Rosenberger 1978) wurden aufgrund ihrer Haltungsbedingungen unter prädisponierenden Umweltbedingungen evtl. vorgetäuscht (Chiodini et al. 1984b). Die Hypothese, dass genetische Faktoren die Empfänglichkeit gegenüber MAP beeinflussen (Koets et al. 2000) wird jedoch durch verschiedene Studien unterstützt. Die Untersuchungen stellten Unterschiede in den Mutationshäufigkeiten bestimmter Zielgene zwischen infizierten und nicht infizierten Rindern und Schafen fest (Pinedo et al. 2009; Reddacliff et al. 2005; Bhide et al. 2009; Küpper et al. 2012). Auch die Immunantwort und die Ausprägung der Infektion variierten bei verschiedenen murinen und cerviden Vererbungslinien (Chandler 1961; Mackintosh et al. 2011).

Die verschiedenen MAP-Stämme scheinen eine unterschiedlich starke Virulenz bei verschiedenen bovinen Spezies zu haben (Stabel et al. 2003). Typ-II-Stämme waren für

Rotwild und Rinder virulenter als Typ-I-Stämme (O'Brien et al. 2005; Mackintosh et al. 2007; Heuer et al. 2012; Moloney und Whittington 2008).

Die fäkale MAP-Ausscheidung erfolgt v. a. im klinischen Erkrankungsstadium kontinuierlich und bei subklinischen Infektionen intermittierend (Chiodini et al. 1984b). Sie ist auch bei inokulierten Färsen und Kälbern im latenten Infektionsstadium nachgewiesen (Kalis et al. 1999; Antognoli et al. 2007; van Roermund et al. 2005). Bisher wurde ausschließlich in experimentellen Studien – nicht jedoch unter natürlichen Bedingungen - eine passive Ausscheidung des Erregers demonstriert (Sweeney et al. 1992c; Begg et al. 2005; Mc Donald et al. 1999). Es ist unklar, ob die in experimentellen Untersuchungen nachgewiesenen Erregermengen im Kot denen entsprechen, die unter natürlichen Bedingungen ausgeschieden werden. Inwieweit der Erreger in der Umwelt und den Vormägen der Tiere verdünnt wird und welche Mengen MAP aufgenommen werden müssten, um die Nachweisgrenze in der Kotkultur zu erreichen, ist ebenfalls unbekannt (Gierke und Köhler, 2009). Bei gleichen Infektionsdosen variierten die Krankheitsausprägung und der Zeitpunkt des Beginns der Erregerausscheidung individuell (Sweeney et al. 1992b).

#### 2.1.4 Pathogenese und Immunologie der Paratuberkulose

Die Infektion mit MAP erfolgt über M-Zellen im Darmepithel oberhalb des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (*gut associated lymphoid tissue*, GALT; Momotani 1988; Lugton 1999; Sigurðardóttir 2001). Diese spezialisierten Epithelzellen nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf, transportieren sie durch die Zelle und geben sie auf der basalen Zellseite über eine durchbrochene Membran an Immunzellen aus den darunter liegenden Peyer'schen Platten (PP) ab (Landsverk et al. 1991; Owen 1983; Sigurðardóttir et al. 2001; Lugton 1999). Die PP stellen Anhäufungen kleiner Lymphknötchen aus Follikeln dar, die durch Interfollikularzonen voneinander getrennt sind. Zwischen Follikel und dem assoziierten Darmepithel (*follicle associated epithelium*, FAE) befinden sich die Domes.

Beim Wiederkäuer unterscheidet man nach dem histologischen Aufbau, der Entwicklung und Lokalisation die *ileale* und die *jejunale* PP (Reynolds und Morris 1983; Valheim et al. 2002; Landsverk et al. 1991). Weitere PP, vom *jejunalen* Typ treten in der *Ileocaecalklappe* (ICK) und im proximalen *Colon* auf (Valheim et al. 2002). Aufgenommene Antigene werden im *Ileum* vermutlich an B-Zellen, im *Jejunum* aber an T-Zellen präsentiert (Ekino et al. 1980; MacDonald 2003). Die *ileale* PP (IPP) unterliegt einer Altersinvolution (Reynolds und Morris 1983; Valheim et al. 2002).

Die Zielzellen von MAP sind Makrophagen, die untereinander und mit anderen Immunzellen u. a. über Zytokine kommunizieren. Diese Botenstoffe sind auto- oder parakrin wirkende, meist glykosilierte Proteine, die mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren und über verschiedene intrazelluläre Signalwege unterschiedliche Reaktionen in der Zelle hervorrufen. Ihre Sekretion und Wirkung sind abhängig vom Zelltyp, seinem Reifungsstadium, seiner Rezeptorausstattung und der

ausgelösten Signaltransduktionskaskade. Zytokine werden u. a. in pro- und antiinflammatorisch wirkend eingeteilt (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Auswahl und Charakterisierung pro- und antiinflammatorisch wirkender Zytokine. (modifiziert nach Schütt und Bröker, 2006 sowie Kirchner et al. 1994).

Zytokin	Gruppe	Produzent	Funktion
<b>Interferon-gamma</b> (IFN- $\gamma$ )	PI	T-Zellen NK-Zellen Makrophagen	Makrophagenaktivierung $\uparrow$ MHC-II-Expression
<b>Interleukin-10</b> (IL-10)	AI	T-Zellen B-Zellen Monozyten Makrophagen	$\downarrow$ Zytokinproduktion von Makrophagen und Th1-Zellen $\downarrow$ Produktion von Sauerstoffradikalen und MHC-II-Molekülen auf Makrophagen $\uparrow$ Proliferation und Differenzierung von B-Zellen
<b>Tumor-Nekrosefaktor alpha</b> (TNF $\alpha$ )	PI	Monozyten Makrophagen	Tumornekrosen $\uparrow$ Phagozytose und Zytotoxizität der Makrophagen $\uparrow$ Expression von Adhäsionsmolekülen auf Granulozyten und Endothelzellen $\uparrow$ MHC-I-Expression auf Fibroblasten und Endothelzellen Zusammen mit IL-1 Aktivierung antigenstimulierter T-Zellen, Antikörperproduktionsregulation
<b>Interleukin-12p40</b> (IL-12p40)	PI	Dendritische Zellen Makrophagen B-Zellen	Differenzierung von Th1-Zellen Aktivierung von NK-Zellen
<b>Transforming growth factor beta</b> (TGF $\beta$ )	AI	T-Zellen Dendritische Zellen Monozyten Chondrozyten	$\downarrow$ Proliferation B- und Th1/Th2-Zellen, Makrophagen $\downarrow$ B-Zelldifferenzierung Chemotaxis Makrophagen Additiv zu anderen Zytokinen Proliferationsförderung von Endothelzellen und Fibroblasten

Erläuterungen: AI = antiinflammatorisch, MHC = Majorhistokompatibilitätskomplex, NK-Zellen = natürliche Tötungs- (killer) Zellen, PI = proinflammatorisch, Th-Zellen = T-Helferzellen

#### 2.1.4.1 Erregeraufnahme, Infektionsausbreitung, Entstehung pathohistologischer Veränderungen und klinischer Symptome

Die Aufnahme von MAP wird durch fibronectinbindende beta-1-Integrine der M-Zellen vermittelt (Secott et al. 2004). MAP exprimiert ebenfalls ein fibronectinbindendes Oberflächenprotein (*fibronectin attachment protein*, FAP, Secott et al. 2001). Eine

Brückenbildung zwischen MAP und M-Zelle proximal des *Ileums* wird vermutet (Secott et al. 2004, 2002; Sigurðardóttir 2004). Weitere Aufnahmemechanismen wie die Beteiligung eines 35kDa großen Membranproteins und weiterer fibronektinbindender, MAP-Proteine aus dem Antigen85-Komplex werden diskutiert (Kuo et al. 2012). Die Aufnahme von MAP wurde durch das Vorhandensein von Kolostrum erhöht (Momotani et al. 1988). Die Rolle maternaler Antikörper bei diesem Prozess ist gegenwärtig unklar. Eine von Integrinen unabhängige MAP-Aufnahme in murine Epithelzellen führte zur Aktivierung angeborener Abwehrmechanismen und der entsprechenden Chemokinsekretion (Bermudez et al. 2010; Pott et al. 2009). Ob es sich um einen dosisabhängigen Effekt handelte und die natürlichen Verhältnisse im Wiederkäuer widerspiegelt wurden, ist unbekannt.

Nach der Passage durch das Darmepithel wird MAP von sub- und intraepithelial liegenden Makrophagen aufgenommen (Momotani 1988) und breitet sich später in die *Lamina propria*, die Domes, die *Submukosa* und die Interfollikularzone der PP aus (Sigurðardóttir et al. 2004).

Der Erreger wurde auch frei im Gewebe nachgewiesen (Sigurðardóttir et al. 2001). Zunächst waren hauptsächlich *Ileum*, *Jejunum* und die entsprechenden Lymphknoten betroffen (Wu et al. 2007; Reddacliff und Whittington 2003; Munjal et al. 2005; Kurade et al. 2004). Es wird postuliert, dass sich die Infektion an einem Ort manifestiert und von dort aus weiter verbreitet (Wu et al. 2007; Kurade et al. 2004), da mit steigender Versuchsdauer die Anzahl positiver Gewebeproben im *Ileum* von Kälbern zunahm und sich die Infektion anschließend bis in das *Duodenum* ausbreitete (Allen et al. 2009). Als Erregerreservoir werden die Mesenteriallymphknoten vermutet (Wu et al. 2007). Die Mechanismen der Ausbreitung von MAP sind unklar. Zunächst war der Erreger nur kulturell in den Organen nachweisbar (Allen et al. 2009; Begg et al. 2005). Durch die Erregerverbreitung und die nachfolgende Immunreaktion entstehen zahlreiche granulomatöse Entzündungsherde, die zu Verdickungen der Darmwände und mit zunehmender Infektionsdauer zu histologisch und später makroskopisch sichtbaren Läsionen führen (Buergelt et al. 1978; Begg et al. 2005; Munjal et al. 2005). Die Ausprägung des Läsionsgrades korrelierte in einer Studie nicht mit der Infektionsdauer, weshalb eine individuell sehr unterschiedliche Empfänglichkeit für die Infektion angenommen wurde (Kurade et al. 2004). Jungtiere zeigten größere und weniger gut begrenzte Läsionen als adulte mit derselben Dosis inokulierte Schafe (Delgado et al. 2012). Gut begrenzte tuberkuloide Läsionen führten bei Schafen zu einer geringeren Ausscheidung als lepromatöse Veränderungen (Burrells et al. 1998). Bei milden Läsionen trat häufiger eine intermittierende, bei starken Läsionen zunächst eine intermittierende und später kontinuierliche Ausscheidung auf (Kurade et al. 2004).

Klinische Symptome traten hauptsächlich bei Tieren mit schweren histologischen Läsionen oder makroskopisch sichtbaren Veränderungen auf (Kurade et al. 2004; Pérez et al. 1999; Shu et al. 2011; Storset et al. 2001), jedoch zeigten nicht alle Tiere mit solchen Veränderungen auch klinische Symptome (Begg et al. 2005; Storset et al.



2001). Waren Symptome der Paratuberkulose vorhanden, enthielten die Läsionen häufig eine große Anzahl MAP und waren durch die Dominanz von Epitheloidzellen und Makrophagen gekennzeichnet (Koets et al. 2002; Kurade et al. 2004; Pérez et al. 1999).

#### 2.1.4.2 Interaktionen von MAP mit den Zielzellen

Makrophagen Paratuberkulose-unverdächtigter Tiere töteten MAP deutlich effektiver ab als solche von tatsächlich infizierten oder mit MAP exponierten Rindern, die sich hinsichtlich der Phagozytose- und Überlebensrate von MAP nicht unterschieden (Khalifeh und Stabel 2007; Gollnick et al. 2007; Weiss et al. 2005). Bovine Isolate wiesen eine höhere Überlebensrate auf als ovine (Gollnick et al. 2007; Janagama et al. 2006). Auch Isolate aus dem Herkunftsbetrieb der Tiere überlebten besser als solche, zu denen die Rinder vorher keinen Kontakt hatten (Gollnick et al. 2007).

An der Phagozytose von MAP sind verschiedene Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche beteiligt (Souza et al. 2007a). Da Mykobakterien-LAM an verschiedene dieser Rezeptoren band (Schorey und Cooper 2003), wird seine Beteiligung an der Erregeraufnahme vermutet (Weiss und Souza 2008). Serum von infizierten oder gesunden Tieren erhöhte *in vitro* die MAP-Aufnahme in primäre bovine Makrophagen (Zurbrick und Czuprynski 1987). Eine Opsonisierung durch im Serum enthaltene Komplementfaktoren oder MAP-Antikörper wird vermutet (Woo und Czuprynski 2008; Hostetter et al. 2005).

Das nach der Erregeraufnahme entstandene Phagosomen fusioniert unter physiologischen Bedingungen mit verschiedenen Endosomenstadien, die unterschiedliche, bakterizid wirkende Stoffe enthalten (Bainton 1981). Das Phagosomen unterliegt dadurch einem Reifungsprozess, der durch einen pH-Wert-Abfall, den Verlust von Membranproteinen und Unterschieden in der Expression von Reifungsmarkern gekennzeichnet ist (Jahraus et al. 1998). Ausschließlich lebende MAPs (Hostetter et al. 2003; Kuehnelt et al. 2001; Woo et al. 2007) hemmten durch die Beeinflussung dieser Prozesse die Fusion mit späten Reifungsstadien der Endosomen, überlebten und vermehrten sich intrazellulär (Zurbrick und Czuprynski 1987; Hostetter et al. 2003; 2005; Weiss et al. 2002; Souza et al. 2007b; Weiss et al. 2004). Die Expressionsverminderung der zur Ansäuerung des Phagosomens notwendigen Protonenpumpe (Weiss et al. 2004; Kabara et al. 2010) und die daher fehlende pH-Wert-Absenkung stellen eine entscheidende Überlebensstrategie dar (Kühnel et al. 2001; Weiss et al. 2004, 2005).

Weiterhin entscheidend für das intrazelluläre Überleben von MAP scheint der Aktivierungszustand der Zelle zu sein. In gleichzeitig mit IFN- $\gamma$  und Lipopolysacchariden (LPS) aktivierten murinen Makrophagen war eine Phagosomen-Lysosomenfusion und eine Erregerabtötung möglich (Hostetter et al. 2002). IFN- $\gamma$  allein bewirkte dagegen keine Erregerverringerng (Weiss et al. 2002; Zurbrick et al. 1988). Unabhängig von der Zellaktivierung durch IFN- $\gamma$  wurde die Majorhistokompatibilitätskomplex (MHC)-I- und -II- Expression an der

Makrophagenoberfläche verringert und so die T-Zell-Reaktion einschränkt (Weiss et al. 2001, 2004a). Eine Makrophagenaktivierung wird so unwahrscheinlicher. Auch die Apoptosehemmung in infizierten Zellen verhinderte einen Zugriff der zellulären Immunantwort auf MAP (Weiss et al. 2005; Woo et al. 2007).

Die Komplexität der MAP-Wirtszellinteraktionen verdeutlichten Kabara et al. (2010), die Expressionsunterschiede von 78 Genen verschiedener Funktionsgruppen zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen untersuchten. Die genauen molekularen Signaltransduktionswege zwischen Erreger und Zielzelle sind bisher ungeklärt. Eine wichtige Rolle scheint IL-10 einzunehmen, da infizierte Makrophagen im Vergleich zu nicht infizierten und unspezifisch aktivierten Zellen durch eine erhöhte Expression und Sekretion von IL-10 gekennzeichnet waren (Weiss et al. 2002; Borrmann et al. 2011; Sommer et al. 2008). Die Ausschüttung des Zytokins stieg mit zunehmender Menge der zugegebenen Bakterien (Borrmann et al. 2011).

Die Expression von IL-10 wird über den Mitogen aktivierten Proteinkinase p38-Signalweg (MAPKp38) beeinflusst. MAP aktivierte diesen Weg über Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) und erhöhte so die Expression, nicht aber die Sekretion von IL-10 (Weiss et al. 2008; Souza et al. 2008), MAPKp38 wurde jedoch nicht direkt aktiviert (Sommer et al. 2008). Eine TLR2-Blockierung von mit MAP inkubierten bovinen Makrophagen führte zu einer Erhöhung der Phagosomenansäuerung, der Erregerabtötung und der Expression eines Fusionsmarkers von Phagosomen und Lysosomen. Die gesteigerte IL-10-Expression wurde des Weiteren mit einer verminderten Genexpression für die energieabhängige Protonenpumpe in der Phagosomenmembran und für MHC-II-Gene in infizierten Makrophagen in Verbindung gebracht. IL-10 verhinderte die Phagosomenansäuerung, die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen und eine vermehrte MAP-Abtötung (Weiss et al. 2005). Dass eine unvollständige Hemmung des MAPKp38-Signalweges stattfindet und MAP über selbst produzierte TLR2-Liganden die Monozytenaktivität beeinflusst, wird angenommen (Weiss et al. 2008).

IL-10 scheint eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokinantwort von infizierten Makrophagen zu fördern, da es die Expression von Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )-, IL-12- und IL-8-Genen hemmt (Weiss et al. 2005). Auch die Expression anderer Zytokine verändert sich, ohne dass eine pro- oder antiinflammatorische Makrophagenantwort überwiegt. So wurden in spezifisch restimulierten Makrophagen die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stärker exprimiert als in nicht oder unspezifisch restimulierten Zellen (Weiss et al. 2002; Borrmann et al. 2011; Adams und Czuprynski 1994). Dagegen wurde das ebenfalls entzündungsfördernde IL-12p40 nach der Zellaktivierung von infizierten Makrophagen über den Unterscheidungsgruppen (*cluster of differentiation*, CD) 40-Liganden (L) schwächer exprimiert (Sommer et al. 2008). Die antiinflammatorischen Zytokine IL-6 (Sommer et al. 2008; Adams und Czuprynski 1994; Weiss et al. 2004) und den transformierenden Wachstumsfaktor beta (*transforming growth factor beta*, TGF $\beta$ ) wurden nach Zusatz von MAP oder seinen

Zellwandbestandteilen stärker exprimiert (Weiss et al. 2004; Adams und Czuprynski 1994).

Infolge der MAP-Infektion kommt es zu einer Aktivierung der adaptiven zellulären Immunantwort in den Lymphknoten, wo MAP bereits 48 h nach einer oralen Inokulation von Ziegen frei nachweisbar war (Sigurðardóttir et al. 2004). Wie es dorthin gelangt, ist unklar. Spekuliert wird die Aufnahme durch dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC). Bovine DC waren *in vitro* mit MAP infizierbar (Lei und Hostetter 2007). Im Gegensatz zu Makrophagen beeinträchtigte eine Infektion die Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche der DC nicht. Trotz einer unvollständigen Entwicklung und Lymphozytenaktivierung wird davon ausgegangen, dass eine Migration zu den Lymphknoten und eine Aktivierung der zellulären Immunantwort möglich waren (Lei und Hostetter 2007). Dafür spricht, dass das fibronektinbindende Protein des Erregers der verantwortliche Faktor für eine erhöhte MHC-Expression und eine verstärkte IL-12-vermittelte T-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen war (Noh et al. 2012; Lee et al. 2009).

#### **2.1.4.3 Aktivierung der zellulären Immunantwort im Gewebe**

Die in diesem Abschnitt erläuterten Studien zeigten zwar Unterschiede in der Immunreaktion zwischen Tieren mit pathohistologischen Veränderungen unterschiedlichen Typs und zwischen den Erkrankungsstadien, ihre Entstehung und die zugrunde liegenden Ursachen sind jedoch derzeit in ihren Zusammenhängen kaum verstanden. Die Reaktion der zellulären adaptiven Immunantwort auf eine MAP-Infektion im Gewebe war außerdem durch eine starke Variabilität zwischen Einzeltieren gekennzeichnet (Coussens et al. 2004; Sweeney et al. 1998; Alzuherri et al. 1996; Smeed et al. 2007).

Rückschlüsse auf die Abläufe der zellulären adaptiven Immunantwort im Gewebe und im Blut werden vor allem aus der Genexpression und Sekretion verschiedener Zytokine, aber auch aus der T-Zellzusammensetzung in den Geweben gezogen. Hinsichtlich der Verteilung der T-Zellen im Darmgewebe ließen sich tierartübergreifend keine MAP-abhängigen Unterschiede zwischen den einzelnen Darmwandschichten feststellen (Valheim et al. 2004; Navarro et al. 1998; Little et al. 1996; Koets et al. 2002). Die Verteilung innerhalb der *Lamina propria* differierte bei tuberkuloiden Läsionen zwischen *Villi* und Darmkrypten (Valheim et al. 2004). In den einzelnen Darmabschnitten infizierter Tiere wurde – verglichen mit dem Dünndarm - lediglich ein Anstieg von CD8-positiven (+) T-Zellen im Dickdarm gezeigt (Navarro et al. 1998). *Ileum* und *Jejunum* unterschieden sich beim Rind hinsichtlich der Zusammensetzung der T-Zellen nicht (Allen et al. 2009). Paratuberkulose-bedingte Gewebeläsionen subklinisch infizierter Ziegen wurden von CD4+ T-Zellen dominiert (Valheim et al. 2004). Bei klinisch erkrankten Schafen und Rindern verringerte sich die Anzahl CD4+ Zellen wieder, so dass davon ausgegangen wird, dass sich die Zellzusammensetzung mit dem Fortschreiten der Infektion ändert (Reddacliff et al 2004; Koets et al. 2002).

Die Läsionsform ist durch Unterschiede in der T-Zell-Zusammensetzung gekennzeichnet. Im Gegensatz zu gesunden Ziegen wiesen Tiere mit pauzibazillären Läsionen mehr CD4+ T-Zellen auf (Navarro et al. 1998). Ein höherer Anteil von CD8+ T-Zellen bei Tieren mit lepromatösen/multibazillären Läsionen - verglichen mit pauzibazillären/tuberkuloiden Veränderungen - wurde im Blut (Gillan et al. 2010), im Darm und in den Lymphknoten nachgewiesen (Navarro et al. 1998) und ging z. T. mit einem geringeren Anteil der CD4+-Zellen einher (Little et al. 1996). Gamma-delta-( $\gamma\delta$ )-T-Zellen unterschieden sich im Blut und Darmgewebe zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren in experimentellen Studien nicht (Wu et al. 2007; Begg und Griffin 2005, Reddacliff et al. 2004). Jedoch existieren Nachweise über einen steigenden Anteil dieser Zellpopulation innerhalb der *Lamina propria* mit dem Übergang zu fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (Reddacliff et al. 2004; Navarro et al. 1998; Koets et al. 2002). Infizierte Tiere zeigten in Lymphknoten und Darmgewebe mehr B-Zellen (Navarro et al. 1998, Gillan et al. 2010). Es wird vermutet dass diese Zellart eine Rolle bei der Immunantwort spielt (Begg et al. 2011), ihre genaue Funktion bei der Abwehr von MAP ist jedoch unbekannt.

Ob sich die Zellzusammensetzung bei infizierten Tieren im Blut, in den Lymphknoten und dem Darmgewebe gleicht, wie einige Autoren zeigten (Koets et al. 2002; Navarro et al. 1998), wird durch in anderen Studien nachgewiesene Unterschiede (z. B. durch unterschiedliche Anteile von CD8+ T-Zellen in Blut und Lymphknoten) in Frage gestellt (Reddacliff et al. 2004; Gillan et al. 2010).

Untersuchungen zur Genexpression verschiedener Zytokine im Gewebe ergaben bisher keine Unterschiede verschiedener Mediatoren wie IL-10 und TGF $\beta$  zwischen *Jejunum*, der ICK und dem *Ileum* (Allen et al. 2009; Munoz et al. 2009; Khalifeh und Stabel 2004). Im Vergleich der IL-10 Sekretion von Zellen aus Bug-, *Jejunal*- und *Ileocaecallymphknoten* von natürlich und experimentell infizierten Schafen nach einer Restimulation mit einem MAP-Ganzzellysate zeigten Zellen des Buglymphknotens die geringste Sekretion, woraus die Autoren schlossen, dass die IL-10-Reaktion hauptsächlich am Ort der Infektion stattfindet (de Silva et al. 2011).

Vergleicht man die Ergebnisse aus den Lymphknoten und dem Darmgewebe miteinander, so lässt sich kein Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort erkennen. Weder die Expression von antiinflammatorischem IL-10, und IL-4, noch die der proinflammatorisch wirkenden Botenstoffe IL-18 und TNF $\alpha$  unterschied sich in beiden Lokalisationen zwischen infizierten und gesunden Tieren (Coussens et al. 2004). Des Weiteren ist eine Übereinstimmung in der Richtung der Expressions- oder Sekretionsänderung einzelner Zytokine zwischen *Ileum* und den Lymphknoten umstritten. Beispielsweise zeigten infizierte Individuen im *Ileum* eine stärkere Expression von IFN- $\gamma$  und IL-16 im Vergleich zu Kontrollen, während sich die IFN- $\gamma$ -Expression in den Lymphknoten nicht zwischen den Tiergruppen unterschied und die Expression von IL-16 signifikant geringer war als in den Lymphknoten der Kontrollrinder (Coussens et al. 2004).

Unterschiede in der Zytokinexpression und Sekretion zwischen infizierten Tieren und gesunden Kontrollen werden häufig nachgewiesen (Alzuherri et al. 1996; Coussens et al. 2004; Khalifeh und Stabel 2004; Wu et al. 2007; Sweeney et al. 1998), die Ergebnisse der Studien widersprechen sich jedoch z. T. Während z. B. in einer dieser Studien bei infizierten Kälbern eine Expressionsverringerung von IL-4 auftrat (Wu et al. 2007), unterschied sich die Genexpression zwischen infizierten und nicht infizierten Rindern in anderen Untersuchungen nicht (Sweeney et al. 1998; Coussens et al. 2004). Auch für IL-10 differierten die Untersuchungsergebnisse (de Silva et al. 2011; Khalifeh und Stabel 2004). Auch Unterschiede zwischen den Erkrankungsstadien lassen sich nicht eindeutig nachweisen. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen exponierte, aber nicht infizierte Schafe eine höhere IL-10-Sekretion in den Lymphknoten, so dass eine vorherrschende antiinflammatorische Immunantwort vermutet wird (de Silva et al. 2011). Studien, die entzündungsfördernde Zytokine wie IFN- $\gamma$  bei subklinisch infizierten Tieren untersuchten, stellten nicht immer ein Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort fest (Sweeney et al. 1998; Coussens et al. 2004, Allen et al. 2009). Der Einfluss der MAP-Infektion auf die Immunantwort in dieser Erkrankungsphase bleibt daher unbekannt. Auch Vergleiche der Immunreaktion zwischen klinisch erkrankten und gesunden Tieren zeigten nur zum Teil, dass die Expression und Sekretion proinflammatorisch wirkender Mediatoren dominierten (Coussens et al. 2004; Alzuherri et al. 1996; Robinson et al. 2011; Khalifeh und Stabel 2004).

Die Läsionsart ist neben der Zellzusammensetzung auch durch Unterschiede in der Zytokinexpression geprägt. Tiere mit pauzibazillären und tuberkuloiden Läsionen wiesen überwiegend eine geringere antiinflammatorische Zytokinreaktion auf als Tiere mit multibazillären bzw. lepromatösen Veränderungen (Muñoz et al. 2009; Smeed et al. 2007; Tanaka et al. 2005). Dabei wurden IL-10, IL-4 und TGF $\beta$  betrachtet. Ob die IFN- $\gamma$ -Reaktion bei der pauzibazillären oder der multibazillären Läsionsform überwiegt, lässt sich aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse bei Schafen und Rindern nicht abschließend beurteilen (Gillan et al. 2010; Shu et al. 2011; Smeed et al. 2007). Schafe mit multibazillären Läsionen wiesen häufiger eine stärkere TNF $\alpha$ -Aktivität als solche mit pauzibazillären Läsionen auf (Alzuherri et al. 1996). Auch eine parallel steigende Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-10 bei zunehmender Schwere der Läsion wurde beschrieben (Shu et al. 2009). Welche Faktoren zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen führen, ist unbekannt.

#### **2.1.4.4 Untersuchung von Parametern der lokalen Immunreaktion im Blut und Rückschlüsse auf intestinale Reaktionsmechanismen**

Das in Abb. 2.1 illustrierte „klassische“ Modell zur Immunreaktion gegenüber MAP im Infektionsverlauf beruht auf der Annahme, dass nach einer Infektion zunächst eine zelluläre Immunantwort ausgebildet wird (Coussens et al. 2004). Diese ist in der Lage, die Infektion zu kontrollieren, so dass keine klinischen Symptome auftreten. Im Laufe der Erkrankung schwächt sich die zelluläre Reaktion jedoch wieder ab, eine humorale

Antwort bildet sich aus und überwiegt schließlich (Stabel 2000; Coussens 2001; Chiodini 1996). Möglicherweise führt ein kurzzeitiges freies Vorliegen des Erregers im Darm (z. B. durch das Absterben von Makrophagen) zu einer kontinuierlichen geringgradigen direkten Stimulation von B-Zellen zur Antikörperproduktion (Coussens 2001). Da Antikörper bei infizierten Tieren häufig in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien gefunden wurden (Whitlock und Buergelt 1996), wird ihre Rolle als nicht protektiv angesehen (Stabel 2000). Im weiteren Infektionsverlauf nehmen die Erregerausscheidung und die Ausprägung klinischer Symptome zu. Aufgrund eines absoluten Nährstoffmangels wird vor dem Tod eine Anergie postuliert (Bendixen 1978; Stabel 2000; Chiodini 1996). Erkenntnisse über die Abwehrreaktionen gegenüber anderen Mykobakterien als MAP sind in dieses Modell eingeflossen.

Die Forschungen zur Ausprägung der zellulären Immunantwort gegenüber MAP konzentrierten sich u. a. auf die Interaktion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren nach einer Infektion und mögliche Abhängigkeiten pathologischer und klinischer Erscheinungen von der Immunantwort. An einmalig entnommenen peripheren mononuklearen Zellen des Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) von infizierten und gesunden Rindern wurde die Expression proinflammatorisch wirkender Botenstoffe, die hauptsächlich von T-Helferzellen (Th-Zellen) des Typ I gebildet werden (Th1-Antwort, z. B. IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  oder IL-12p35) und die antiinflammatorisch wirkender Zytokine (Th2-Antwort, z. B. IL-4, TGF $\beta$  oder IL-10) betrachtet (Coussens et al. 2004). Bei subklinisch erkrankten Tieren wurde ein gemischtes Th1- und Th2-Profil festgestellt. Bei klinisch erkrankten Tieren überwog die Th2-Antwort. Ein im Verlauf der Infektion langsamer Übergang von einer Th1- zu einer Th2-Antwort wird vermutet. Im Vergleich zu Kontrollen waren bei klinisch erkrankten und subklinisch infizierten Individuen sowohl die IFN- $\gamma$ - als auch IL-10-Expression erhöht. Aufgrund seines Potentials für die Diagnostik der Paratuberkulose (Kap. 2.1.7.2.2) ist IFN- $\gamma$  im Hinblick auf die Immunreaktion das am besten im Blut untersuchte Zytokin. Es steht stellvertretend für die Ausprägung einer zellulären Th1-Antwort, während IL-10 als potentieller Gegenspieler der Th1-Reaktion (Kap. 2.1.4.2) ebenfalls im Fokus der Forschungen steht.

Experimentell und natürlich infizierte Tiere unterschiedlicher Arten zeigten eine stärkere Expression und Sekretion von IFN- $\gamma$  als nicht infizierte Individuen (Coussens und Colvin 2004; Storset et al. 2001; Buza et al. 2003; Steward et al. 2004; Shu et al. 2011). Diese traten bereits wenige Stunden nach einer Zellrestimulation auf (Coussens und Colvin 2004), waren aber auch unabhängig von einer Restimulation nachweisbar (Coussens et al. 2004).

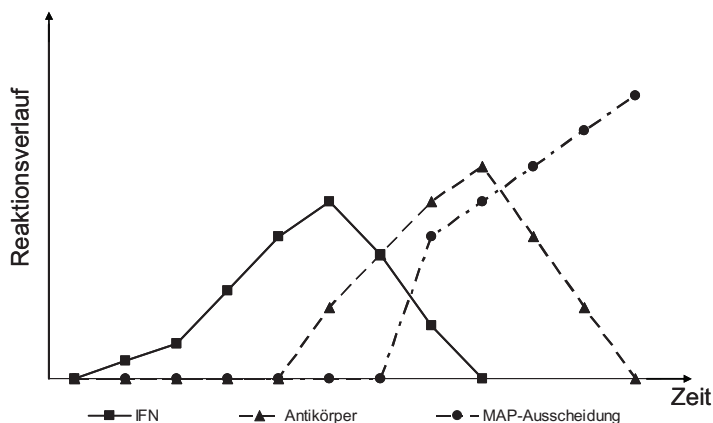


Abb. 2.1 Schematische Darstellung des postulierten „klassischen“ Modells zum Verlauf der zellulären, und humoralen Immunantwort sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot im Infektionsverlauf bei Paratuberkulose (modifiziert nach Begg et al., 2011).

Eine stärkere IFN- $\gamma$ -Reaktion gegenüber MAP-Typ-II-Stämmen als gegenüber Typ-I-Stämmen wurde bei Wildwiederkäuern nachgewiesen (O'Brien et al. 2006) und wird für Rind, Schaf und Ziege vermutet (Steward et al. 2004, 2006, 2007). Da adulte, experimentell inokulierte Schafe vermutlich aufgrund einer bereits erfolgten Auseinandersetzung mit anderen Mykobakterienspezies eine frühere IFN- $\gamma$ -Reaktion als Lämmer zeigten (Delgado et al. 2012), wird eine Altersabhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Reaktion diskutiert. Eine Abhängigkeit der Sekretion des Zytokins von der Inokulationsdosis wurde mehrfach nachgewiesen (Delgado et al. 2012; O'Brien et al. 2006), ist aber umstritten (Stabel und Robbe-Austerman 2011).

Die Stärke der IFN- $\gamma$ -Reaktion korrelierte mit der Ausprägung histologischer Läsionen (Begg et al. 2005, 2011; Gillan et al. 2010; Pérez et al. 1999) und damit mit dem Ausprägungsgrad der Erkrankung (Kap.2.1.4.1). Tiere mit pauszibazillären oder ausgeprägten lymphozytären Veränderungen exprimierten und sekretierten mehr oder häufiger IFN- $\gamma$  als Tiere mit multibazillären Läsionen oder infizierte aber histologisch negative Individuen (Gillan et al. 2010). Klinische Symptome traten bei Schafen seltener bei dieser Art von Veränderungen auf als bei Tieren mit starken, von Makrophagen und Epitheloidzellen dominierten Läsionen (Pérez et al. 1999). Es wird daher diskutiert, dass verschiedene immunologische Reaktionsmechanismen zur Ausprägung der unterschiedlichen Läsionsformen führen (Gwozdz et al. 2000a). Dass eine hohe IFN- $\gamma$ -Reaktion allein zu einer Protektion gegenüber klinischen Erscheinungen und pathologischen Veränderungen führt (Allen et al. 2009; Huda et al. 2004), wird angezweifelt (Robinson et al. 2008). Ob das Zytokin den Übergang zu fortgeschrittenen Erkrankungsstadien verhindert, ist ebenfalls unbekannt (Stabel und Robbe-Austerman 2011).

Der Übergang von der zellulären zur humoralen Immunantwort mit zunehmenden Alter wurde nachgewiesen (Huda et al. 2004; Gwozdz et al. 2000a). Der Zeitpunkt und die

Auslöser für diesen Übergang sind unbekannt und waren individuell verschieden (Coussens 2001, 2004). Aufgrund steigender IL-10-Konzentrationen bei gleichzeitig sinkender IFN- $\gamma$ -Menge im Versuchsverlauf in experimentellen Infektionsstudien wird vermutet, dass für das Absinken der zellulären Reaktion und das Einsetzen der Antikörperbildung eine erhöhte IL-10-Sekretion verantwortlich ist (Buza et al. 2004; Nagata et al. 2010; Stabel und Robbe-Austerman 2011; Steward et al. 2004). Der Nachweis, dass eine IL-10-Neutralisation dosisabhängig zu einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Sekretion in Zellkulturüberständen bei caprinen und bovinen PBMC führt (Lybeck et al. 2009; Buza et al. 2004), stützt diese These.

Hinsichtlich der Korrelation von IL-10 mit Art und Stärke der Läsionen besteht aufgrund gegensätzlicher oder statistisch nicht verifizierbarer Studienergebnisse weiterer Forschungsbedarf (Gillan et al. 2010; Shu et al. 2011; de Silva et al. 2011). Es existieren vereinzelt Hinweise, dass von Tieren mit starken Läsionen im Vergleich zu infizierten, aber histologisch unauffälligen Rindern mehr IL-10 sekretiert wird (Shu et al. 2011). IL-10 hemmt *in vitro* die Expression von TNF $\alpha$  in bovinen PBMC (Buza et al. 2003). Bei einmalig beprobten Schlachtrindern wurde kein Unterschied zwischen Kontrollen und infizierten Tieren hinsichtlich der TNF $\alpha$ -Expression festgestellt (Shu et al. 2011). Es wird angenommen, dass eine reduzierte Expression von TNF $\alpha$  und anderen Zytokinen zu Störungen bei der Bildung von Granulomen führen (Coussens et al. 2004; Buza et al. 2003).

Eine Korrelation zwischen Läsionsart und der Stärke der Antikörperreaktion wurde widerlegt (Shu et al. 2011).

Ein Absinken der zellulären und humoralen Reaktionen mit dem Fortschreiten der Erkrankung, die mit einer Anergie in Verbindung gebracht werden könnten, wurde mehrfach in Verlaufsstudien gezeigt (Steward et al. 2006, 2004; Munjal et al. 2007; Coussens 2001).

Die Vermutung, dass die aus Blut gewonnenen immunologischen Daten die lokale Immunreaktion im Darm und in den Lymphknoten reflektieren (de Silva et al. 2011; Burrells et al. 1998), wurde teilweise widerlegt (Begg et al. 2005; Burrells et al. 1998).

Die entscheidende Zellpopulation für die Ausprägung einer zellulären Immunantwort und damit einer möglichen Kontrolle der Infektion sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die in der subklinischen Erkrankungsphase stärker aktiviert werden und proliferieren als bei klinisch erkrankten Tieren (Koets et al. 2002; Gillan et al. 2010; Bassey und Collins 1997; Allen et al. 2009; Wu et al. 2007; Begg und Griffin 2005). Während IL-10 hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sekretiert wird (Nagata et al. 2010; Lybeck et al. 2009), gelten CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Hauptproduzent von IFN- $\gamma$  (Bassey und Collins 1997). Von unstimulierten PBMC infizierter Ziegen wurde das meiste IFN- $\gamma$  zwar von CD8<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ -T-Zellen produziert, nach einer Restimulation fand die stärkste Sekretion jedoch durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen statt. Die Proliferation von PBMC korreliert mit der IFN- $\gamma$ -Menge (Bassey und Collins 1997).



## 2.1.5 Pathologie

### 2.1.5.1 Rind

Makroskopische und histologische Veränderungen können in allen Darmbereichen auftreten, vorwiegend waren jedoch das *Ileum* und das *Jejunum* betroffen (Buergelt et al. 1978; Gonzáles et al. 2005; Chacon et al. 2004). Nach experimentellen Infektionen traten ausgedehnte Veränderungen auch im gesamten Darmbereich auf (Taylor 1953).

Als typische makroskopische Veränderungen wurden

- a) eine Verdickung, Ödematisierung und hirnwindungsartige Faltung der Darmschleimhaut der hinteren Dünndarmabschnitte und des Caecums (Valentin-Weigand 2015),
- b) vergrößerte Mesenterial- und Ileocaecallymphknoten sowie Peyer'sche Platten (Clarke 1997),
- c) die Verdickung der mesenterialen Lymphgefäße durch eine chronische Lymphangitis (Clarke 1997) und
- d) vereinzelt eine Arteriosklerose (Buergelt 1978)

beschrieben. Eine Streuung in Organe außerhalb des Darmbereiches wurde dokumentiert (Hines et al. 1987), wobei v. a. die Leber betroffen war (Buergelt et al. 1978; Chiodini 1984).

Die pathohistologischen Veränderungen sind typisch für eine granulomatöse Enteritis (Elze, 2009) und werden in drei Klassen eingeteilt (Tab. 2.2). Mit zunehmendem Erkrankungsstadium dehnen sich die Veränderungen auf tiefer liegende Darmschichten aus. Durch die massive Einwanderung von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe verstreichen die Darmkrypten, die Darmzotten atrophieren. Die Oberfläche zur Nährstoffaufnahme verkleinert sich (Buergelt et al. 1978; Gonzáles et al. 2005). Der Umfang und das Auftreten pathologischer Veränderungen korreliert nicht mit dem Auftreten klinischer Symptome (Brady et al 2008). Das Auftreten starker pathologischer Veränderungen und klinischer Symptome konnte mit einer diffusen Verteilung der Läsionen assoziiert werden (Gonzáles et al. 2005). Je nach Menge der nachgewiesenen Bakterien und der Ausbreitung der Veränderungen wird außerdem zwischen einer pauci- und einer multibazillären Form sowie zwischen fokalen und diffusen Läsionen unterschieden. Eine weitere Differenzierung richtet sich danach, ob eine Veränderung hinsichtlich der Zellzusammensetzung als von Makrophagen dominiert, lymphozytär oder intermediär bezeichnet werden konnte (Gonzáles et al. 2005).

### 2.1.5.2 Schaf

Die Einbeziehung verschiedener Darmabschnitte in das Entzündungsgeschehen und die makroskopischen Veränderungen beim Schaf ähneln denen des Rindes. Der Anteil an Tieren, bei denen eine typische Schleimhautfaltung auftritt, scheint geringer zu sein (Carrigan und Seaman 1990). Nach der Infektion mit pigmentierten Stämmen wurde über eine orangegelbe Verfärbung der Darmschleimhaut berichtet (Clarke und Little 1996; Stamp und Watt 1954). Die z. T beobachtete Verkäsung und Verkalkung der mesenterialen Lymphknoten stellt eine ovine Besonderheit dar (Shulaw et al. 1993). Die

histologischen Veränderungen lassen sich auch bei Schafen in Abhängigkeit von ihrer Ausprägung drei Formen zuordnen. Form 1 umfasst kleine, von Makrophagen dominierte Veränderungen ohne MAP, die ausschließlich in der *ilealen* PP auftraten, Form 2 beinhaltet auch Läsionen in der Mukosa um die PP herum, die z. T. MAP enthielten und bei Form 3 handelte es sich um Veränderungen mit unterschiedlicher Zellzusammensetzung und MAP-Anzahl, die auch unabhängig von den PP vorkommen. Die multibazilläre, lepromatöse Form ist durch eine diffuse Infiltration der *Lamina propria* und der *Submukosa* mit Makrophagen und Epitheloidzellen, aber wenigen Riesenzellen gekennzeichnet. Die lymphatischen Gewebe des Darmes und die Lymphknoten sind kaum betroffen. Die pauszibazilläre, tuberkuloide Form ist durch umschriebene, überwiegend lymphozytär infiltrierte Granulome in der *Mukosa*, den Peyer'schen Platten und den Lymphknoten gekennzeichnet, aus denen MAP selten isoliert wird.

### 2.1.5.3 Ziege

Bei Ziegen ist das makroskopische Bild sehr variabel. Wie beim Schaf sind eine Verdickung der Dünndarmwand und eine Vergrößerung der Lymphknoten mit teilweiser Verkäsung und Verkalkung entscheidende Kennzeichen für die Erkrankung. Schleimhautfaltungen wurden bei 38 % der Tiere beobachtet (Gezon et al. 1988). Milde histologische Veränderungen sind durch eine Infiltration der *Submukosa* durch Lymphozyten und Plasmazellen gekennzeichnet, während starke Veränderungen in der *Submukosa* und den Lymphknoten meist erregerhaltige Epitheloid- und Riesenzellen enthalten. Es wurde zum einen je nach Ausmaß der Infiltration und der betroffenen Organe ein milde, eine moderate und eine schwere Form der pathohistologischen Veränderungen beschrieben (Tafti und Rashidi 2000). Zum anderen lassen sich die Veränderungen anhand der betroffenen Darmschichten, der Läsionsausprägung sowie der Anzahl und Art der beteiligten Zellen ähnlich wie beim Rind einteilen (Corpa et al. 2000).

Tab. 2.2 Einteilung der pathohistologischen Veränderungen bei der Paratuberkulose nach dem Schweregrad (modifiziert nach Buergelt et al., 1978 und Brady et al., 2008).

Klasse	Darm	Lymphknoten/Lymphgefäße
<b>I</b>	<b>milde Veränderungen</b>	
<i>betroffener Bereich</i>	<i>Lamina propria</i> der Villi	Paracortikalzone
<i>Befunde</i>	einzelne Zellen	einzelne Zellen
<i>beteiligte Zellen</i>	Langerhanszellen	Langerhanszellen
<b>II</b>	<b>moderate Veränderungen</b>	
<i>betroffener Bereich</i>	<i>Lamina propria</i> der Vili, <i>Submucosa</i>	Subkapsulärer Sinus, Paracortikalzone
<i>Befunde</i>	Zellgruppen	Zellgruppen
<i>beteiligte Zellen</i>	Makrophagen, Langerhanszellen	Makrophagen, Langerhanszellen
<b>III</b>	<b>starke Veränderungen</b>	
<i>betroffener Bereich</i>	<i>Lamina propria, Submucosa,</i> Bindegewebsstroma von <i>Tunica muscularis</i> und Serosa, <i>Tela submucosa</i> um Peyer'sche Platten, verschiedene Darmsegmente	subkapsulärer Sinus, Paracortikalzone, afferente subseröse und submuköse Mesenterialgefäße
<i>Befunde</i>	Peyer'sche Platten von Entzündungszellen umgeben, nicht infiltriert zahlreich bis massenhaft Zellen	im Lymphknoten Lymphozyten durch Makrophagen ersetzt Zellansammlungen in Lymphgefäßen Hyperplasie der Lymphgefäße
<i>beteiligte Zellen</i>	Makrophagen, Riesenzellen, Epitheloidzellen	Makrophagen

## 2.1.6 Klinische Symptome

### 2.1.6.1 Rind

Die Paratuberkulose des Rindes ist durch Inkubationszeiten von zwei bis zehn Jahren gekennzeichnet (Whitlock und Buergelt 1996). Die Infektion wird in vier Stadien unterteilt (Tab. 2.3). Pro klinisch erkranktem Tier muss mit circa (ca.) 25 weiteren latent oder subklinisch infizierten Tieren gerechnet werden („Eisbergeffekt“, Whitlock und Buergelt 1996). Der Übergang zwischen den verschiedenen Erkrankungsstadien variiert in Abhängigkeit von der Einzeltierprävalenz, dem resultierenden Infektionsdruck, der Infektionsdosis, dem Alter des Tieres, der Häufigkeit einer Exposition, genetischen Faktoren, der Immunreaktion des Wirtes, der Erregervirulenz und unterschiedlichen Umweltfaktoren (Fecteau und Whitlock, 2011).

Tab. 2.3 Übersicht über die Erkrankungsstadien der Paratuberkulose beim Rind (modifiziert nach Whitlock und Buergelt, 1996).

Stadium	Klinische Symptome	MAP-Ausscheidung	Diagnostik
<b>Latente Infektion</b>	nein	nein	Gewebekultur Histologie
<b>Subklinische Erkrankung</b>	nein	intermittierend	Gewebekultur Histologie Antikörpernachweis Nachweis zellulärer Immunität bis 15 % der Tiere in der Kotkultur
<b>Klinische Erkrankung, frühes Stadium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zunehmende Abmagerung bei erhaltener Fresslust</li> <li>• stumpfes Haarkleid</li> <li>• blasse Schleimhäute</li> <li>• therapieresistente intermittierende bis permanente wässrige Durchfälle</li> <li>• reduzierte Milchleistung</li> <li>• Hypoproteinämie, Hypotriglyceridämie, Hypcholesterolämie</li> </ul>	stark	Gewebekultur Makroskopie und Histologie Antikörpernachweis Kotkultur PCR
<b>Klinische Erkrankung, Endstadium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• unstillbarer Durchfall mit unangenehmen Geruch, Gasblasen</li> <li>• zunehmende Dehydratation</li> <li>• absoluter Nährstoffmangel</li> <li>• Proteinmangelödeme (Kehlgang)</li> <li>• Kachexie</li> <li>• Niederbruch, Tod</li> </ul>	stark	Gewebekultur Makroskopie und Histologie Antikörpernachweis Kotkultur PCR

Erläuterungen: MAP = *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis*, PCR = polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

### **2.1.6.2 Kleine Wiederkäuer**

Im Unterschied zum Rind zeigten sich die ersten klinischen Symptome bei den kleinen Wiederkäuern z. T. bereits ein Jahr nach der Infektion (Stehman 1996). Das typische Symptom der Erkrankung ist bei Schafen und Ziegen ein progressiver Gewichtsverlust. Durchfall betraf nur 20,0 % der Fälle und stellt sich häufig intermittierend dar (Carrigan und Seaman 1990). Im späten Erkrankungsstadium wurden bei Ziegen auch Anorexie und Depression beschrieben (Gezon et al. 1988). Bei Schafen wurde von Wollbruch und schlechter Vliesqualität berichtet (Cranwell 1993), im fortgeschrittenen Krankheitsstadium traten eine Hypoproteinämie und eine Hypocalcämie auf (Jones und Kay 1996).

### **2.1.7 Diagnostik**

Eine ideale diagnostische Methode würde das Auffinden aller mit einem bestimmten Erreger infizierten Tiere ermöglichen (Sensitivität, Se = 100 %), ohne dass gesunde Tiere fälschlicherweise als betroffen eingestuft werden (Spezifität, Sp = 100 %, Milner et al. 1990). Tests zur Paratuberkulosedagnostik müssen aufgrund der speziellen Pathogenese weitere Bedingungen erfüllen. Infizierte Tiere sollten unabhängig vom Erkrankungsstadium sicher erkannt werden, was durch die jeweils erst spät im Erkrankungsverlauf einsetzende und z. T. intermittierend erfolgende Antikörperbildung und Erregerausscheidung erschwert wird. Ein Erreger- oder Antikörpernachweis im latenten und subklinischen Erkrankungsstadium ist schwierig und begrenzt die Se der entsprechenden Methode. Es existiert daher keine Referenzmethode zur Evaluierung neuer diagnostischer Methoden für die Frühdiagnostik der Paratuberkulose (Nielsen und Toft, 2008). Für routinemäßige Bekämpfungsprogramme wären eine kostengünstige und einfache Testdurchführung und ein hoher Probendurchsatz pro Untersuchung wünschenswert (Milner et al. 1990). Testergebnisse sollten möglichst schnell verfügbar sein, um das Infektionsrisiko für andere Herdenmitglieder durch infektiöse Tiere zu reduzieren. Derzeit erfüllt keine der eingesetzten Methoden diese Anforderungen (Tab. 2.4), was zu Problemen bei der Erforschung der Epidemiologie und Bekämpfung der Erkrankung führt und Folgen für den Verbraucher hat.

#### **2.1.7.1 Direkter MAP-Nachweis**

##### **2.1.7.1.1 Mikroskopischer Nachweis von MAP in gefärbten Gewebeabklatschpräparaten und Kotasstrichen**

Aufgrund seiner Säurefestigkeit lässt sich MAP mit einer Färbung nach Ziehl-Neelsen (Ziehl 1882; Neelsen 1885) oder mit der Acridinorange-Färbung unter dem Mikroskop darstellen (Merkal 1973; Smithwick et al. 1995). Beide schnell und einfach durchzuführenden Färbungen werden für den Nachweis in Kotasstrichen klinisch erkrankter Tiere und für den *post-mortem* Nachweis in Gewebeabklatschpräparaten genutzt. Allerdings können sie nicht zwischen MAP und anderen säurefesten Stäbchen

differenzieren und besitzen daher eine unzureichende Sp (Merkal 1968; Benazzi et al. 1996; Mercier et al. 2009; Weber et al. 2009; Rawther et al. 2011; Huntley et al. 2005).

Auch die Se ist aufgrund einer zu geringen Erregerdichte (insbesondere in Proben subklinisch infizierter Tiere) im Vergleich zu anderen diagnostischen Methoden gering (Zimmer et al. 1999; Weber et al. 2009; Rawther et al. 2011).

Tab. 2.4 Anforderungen an einen idealen Test für die Paratuberkulose und deren Erfüllung durch die derzeit verfügbaren diagnostischen Verfahren

Anforderung	Nachweismethode				
	direkt			indirekt	
	Mikroskopie und Färbung	Kultur	PCR	Antikörper-ELISA	IFN- $\gamma$ -Assay
Se = 100 %	–	–	–	–	–
Sp = 100 %	–	X		–	–
Frühdiagnostik	–	–	–	–	X
schnell	X	–	X	X	X
kostengünstig	X	–	–	X	X

Erläuterungen: Se = Sensitivität, Sp = Spezifität, PCR = polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) hier von MAP aus Kot und Gewebe, ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay, IFN- $\gamma$  = Interferon gamma

#### 2.1.7.1.2 Kulturelle Anzucht von MAP aus Kot und Gewebe

Die Anzucht von MAP aus Gewebe, Kot oder Milch kann sowohl in eidotter-, vollei- und mykobaktinhaltigen Flüssig- als auch auf entsprechenden Festmedien erfolgen (Merkal und Curran 1974; Collins et al. 1990; Jørgensen 1982). Durch die lange Generationszeit des Bakteriums von 1,3 bis 4,4 Tagen (Lambrecht et al. 1988) treten sichtbare Kulturen frühestens nach vier Wochen auf (Hermann 1998). Die notwendige Kultivierungsdauer ist positiv mit der Ausscheidungsmenge, dem Alter und dem Erkrankungsstadium des Tieres korreliert (Gierke 2009; Collins et al. 1990; Kalis et al. 1999), weswegen aus Studien, in denen Rinderisolate untersucht wurden, die Empfehlung einer Kultivierungszeit von 16 Wochen resultierte, um auch schwächere Ausscheider zu finden (Whitlock und Rosenberger 1990; Kalis et al. 1999). Sowohl mit Flüssig- als auch mit Festmedien wurden Keimzahlen ab 100 KbE/g Kot nachgewiesen (Merkal 1973; Collins et al. 1990; Jørgensen 1982). Eine Kultivierung von Schafisolaten auf Festmedien ist schwieriger, die Kultivierungsdauer kann mehr als ein Jahr betragen (Whittington et al. 1998; Köhler, persönliche Mitteilung). In der Flüssigkultur war die Wachstumszeit mit maximal acht Wochen bis zur Detektion positiver Ergebnisse deutlich geringer (Whittington et al. 1998).

Die Überwucherung der Nährmedien mit Bakterien und Pilzen – begünstigt durch die lange Kultivierungsdauer - ist ein Hauptproblem (Kim et al. 1989). Daher werden zunächst grobe Kot- und Gewebeteile durch Sedimentationsschritte entfernt und der Erreger durch Zentrifugation angereichert (Eamens et al. 2000; Stabel 1997). Zwischen

Sedimentation und Zentrifugation findet in der Regel eine Dekontamination des Probenmaterials statt. Die Abtötung der Begleitflora wird je nach verwendeter Methode im Anschluss an die MAP-Anreicherung noch einmal wiederholt (Stabel 1997). Dieser Schritt beeinträchtigt in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration von MAP das Keimwachstum in der Probe unterschiedlich stark (Collins 1996; Johansen et al. 2006). Zur Subspeziesdifferenzierung werden die Prüfung der Mykobaktinabhängigkeit und der Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet. Die Kombination der Kultur mit der PCR erhöht die Sicherheit des MAP-Nachweises (Eamens et al. 2007; Cousins et al. 1995). Je mehr Kot und je mehr Kulturröhrchen verwendet wurden, desto wahrscheinlicher wird ein MAP-Nachweis (Stabel 1997; Gierke 2009). Die Hygiene bei der Probenentnahme, die Transport- und Lagerungsbedingungen spielen ebenso eine Rolle für die Nachweishäufigkeit (Whitlock und Rosenberger 1990) wie die Art und Durchführung der Dekontamination und Anreicherung sowie die Rezepturen der eingesetzten Medien (Merkal 1984; Johansen et al. 2006; Gierke 2009; Eamens et al. 2000; Cousins et al. 1995; Jorgensen 1982).

Die Se der Kotkultur auf Festmedien relativ zur Gewebekultur oder der histologischen Untersuchung betrug für das Rind zwischen 25 % und 83 % (Sockett et al. 1992; Huda und Jensen 2003; Whitlock et al. 2000). Die ohne Vergleichsmethode geschätzte Se der Kotkultur lag für Ziegen bei 8 % und für Schafe bei 16 % (Kostoulas et al. 2006). Die Flüssigkultur besaß eine höhere Se, die Inkubationsdauer war kürzer (Whittington et al. 1998; Sockett et al. 1992; Eamens et al. 2000; Cousins et al. 1995; Collins et al. 1990). Kontaminationen wurden jedoch häufiger beobachtet (Collins et al. 1990); ohne eine anschließende Speziesverifizierung traten falsch-positive Reaktionen auf (Shin et al. 2009). Um die Se der Kotkultur zu verbessern sollten möglichst viele Tiere aus vielen, regional verschiedenen Herden untersucht werden (Nielsen und Toft 2008; Pitt et al. 2002). Eine hohe Einzeltierprävalenz und ein hoher Anteil klinisch erkrankter Tiere im Bestand führen ebenfalls zu einer höheren Se der Kotkultur (Nielsen und Toft 2008; Donat et al. 2011; Sockett et al. 1992). Die Wahrscheinlichkeit, ein infiziertes Tier zu identifizieren, erhöht sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung, der Häufigkeit der Untersuchungen und mit steigender Erregermenge im Kot (Sockett et al. 1992; Kalis et al. 1999; Gierke 2009). Wiesen kleine Wiederkäuer multibazilläre Läsionen auf, war ihr Kotbefund ebenfalls häufiger positiv (Whittington et al. 2000).

Als kostengünstige Alternativen zur Feststellung des Paratuberkulosestatus einer Herde mittels Untersuchung von Einzeltierkotproben werden die Untersuchung gepoolter Kotproben und Analysen von Umgebungskotproben aus stark frequentierten Stallbereichen angesehen (Whittington et al. 2000; Eamens et al. 2007; Lombard et al. 2006). Im Vergleich zur Einzelkotprobenuntersuchung beim Rind beträgt die Herden-Sensitivität 46 % - 48 % für Kotpools (van Schaik et al. 2007) und ca. 70 % für Umgebungskotproben (Donat et al. 2011; Lombard et al. 2006; Berghaus et al. 2006).

Die Sp der Kotkultur liegt je nach Referenzmethode und Studiendesign beim Rind zwischen 53 % und 100 % (Collins 1996; Sockett et al. 1992), in Ziegen- und

Schafherden bei 89 % bzw. 97 % (Kostoulas et al 2006). Die analytische Sp beträgt 100 %, weswegen die Kotkultur derzeit als beste Methode zur *ante mortem* Einzeltierdiagnostik gilt (Gierke 2009) und im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen zum Einsatz kommt (Whitlock 2010).

Die Se der Gewebekultur entspricht in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien der der histologischen Gewebeuntersuchung. Bei Rindern ohne makroskopische Gewebeeränderungen ist sie dieser überlegen und eignet sich am besten für Prävalenzuntersuchungen an Schlachttieren (Elze 2009; Huda und Jensen 2003). Die Se der Kultur ist umso größer, je mehr Proben aus dem Magen-Darmtrakt und den zugehörigen Lymphknoten untersucht werden (Huda und Jensen 2003). Es sollten vor allem das *Ileum*, die *Mesenterial*- und *Ileocaecallymphknoten* beprobt werden (Elze 2009).

#### **2.1.7.1.3 Molekularbiologischer Nachweis von MAP aus Kotproben**

Der molekularbiologische Erregernachweis erfolgt mit der PCR. Zunächst wird die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid* DNA) aus der Bakterienzelle isoliert. Anschließend werden bestimmte spezies- und subspeziespezifische Genomabschnitte vervielfältigt und z. B. mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Zum Nachweis von MAP werden Primer für die Genomabschnitte *IS900*, *f57*, *Locus 255*, *ISMap02* und *ISMav2* einzeln oder kombiniert genutzt (Vary et al. 1990; Poupart et al. 1993; Strommenger et al. 2001; Bannantine 2002; Stabel und Bannantine 2005; Schönenbrücher et al. 2008). Da *IS900*-ähnliche Sequenzen auch bei anderen Mykobakterienspezies vorkommen (Cousins et al. 1999; Englund et al. 2002), muss die Primerauswahl sorgfältig erfolgen, um eine ausreichende Sp zu erzielen (Möbius et al. 2008). Nach wie vor gilt die *IS900* als spezifischste Genomregion für den MAP-Nachweis, während die Primer für die *ISMav2* unspezifische Beiprodukte produzieren. Auch *f57* und *Locus 255* gelten als spezifisch (Möbius et al. 2008). Daneben kommen nested-PCR-Systeme zum Einsatz, bei denen ein entstandenes PCR-Produkt weiter mit Primern amplifiziert wird, deren Sequenz innerhalb derer liegt, die im ersten Schritt verwendet wurden (Stabel und Bannantine 2005; Bögli-Stuber et al. 2005). Der Vorteil liegt in einer höheren Se des Systems (Collins et al. 1993; Douarre et al. 2010; Erume et al. 2001). Durch das mehrfache Probenhandling ist diese PCR-Form anfällig für Kontaminationen und damit für falsch-positive Reaktionen (Douarre et al. 2010; Möbius et al. 2008; Collins et al. 1993), so dass sie in Deutschland nicht für die Routinediagnostik empfohlen wird (Köhler, persönliche Mitteilung).

Beim MAP-Nachweis mit real-time PCR-Systemen wird die Zunahme des PCR-Produkts nach jedem Amplifikationszyklus gemessen (Bögli-Stuber et al. 2005; Alinovi et al. 2008). Wird ein bestimmter Schwellenwert überschritten, gilt die Probe als positiv. Je eher dies erfolgt, desto mehr DNA befand sich in der Ausgangsprobe. Die sofortige Verfügbarkeit quantitativer Ergebnisse stellt neben der Schnelligkeit und Automatisierbarkeit einen wesentlichen Vorteil gegenüber der konventionellen und der



*nested* PCR dar, wo das entstandene Produkt im Anschluss an seine Vervielfältigung sichtbar gemacht werden muss (Christopher-Hennings et al. 2003). Darüber hinaus kann in der real-time PCR eine größere Probenanzahl bearbeitet werden. Anhand von produktspezifischen Schmelzkurven sind falsch-positive Ergebnisse erkennbar (Stabel und Bannantine 2005; Christopher-Hennings et al. 2003). Da die Proben nur einmal gehandelt werden, gilt diese Form der PCR als weniger kontaminationsanfällig (Christopher-Hennings et al. 2003). Ein Nachteil sind die hohen Anschaffungskosten für die notwendigen Geräte (Christopher-Hennings et al. 2003).

PCR-Systeme zum MAP-Nachweis sind kommerziell erhältlich. Die Testeigenschaften von kommerziellen und *in-house* Systemen unterschieden sich aufgrund verschiedener Reagenzien und Cyclerprotokolle (Stabel et al. 2004; Schönenbrücher et al. 2008) sowie der Methode zur Detektion des Produktes (Cousins et al. 1995; Challans et al. 1994; Taddei et al. 2004). Die DNA-Extraktionsmethode erwies sich als entscheidend für die Effektivität der PCR (Christopher-Hennings 2003). MAP ist aufgrund seiner Zellwandstruktur gegenüber der Lyse mit enzymatischen oder thermischen Methoden sehr widerstandsfähig (Stephan 2007), so dass häufig zusätzlich mechanische Verfahren angewendet werden (Zhang und Zhang 2011).

Die Matrix Kot enthält verschiedene PCR-Inhibitoren (Inglis und Kalischuk 2003; Thornton und Passen 2004). Deshalb wird (z. B. durch die Bindung des Erregers an mit Antikörpern überzogene magnetische Kügelchen) versucht, den Erreger herauszulösen und so die Übertragung von PCR-Hemmstoffen zu vermeiden (Chiu et al. 2010).

In künstlich mit MAP kontaminierten Kotproben betrug die untere Nachweisgrenze zwischen  $< 10$  KbE/ 0,2 g Kot (Khare et al. 2004) und  $2 \times 10^4$ / g Kot (Chui et al. 2010). In Kotproben natürlich infizierter Rinder war sie aufgrund der ungleichmäßigeren Verteilung des Bakteriums (Bögli Stuber et al. 2005; Clark et al. 2008) mit 50 KbE/g (Collins et al. 1993) bzw. 100 KbE/ml Kot deutlich höher (Vary et al. 1990).

Die analytische Sp der PCR betrug stets 100 % (Moss et al. 1990; Poupart et al. 1990; Schönenbrücher et al. 2003). Im Vergleich zur Kotkultur variierten ihre Sp und Se zwischen 83 % und 100 % bzw. zwischen 3 % und 100 % (Stabel et al. 2004; Van der Gießen et al. 1992; Christopher-Hennings et al. 2003), im Vergleich zur Kultur aus Gewebe war die Se mit 57 % bis 82 % deutlich geringer (Erume et al. 2001). Auch die statistisch geschätzte Se schwankte stark (29 % - 100 %, Khare et al. 2004; Alinovi et al. 2008; Wells et al. 2006). Es wurde lediglich eine schwache bis moderate Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen PCR und Kotkultur festgestellt (Pinedo et al. 2008, Bögli-Stuber et al. 2005).

Die PCR wird durch dieselben populations- und einzeltierbedingten Faktoren wie die Kotkultur beeinflusst. Sie wird außerdem zum Nachweis von MAP aus Milchproben angewandt.

### 2.1.7.2 Indirekte Nachweisverfahren

Der indirekte Nachweis einer Paratuberkuloseinfektion kann zum einen mit serologischen Verfahren erfolgen. Aufgrund unzureichender Se im Vergleich zum Enzym- und Antikörpervermittelten Test (*Enzyme-linked immunosorbent assay* ELISA, Ikonomopoulos et al. 2007; Ferreira et al. 2002) und zu direkten diagnostischen Verfahren (Sockett et al. 1992; Sherman et al. 1990; Rankin 1961b; Robbe-Austerman et al. 2006a; Mercier et al. 2009; Whittington et al. 2003) werden die Agargelimmundiffusion, die passive Hämagglutination und die Komplementbindungsreaktion in Deutschland nicht mehr angewendet. Zum anderen wird die zelluläre Immunantwort gegen MAP für die Diagnostik genutzt.

#### 2.1.7.2.1 Antikörperbestimmung in Blutserum mittels ELISA

Bei den für die Bestimmung der Antikörper gegen Paratuberkulose verwendeten ELISAs handelt es sich um Sandwich-Tests. Die Testsysteme sind zum Teil kommerziell erhältlich und unterscheiden sich hauptsächlich durch die Beschichtungsantigene. Es werden u. a. biologisch heterogene protoplasmatische Antigene aus MAP-Stämmen und dem *M. avium*- Stamm 18 verwendet (Yokomizo et al. 1991; Munjal et al. 2007; Cox et al. 1991; Yokomizo et al. 1983; Sudgen et al. 1997; Sergeant et al. 2003; Sockett et al. 1992; Molina et al. 1991; Milner et al. 1990). Zur Verbesserung der Se und Sp der Tests werden sie z. T. weiter aufgereinigt (Abbas 1983; Eamens et al. 2000, Rajukumar et al. 2001; Cox et al. 1991). Ihre Se ist relativ gering und schwankt außerdem stark (Rind 9 % - 96 %, Ziege 16 % - 88 %, Schaf 22 % - 44 %), während die Sp mit 83 % bis 100 % hoch ist (McKenna et al. 2005; Dargatz et al. 2001; Yokomizo et al. 1991; Molina et al. 1991; Singh et al. 2009; Gumber et al. 2006; Singh et al. 2009; Sergeant et al. 2003). Ein Vergleich protoplasmatischer Antigene ist schwierig, da ihre genaue Zusammensetzung in kommerziell erhältlichen Testkits kaum bekannt ist (Nielsen und Toft 2008). ELISA-Tests unter Verwendung von LAM als Antigen (Gasteiner et al. 2000; Munjal et al. 2007; Jark et al. 1997) weisen im Vergleich zu Kot- und Gewebekultur sowie verglichen mit kommerziellen protoplasmatischen ELISAs stets eine geringere Se und Sp auf (McNab et al. 1991b; Köhler et al. 2008, Gierke 2009; McKenna et al. 2005).

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Mykobakterienspezies reduzierten sich durch die Vorabsorption der zu untersuchenden Seren mit einem *M. phlei*-Extrakt (Yokomizo et al. 1985). Durch diesen Schritt sank jeweils die Se des Tests, seine Sp erhöhte sich jedoch (Singh et al. 2009, Bech-Nielsen et al. 1992). Trotzdem waren Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Corynebakterien möglich (Manning et al. 2007).

Die Testeigenschaften werden durch die gleichen populations- und einzeltierbedingten Faktoren beeinflusst wie die Kotkultur (Sergeant et al. 2003; Mercier et al. 2009; Whitlock et al. 2000; Dargatz et al. 2001; Molina et al. 1991). Entscheidend ist die Festlegung des Schwellenwertes (Köhler et al. 2008). Außerdem hängen Se und Sp von

der Testcharge und dem Durchführungsprotokoll ab (Dargatz et al. 2004; Alinovi et al. 2009; Dargatz et al. 2001, Cox et al. 1991). Neben der geringen Se trug auch die hohe Variabilität der Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen verschiedenen Tests dazu bei (Gierke 2009; McKenna et al. 2006), dass der Einsatz von ELISAs als alleiniges Diagnostikum hauptsächlich für Herdenscreenings, nicht jedoch für die Einzeltieruntersuchung empfohlen wird (McKenna et al. 2006; Gierke 2009; Kumar et al. 2008; Dargatz et al. 2001; Molina et al. 1991; Khol et al. 2011; Salgado et al. 2007). Der Einsatz in Bekämpfungsprogrammen ist umstritten (Gumber et al. 2006; Sweeney et al. 2007; Bech-Nielsen et al. 1992; Klausen et al. 2003).

ELISA-Systeme werden auch zur Antikörperdetektion in Milchserum verwendet (Kumar et al. 2008, Lombard et al. 2006, Hendrick et al. 2005, Salgado et al. 2007).

Die Verbesserung der ELISA-Eigenschaften durch den Einsatz verschiedener rekombinanter MAP-Proteine erscheint vielversprechend (Gumber et al. 2009a; Vannuffel et al. 1994). Eine Se und Sp von jeweils 100% wurde für ein Protein in einer Studie an zwölf infizierten und vier gesunden Rindern nachgewiesen (Bannantine et al. 2011). In einer weiteren Studie war ein Test mit zwei Antigenen einem kommerziellen Testsystem gleichwertig (Leroy et al. 2009).

#### **2.1.7.2.2 Nachweis der zellulären Immunantwort**

##### **2.1.7.2.2.1 Hauttest und indirekter Nachweis der zellulären Immunantwort mittels intravenöser Gabe von jPPD**

Beim Hauttest am Hals des Tieres wird eine definierte Menge eines möglichst spezifischen Antigens intrakutan injiziert. Vor der Applikation sowie 24 h bis 72 h nach der Injektion wird die Hautdicke gemessen und ihre Zunahme beurteilt. Überschreitet die Zunahme der Hautdicke einen jeweils definierten Schwellenwert zwischen 2 Millimeter (mm) und 5 mm, ist die Reaktion positiv (Stephan 2007, Benedictus 1984; de Lisle et al. 1980; Kalis et al. 2003; Collins 1996). Hatte der Organismus vor der Injektion Kontakt zu diesem Antigen, kommt es durch Einwanderung von Immunzellen in die Injektionsstelle zu einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ und damit zur Hautschwellung (Merkal 1973). Als Antigene zur Paratuberkulosedagnostik werden „*purified protein derivatives*“ (PPD) von *M. avium* (aviäres PPD, aPPD) oder MAP (Johnin, jPPD) eingesetzt (Stephan, 2007; Kalis et al. 2003; Kumar 2006). Dabei handelt es sich jeweils um ein aufgereinigtes Gemisch aus Stoffen, die in einer Flüssigkultur von den Bakterien an ihre Umgebung abgegeben werden. Es ist in seiner Zusammensetzung und der Wirkung der Einzelkomponenten nicht charakterisiert (Goiffre et al. 2012), was eine standardisierte Herstellung unmöglich macht und zu Wirkungsunterschieden der einzelnen Chargen führt (Kalis et al. 2003). Aufgrund der engen Verwandtschaft der Mykobakterienspezies führen bovines PPD, aPPD und jPPD zu Kreuzreaktionen untereinander (Körmeny 1988). JPPD war bezüglich MAP am spezifischsten und erkannte etwa 20 % mehr infizierte Tiere als aPPD (Körmeny 1988;

Kumar 2006). Aufgrund der geringen Sp (46 % und 100 %) und Se (47 % bis 73 %) wird der Test nicht empfohlen (Larsen et al. 1963; Pérez et al. 1999; Klawonn et al. 2002; Collins 1996). Er erfasste aber infizierte Tiere bis zu 2,5 Jahre früher als die Kotkultur und der Antikörper-ELISA (Klawonn et al. 2002).

In älteren Untersuchungen wurde jPPD auch intravenös verabreicht. Nachgewiesen wird die zelluläre Reaktion des Immunsystems infizierter Tiere indirekt durch eine Erhöhung der inneren Körpertemperatur um mindestens 0,8°C und direkt anhand einer Leukozytose durch den Anstieg von neutrophilen Granulozyten bei gleichzeitiger Lymphopenie im Blutbild innerhalb von 6 h nach der Injektion (Benedictus und Bosma, 1985; Kopecky et al., 1971). Die Se der Methode liegt zwischen 22 % und 54 % bei subklinisch erkrankten und bei 84 % bei klinisch erkrankten Rindern (Benedictus und Bosma, 1985; Larsen und Kopecky 1965). Dieser Test wird in Deutschland nicht zur Diagnostik verwendet.

#### 2.1.7.2.2.2 Modifizierter IFN- $\gamma$ -Assay

Die Entstehung der verzögerten Entzündungsreaktion im Hauttest wird u. a. durch IFN- $\gamma$  ausgelöst (Kap. 2.1.4.1). Dieses wird auch nach einem *in-vitro* Zusatz von PPDs zu Vollblut (Kalis et al. 2003) oder isolierten PBMC gebildet (Stabel 1996; Stabel et al. 2003). Die PBMC umfassen Monozyten sowie B- und T-Lymphozyten. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration kann anschließend im Serum bzw. Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt werden. Evaluierete IFN- $\gamma$ -Assays sind kaum vergleichbar (Nielsen und Toft 2008) da

- a) Neben PPDs auch Ganzzelllysate, hitzeinaktivierte und lebende MAP als Restimulantien eingesetzt wurden (Stabel 1996),
- b) es zu Wirkungsunterschieden verschiedener PPD-Chargen und
- c) unspezifischen Kreuzreaktionen gegenüber anderen PPDs als jPPD kam (Jungersen et al. 2002; Mc Donald et al. 1999),
- d) sowohl aPPD, bPPD als auch jPPD in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden (Huda et al. 2003; Jungersen et al. 2002; Kalis et al. 2003),
- e) die Testinterpretation nur z. T. unter Einbeziehung der Restimulationsergebnisse von aPPD oder bovinem PPD zur Beurteilung der MAP-Spezifität der IFN- $\gamma$ -Reaktion erfolgte (Wood et al. 1989; Kalis et al. 2003; Jungersen et al. 2002; Huda et al. 2003),
- f) zwar häufig eine Negativ-, jedoch selten eine unspezifische Positivkontrolle mitgeführt wurde, die eine Beurteilung der Reaktionsfähigkeit der Zellen und damit der Testgültigkeit erlaubte (Robbe-Austerman et al. 2006b),

- g) diese unspezifischen Positivkontrollen eine unterschiedliche Eignung besitzen (Robbe-Austerman et al. 2006b; Bosward et al. 2010; Jungersen et al. 2002),
- h) unterschiedliche Lagerungs- und Transportbedingungen sowie die Zusammensetzung des sie umgebenden Mediums die IFN- $\gamma$ -Bildung der Zellen beeinflusste (Robbe-Austerman et al. 2006b, Jungersen et al. 2002, 2005),
- i) die Anzahl, die Konzentration und die Zusammensetzung der Blutzellen die Ausbeute des Botenstoffs beeinflusst (Bosward et al. 2010),
- j) Studien sowohl ein kommerziell erhältliches Testkit zur Tuberkulosedagnostik (z. B. Huda et al. 2004) als auch *in-house*-Tests verwendeten (z. B. Paolicchii et al. 2003).

Das Fehlen eines zuverlässigen Referenztests für die latente und subklinische Erkrankungsphase ist das Hauptproblem bei der Beurteilung der Leistungsfähigkeit des Assays (Nielsen und Toft 2008; Vizard et al. 1992). Im IFN- $\gamma$ -Test positive Tiere, die jedoch ein negatives Ergebnis in einer gewählten Vergleichsmethode aufweisen, können nicht bezüglich eines richtig- oder falsch-positiven Befundes unterschieden werden. Weiterhin ist eine unspezifische Reaktion der Tiere durch die Exposition mit anderen Mykobakterien ohne Referenzmethode nicht auszuschliessen.

PPDs waren lysierten Erregern sowie toten und lebenden MAP als Restimulationsantigen sowohl beim Rind als auch beim kleinen Wiederkäuer überlegen (Robbe-Austerman et al. 2006b, 2006c; Munjal et al. 2007). Sie gelten derzeit als spezifischste MAP-Antigene. Während nach einer Restimulation mit dem eigentlich spezifischeren jPPD aus MAP eine höhere IFN- $\gamma$ -Reaktion als mit aPPD nachgewiesen wurde (Robbe-Austerman et al. 2006b), war in einer anderen Untersuchung das Gegenteil der Fall (Jungersen et al. 2002). Dieser Widerspruch beruht auf der engen genetischen Verwandtschaft der Mykobakterien und auf Unterschieden im Gehalt an Antigenen, die allen Mykobakterien gemeinsam sind. Je nach PPD-Charge kann er unterschiedlich sein. Bei der Beurteilung der Sp der zellulären Immunreaktion gegenüber MAP führt dies zu falsch-negativen Ergebnissen, wenn die Zytokinsekretion jPPD restimulierter Zellen in experimentellen Studien mit der aPPD restimulierter Proben verglichen wird. Im Feld muss auch von einer Probenkontamination mit *M. avium* ausgegangen werden.

Als unspezifische Validitätskontrolle wird u. a. Concanavalin A (ConA) verwendet. Dieses Lektin aus Hülsenfrüchten vernetzt bestimmte Oberflächenstrukturen auf T-Zellen miteinander. Dadurch werden - wie nach einer Antigenstimulation - direkt eine ähnliche Signaltransduktionskaskade und eine spezifische Zytokinproduktion ausgelöst (Heegaard und Müller 1988). Die Zellen werden u. a. durch IFN- $\gamma$  zur Zellteilung angeregt. Es muss beachtet werden, dass die Wirkung des Lektins in Vollblut eingeschränkt war, was im Routineeinsatz dazu geführt hätte, dass ein gültiger Test als

ungültig eingestuft worden wäre (Yachnin et al. 1972; Robbe-Austerman et al 2006; Bosward et al. 2010). Weiterhin wird das Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) verwendet. Durch eine Bindung an MHC-II-Moleküle und den T-Zell-Rezeptor außerhalb der eigentlichen Antigenbindungsstelle (Dellabona et al. 1990; Kappler et al. 1989) werden T-Lymphozyten und Makrophagen bzw. Monozyten miteinander vernetzt. Dies führt indirekt zu einer Aktivierung und Zytokinsekretion der Zelle (Herrmann et al. 1992; Miethke et al. 1991). Die IFN- $\gamma$ -Sekretion gegenüber SEB von Zellen im Vollblut natürlich infizierter Rinder sank über einen Restimulationszeitraum von 72 h zwar kontinuierlich, sie bildeten jedoch stets mehr IFN- $\gamma$  als Zellen die mit jPPD restimuliert worden waren (Robbe-Austerman et al. 2006b). Würde ein solcher Test zu einem relativ späten Zeitpunkt beurteilt, zu dem die Zellen nicht mehr in der Lage wären auf jPPD zu reagieren, führte dies im Zweifelsfall dazu, dass ein ungültiger Test als gültig beurteilt werden würde (Robbe-Austerman et al. 2006b). Trotz dieser Einschränkung wird SEB als geeignete Positivkontrolle eingeschätzt (Jungersen et al. 2002).

Je nach Studiendesign und Vergleichsmethode wurde für den IFN- $\gamma$ -Test beim Rind eine Sp zwischen 44 % und 99 % angegeben (Huda et al 2003; Kalis et al. 2003; Jungersen et al. 2002). In zwei Studien an subklinisch infizierten Schafen, wurde eine Se von 55 % bis 67 % sowie eine Sp von 93,5 % bis 93,9% relativ zur Gewebekultur ermittelt (Pérez et al. 1999; Robbe-Austerman et al. 2006c). Im Vergleich zu drei serologischen Tests erkannte der IFN- $\gamma$ -Assay in der Gewebekultur positive Schafe früher und häufiger (Gwozdz et al. 2000b).

Die IFN- $\gamma$ -Antwort scheint bei gesunden und infizierten Kälbern unter einem Jahr zu schwanken und wird in dieser Altersgruppe nicht empfohlen (Huda et al. 2003a; Jungersen et al. 2002; Collins und Zhao 1995). Die Variabilität der Reaktion wurde mit Unterschieden in der Reife oder Anzahl der Lymphozyten bzw. mit Einflüssen maternaler Immunfaktoren erklärt (Mc Donald et al. 1999). Bei 255 Ziegen aus nicht betroffenen Beständen unter 18 Monaten traten keine falsch-positiven IFN- $\gamma$ -Reaktionen auf (Storset et al. 2011). Trotz dieser Einschränkung bei Jungtieren ist der Test im Vergleich zu anderen Methoden häufiger in der Lage, jüngere Tiere als infiziert zu erkennen. Die Se bei infizierten Rindern zwischen einem und zwei Jahren lag bei 75 % (Huda et al. 2004). Eine wiederholte Testung erhöhte die Se (Huda et al. 2003, Huda et al. 2004). Bei Tieren ab dem dritten Lebensjahr sank die Se im Vergleich zu jüngeren Rindern aufgrund der Abnahme der zellulären Immunität mit der Dauer der Infektion auf 50 % ab (Huda et al. 2004).

Der IFN- $\gamma$ -Assay erkennt als einziger Paratuberkulosestest subklinisch infizierte Tiere vor dem Beginn der Ausscheidung und der Antikörperbildung. Er eröffnet damit das Potential, Sanierungsprogramme zu verbessern und wurde als Herdensingreening empfohlen (Jungersen et al. 2002; Kalis et al. 2003; Huda et al. 2003, Huda et al. 2004; Storset et al. 2011). Jedoch unterscheidet er nicht zwischen exponierten Tieren ohne histologische Veränderungen oder einen kulturellen MAP-Nachweis und solchen mit

einer pathologisch und kulturell nachgewiesenen Infektion (Lybeck 2012; O'Brien et al. 2006, Begg et al. 2011). Weiterhin muss beachtet werden, dass nicht alle Tiere, die mittels Methoden wie der histologischen Untersuchung als infiziert charakterisiert werden, eine IFN- $\gamma$ -Reaktion ausbilden (Pérez et al. 1999), was den Testeinsatz weiter limitiert. Er wird zurzeit nicht in der Routine eingesetzt. Tierartliche Unterschiede in der Kinetik der IFN- $\gamma$ -Reaktion über den Infektionsverlauf, die die Planung einer Probenentnahme erschweren könnten, sind nicht ausgeschlossen.

Bei geimpften Tieren treten erwartungsgemäß stärkere und lang anhaltende IFN- $\gamma$ -Reaktionen auf (Mc Donald et al. 1999; Storset et al. 2011), da eingesetzte Impfstoffe die zelluläre Immunität ansprechen (Kapitel 2.1.8.1). Da der IFN- $\gamma$ -Assay nicht zwischen geimpften und infizierten Tieren unterscheidet, ist ein Einsatz in vakzinierten Beständen ausgeschlossen.

Als großes Problem wird der Mangel an spezifischen MAP-Antigenen, die eine zuverlässige zelluläre Immunantwort auslösen, für diesen Test angesehen (Mikkelsen et al. 2011; Huda et al. 2004, McDonald et al. 1999). Für die wenigsten Antigene liegen Ergebnisse zur Induktion einer zellulären Immunantwort vor (Tab. 2.5). Erschwert wird die Forschung v. a. dadurch, dass sich nur 40 für Proteine codierende Genomsequenzen MAP von anderen Mykobakterien unterscheiden (Bannantine et al. 2002, 2003; Paustian et al. 2004) und die Proteinexpression von verschiedenen Umweltbedingungen abhing (Gumber et al. 2009b; Gumber und Whittington 2009). Rekombinant herstellbare MAP-Proteine umfassen z. B. das potentielle Invasin MAP1204 (Bannantine et al. 2008a), das Antikörper in Seren MAP-infizierter Rinder band oder das hypothetische Protein MAP2077e, dem teilweise Funktionen als Membranprotein oder Hitzeschockprotein zugeschrieben werden (Bannantine et al. 2008a,b). Auch der potentielle Virulenzfaktor MAP1272c, der ebenfalls Charakteristika eines Invasins aufweist, war in der Lage im ELISA MAP-Antikörper zu detektieren (Li et al. 2007). Angaben zu ihrer Fähigkeit eine IFN- $\gamma$ -Sekretion auszulösen, lagen für diese drei Proteine bisher nicht vor.

### **2.1.8 Prophylaxe und Therapie**

Die Paratuberkulose ist unheilbar. Zwar wurde vereinzelt von einer Besserung der klinischen Symptome unter einer Therapie mit Antibiotika und Antihistaminika berichtet, nach dem Absetzen der Medikation kam es jedoch stets zu Rezidiven (Chiodini et al. 1984b; Merkal et al. 1984).

Aufgrund der großen wirtschaftlichen Bedeutung und des potentiellen zoonotischen Potentials von MAP (Kapitel 2.1.1) existieren in vielen Ländern staatliche oder freiwillige Bekämpfungsprogramme. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Ziels, der Organisation, den Methoden zur Identifizierung infizierter Tiere sowie in der Zusammensetzung und Gewichtung der einzelnen Bekämpfungsmaßnahmen (Whitlock 2010; Weber und van Schaik 2009; Baumgartner und Khol 2008; Khol et al. 2009). In Ländern wie Island (Fridriksdottir 2000), Norwegen (Saxegaard und Fodstat 1985) oder

Tab. 2.5 Ausgewählte Studien zur Untersuchung der Wirkung verschiedener diagnostischer Antigenkandidaten auf die zelluläre Immunreaktion bei der Paratuberkulose

Antigenklasse	Name (Locus)	Herstellung	Funktion	Tierart	IFN- $\gamma$ - Reaktion positiv		Quelle
					infiziert	negative Kontrollen	
Sekretiertes Protein	MPP14	n	?	R	5/7	0/7	Olsen et al. 2005
	P30	n	?	S	2/2	0/2	Burrels et al. 1995
hypothetisches Protein	AphC (MAP1588c)	n	Enzym	Z	je 3/3	je 0/1	Olsen et al. 2000a
	AphD (MAP1589c)	n					
	MAP10	r	Enzym	R	4/5	0/5	Nagata et al. 2005
Zellwand- / Membranständig	MAP39 (MAP3184)	r	Hypothetisch T-Zell-Ag	R	5/5	0/5	Nagata et al. 2005
	MAP41 (MAP1518)	r	Hypothetisch T-Zell-Ag	R	5/5	0/5	Nagata et al. 2005
Lipoprotein	MAP0261c (MAP0261c)	r	Antigen bei Tuberkulose Mensch und Maus	R	Unterschied 21 PTB zu 9 NPTB signifikant		Huntley et al. 2005
					Homologie andere <i>M.</i>		
Hitzeschockprotein	Hsp70	r	Impfkomponente Tuberkulose	R	PBMC-Proliferation FC pos 88% FC neg 74,1%	PBMC-Proliferation 30,5 %	Koets et al. 1999
	HspX	r	Adhäsion Hitzeschock, intrazellulär	R	0/10	0/3	Bannantine und Stabel (2000)

Erläuterungen: Ag = Antigen, R = Rind, S = Schaf, Z = Ziege, PTB = mit Paratuberkulose infiziert, N = nicht, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, FC = fecal culture (Kotkultur), M. = Mycobacterium, MAP = Mycobacterium avium spp. paratuberculosis, MAA = Mycobacterium avium spp. avium, r = rekombinant hergestellt, n = natürlich gewonnen, KR = Kreuzreaktion



Australien (Allworth und Kennedy 2000; Kennedy und Citer 2010), in denen besonders hohe Verluste bei kleinen Wiederkäuern auftraten, sind staatliche Programme verankert, die häufig Bestandsimpfungen dieser Spezies beinhalten. Schweden, das eine weitere Einschleppung der Paratuberkulose verhindern will, regelt die Bekämpfung per Gesetz (Holmström und Stenlund 2005; Sternberg und Viske 2003). Allen Programmen ist gemein, dass die ergriffenen Maßnahmen auf der Identifizierung und Eliminierung von Ausscheidern („test and cull“), Hygienemaßnahmen sowie der Unterstützung dieser Maßnahmen durch Impfungen beruhen. Dabei ist die Einführung hygienischer Maßnahmen entscheidend um die Ausbreitung der Infektion im Bestand langfristig einzudämmen. Eine alleinige Impfung ohne weiterführende Maßnahmen reduzierte zwar die Ausscheidungsintensität von MAP, der Anteil ausscheidender Tiere sank in geimpften Herden ohne Hygienemanagement jedoch langsamer als in ungeimpften Herden, die ausschließlich ein Hygienemanagement betrieben (Kalis et al. 2001). „Test and cull“-Programme ohne weiterführende Maßnahmen führen nicht so effektiv zu einer Prävalenzsenkung innerhalb der Herden wie die Einführung hygienischer Maßnahmen oder eine Impfung (Juste et al. 2009; Groenendaal und Galligan 2003). Die Kombination der drei Bekämpfungssäulen war zur Minimierung wirtschaftlicher Schäden am epidemiologisch am sinnvollsten und kosteneffektivsten (Groenendaal und Galligan 2003). Da insbesondere Kälber für die Infektion empfänglich sind, ist der Schwerpunkt der Maßnahmen zur Unterbrechung der Infektkette in diesem Bereich zu setzen. Dabei sollte die Möglichkeit der intrauterinen Übertragung von MAP berücksichtigt werden. Sollten sich Berichte über eine aerogene Übertragung von MAP bestätigen (Eisenberg et al. 2011), wäre dies eine neue Herausforderung bei der Durchführung von Kontrollprogrammen. Die ohnehin erforderliche räumliche Trennung zwischen Jungvieh und adulten Tieren würde als Bekämpfungsmaßnahme an Bedeutung gewinnen.

In Deutschland besteht keine Bekämpfungspflicht, die Erkrankung ist jedoch meldepflichtig (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten, 2014). Mit den Zielen der Prävalenzsenkung in betroffenen Betrieben, der Minimierung ökonomischer Schäden, der Verhinderung der Verbreitung der Paratuberkulose sowie der Schaffung und des Schutzes unverdächtiger Betriebe wurden 2014 im Rahmen der „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ freiwillige Bekämpfungsmaßnahmen erarbeitet. Erstmals werden darin neben Milchviehbeständen auch Mutterkuhbetriebe erfasst, ein Stufenplan zur Sanierung vor- und die Möglichkeit der Zertifizierung unverdächtiger Betriebe in Aussicht gestellt. Die Verhinderung der Übertragung von MAP von adulten Rindern auf Jungvieh steht im Mittelpunkt und soll durch detailliert aufgeführte Hygienemaßnahmen in Kombination mit regelmäßiger Diagnostik und der Entfernung infizierter Tiere erreicht werden. Derzeit führen einzelne Bundesländer freiwillige Bekämpfungsmaßnahmen durch. Programme mit dem Ziel der Bestandssanierung existieren zurzeit in Sachsen und Thüringen.

### 2.1.8.1 Impfungen

In Deutschland besitzt aktuell kein Impfstoff eine Zulassung. In anderen Ländern wie z. B. Island (Fridriksdottir et al. 2000) oder Australien (Kennedy und Citer 2010) werden verschiedene Impfstoffe angewendet.

Es existieren verschiedene attenuierte Lebendvakzinen und inaktivierte Ganzzellimpfstoffe (Gierke et al. 2009), die sich durch die enthaltenen MAP-Stämme und das verwendete Adjuvants unterscheiden. Beide Impfstoffarten induzierten eine periphere zelluläre Immunität, die einen gewissen Grad an Protektion gewährte (Begg und Griffin 2005; Sweeney et al. 2009). Es kam durch die Impfung auch zu einem schnellen Antikörperanstieg (Spangler et al 1991; Juste et al. 1994).

Die protektive zelluläre Reaktion auf den Impfstoff führte zur Reduktion pathologischer Läsionen (Begg und Griffin 2005; Sweeney et al 2009; Hines et al. 2006), die sich auch in ihrer Charakteristik von denen nicht geimpfter Tiere unterschieden (Juste et al. 1994). Die Anzahl der MAP-Ausscheider pro Herde reduzierte sich in einer Feldstudie - verglichen mit einem „*test and cull*“ Programm in geimpften Herden - stärker (Juste et al. 2009). Auch die Anzahl der ausgeschiedenen Bakterien in der geimpften Gruppe war signifikant reduziert. Eine Impfung verhinderte klinische Erkrankungen nicht vollständig (Wilesmith 1982; Begg und Griffin 2005; Reddacliff et al 2006), staatliche Impfkampagnen trugen jedoch erfolgreich zur Tilgung der klinischen Paratuberkulose in Island und Norwegen bei (Fridriksdottir 2000; Saxegaard und Fodstat 1985). Durch die Verbesserungen reduzierten sich die ökonomischen Verluste für die Landwirte (van Schaik et al. 1996). So wiesen Tiere aus geimpften Herden eine höhere Milchleistung gegenüber solchen aus nicht geimpften Herden auf, die eine Sanierung mittels Ausscheidermerzung anstrebten, auf (Juste et al. 2009).

Keiner der bisher entwickelten Impfstoffe verhinderte eine Infektion gesunder Tiere (Begg und Griffin 2005; de Lisle 2010). Durch die enge antigenetische Verwandtschaft der Mykobakterien führte die Ausbildung der zellulären Immunreaktion nach einer Impfung bei Rind, Wild und kleinem Wiederkäuer über Jahre zu Kreuzreaktionen im Intrakutantest, der im Rahmen der Tuberkulosebekämpfung zum Einsatz kommt (de Lisle 2010; Herbert et al. 1959; Mackintosh et al. 2005; Reddacliff 2006). Auch im IFN- $\gamma$ -Test traten Kreuzreaktionen auf (Köhler et al. 2001). Mittels serologischer Testverfahren für die Paratuberkulose ließen sich infizierte von geimpften Tieren nicht unterscheiden (Muskens et al. 2002). Durch die Reduktion der Ausscheidungsmenge und der Anzahl der Ausscheider wird außerdem die Detektion infizierter Tiere mittels Kotkultur erschwert, was insbesondere in Herden mit niedriger Einzeltierprävalenz im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen zu beachten ist.

An der Impfstelle wurden je nach verwendeter Vakzine Impfgranulome verschiedenen Ausmaßes beschrieben, die z. T. persistierten und die Schlachtkörperqualität minimierten (Windsor und Epplestone 2006; Sweeney et al 2009; Köhler et al. 2001). In

anderen Studien war ein ökonomischer Effekt nicht nachweisbar (Reddacliff et al. 2006; Mackintosh et al 2008).

Derzeit wird die Entwicklung von Subunit-, Vektor- und DNA-Vakzinen vorangetrieben. Dabei steht die Auslösung einer MAP-spezifischen zellulären Immunität, die eine Infektion gesunder Tiere mit MAP verhindert, im Mittelpunkt der Forschung. Eine Vektorvakzine löste in Mäusen einen Schutz vor der Infektion aus (Bull et al. 2007). Ein weiterer Impfstoffkandidat auf Basis einer Proteinuntereinheit erlaubte die Unterscheidung von geimpften und nicht geimpften Rindern und zeigte keine Kreuzreaktionen bei der Verwendung von Tests zur Tuberkulosedagnostik (Santema et al. 2009).

## 2.2 Infektionsmodelle

Infektionsmodelle für die Paratuberkulose wurden an verschiedenen Tierarten etabliert. Als Modelltiere wurden zum einen verschiedene Labortiere wie Mäuse (Hamilton et al. 1991), Meerschweinchen (Collins 1983) oder Hamster (Hirsch 1956) und zum anderen Haus- und Wildwiederkäuer verwendet (Valheim et al. 2004; Koo et al. 2004; Begg et al. 2010; Mackintosh et al. 2011). Je nach Zielstellung werden Lang- und Kurzzeitmodelle unterschieden. Letztere dienen vor allem der Erforschung der Interaktionen zwischen MAP und dem Wirt in den ersten Stunden bis Tagen der Infektion. Langzeitmodelle werden genutzt um pathogenetische Mechanismen und deren Veränderungen während des Infektionsverlaufs aufzuklären. Auch zur Evaluierung diagnostischer Methoden, für die Impfstofftestung und zur Untersuchung der Erbllichkeit einzelner Komponenten der Wirtsreaktion auf die Infektion sind längere Studien nötig (Hines et al. 2007a).

Die Vorteile von Labortiermodellen sind die einfache Pflege der Tiere, ein geringer Platz- und Futterbedarf und dadurch geringere Kosten (Begg und Whittington 2007). Aufgrund der geringen Lebensspanne der Tiere sind Versuchsergebnisse schnell verfügbar. Sie sind allerdings nicht unmittelbar auf die Zielspezies von MAP übertragbar, da Unterschiede in der Immunreaktion z. B. zwischen Maus und Wiederkäuer nicht untersucht sind (Hines et al. 2007a). Für eine unterschiedliche Wirtsreaktion gegenüber dem Bakterium spricht, dass die Etablierung einer Infektion nach oraler Inokulation, die dem natürlichen Infektionsweg beim Wiederkäuer entspricht, bei nicht immunkompetenten Mäusen (Mutwiri et al. 1992) und immunkompetenten Mäusen (Veazey et al. 1995a) deutlich schwieriger ist als z. B. nach der invasiveren intraperitonealen Injektion des Erregers (Mutwiri et al. 1992). Pathohistologische Veränderungen traten nach einer Inokulation auf oralem Weg später auf und waren weniger stark ausgeprägt (Mutwiri et al. 1992). In einer Modellstudie an immunkompetenten Mäusen blieben sie auf die Mesenteriallymphknoten beschränkt und waren nur bei 50 % der Tiere zu beobachten (Veazey et al. 1995a).

Klinische Symptome nach intraperitonealer Inokulation waren in immunkompetenten Mäusen nicht auslösbar (Tanaka et al. 1994). Immunkompetente und -defiziente Mäuse zeigten in weiteren Untersuchungen Paratuberkulose-typischen Gewichtsverlust (Mutwiri et al. 1992; Chandler 1961). Durchfall wurde ausschließlich bei athymischen Mäusen beobachtet (Hamilton et al. 1991). Pathologisch-histologische Veränderungen traten im Gegensatz zum Wiederkäuer in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen zunächst in Leber und Milz auf. Erst anschließend wurden Läsionen im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen (Chandler 1961; Stabel und Ackermann 2002; Hamilton et al. 1991). Die in Mäusen hervorgerufenen Erscheinungen entsprachen demnach nicht einer natürlichen Infektion (Begg und Whittington 2007; Hines et al. 2007a). Bei der Ergebnisbeurteilung muss die unterschiedliche Empfänglichkeit verschiedener

Mauslinien gegenüber der Paratuberkulose berücksichtigt werden (Chandler 1961; Veazey et al. 1995b). Labortier- und insbesondere Mausmodelle bieten jedoch die Möglichkeit die Rolle einzelner Komponenten der Immunreaktion zu eruieren. Verschiedene Knock-out-Linien, bei denen definierte Anteile des Immunsystems ausgeschaltet sind, wurden ebenso verwendet (Stabel und Ackermann 2002; Tanaka et al. 2000) wie SCID-Linien (*severe combined immunodeficient*, Mutwiri et al. 1992) oder athymische Mäuse (Hamilton et al. 1991). Es wurden der Einfluss des angeborenen und des erworbenen Immunsystems auf die Abwehrreaktion, verschiedene molekulare Reaktionswege und Gene, die eine Resistenz gegenüber MAP vermitteln könnten, analysiert. Labortiermodelle werden vorwiegend genutzt, um Untersuchungsansätze, Impfstoffkandidaten oder Therapeutika zu ermitteln, deren weitere Evaluierung an den Zielspezies Erfolg verspricht (Rosseels et al. 2006).

Wiederkäuermodelle sind aufgrund des hohen Platz-, Pflege- und Futterbedarfs aufwändig und kostenintensiver. Die lange Inkubationszeit erschwert die Durchführung von Langzeitstudien (Begg und Whittington 2007). Durch die orale Inokulation lässt sich eine natürliche Infektion jedoch besser nachahmen als an Labortieren. Die gewonnenen Erkenntnisse sind daher für das Verständnis der Paratuberkulose essentiell. Dabei ist eine Modellstudie nur eine Annäherung an natürliche Verhältnisse. So ist die Gabe von infiziertem Kot als Inokulum zwar der natürliche Infektionsweg, die verabreichte MAP-Dosis kann jedoch zwischen den Tieren variieren und erschwert die Vergleichbarkeit der Reaktion einzelner Tiere (Hines et al. 2007a). Kurzzeitmodelle an Wiederkäuern werden zum einen zur Untersuchung struktureller Interaktionen zwischen Wirt und Erreger - wie der Aufnahme von MAP über M-Zellen im Darm - genutzt (Sigurðardóttir et al. 2001), zum anderen zur Aufklärung der Immunreaktionen direkt nach der Erregeraufnahme (Begg und Whittington 2007). Langzeitmodelle an Wiederkäuern werden zur Erforschung verschiedener pathogenetischer Fragestellungen (Sigurðardóttir et al. 2001), zur Impfstofftestung (Mackintosh et al. 2008), zur Evaluierung diagnostischer Systeme (Gwozdz et al. 2000b) und zur Charakterisierung der Immunantwort im Infektionsverlauf verwendet (Delgado et al. 2012). Bei einem Teil der Untersuchungen handelte es sich um Endpunktuntersuchungen, die eine Fragestellung retrospektiv zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Inokulation betrachteten und erst dann evaluierten, ob eine Infektion stattgefunden hatte (Robinson et al. 2008; Sigurðardóttir et al. 2001; Uzonna et al. 2003). Andere Autoren testeten neben der Beurteilung des Infektionsstatus zum Versuchsende auch während der Versuchsdauer kontinuierlich bestimmte Parameter, um ihre Veränderungen während des Infektionsverlaufs zu beurteilen (de Silva et al. 2011; Allen et al. 2009; Juste et al. 1994).

Erkenntnisse zu Problemlösungsansätzen, die in Labortiermodellen entwickelt wurden, werden an den Zielspezies von MAP überprüft und weiterentwickelt (Rosseels et al. 2006). Im Gegensatz zu genetisch gut charakterisierten Labortieren können aufgrund der größeren genetischen Heterogenität der Wiederkäuer bessere Rückschlüsse auf die

Reaktionen in der natürlichen für die Infektion empfänglichen Population getroffen werden (Begg und Whittington 2007). Auch Untersuchungen zu den Auswirkungen der Erkrankung auf die Leistung der Tiere und den daraus folgenden ökonomischen Folgen für die Volkswirtschaft sind nur an Wiederkäuern möglich (Begg und Whittington 2007).

Bestehende Paratuberkulosemodelle an Wiederkäuern unterschieden sich in der Art und Menge des Inokulums, im verwendeten Bakterienstamm sowie der Art und Häufigkeit der Inokulation (Tab. 2.6, Sigurðardóttir et al. 2001; Steward et al. 2006). Die experimentelle Infektion wurde an Tieren unterschiedlichen Alters durchgeführt, die Versuchsdauer variierte ebenfalls (Hines et al. 2007a; Steward et al. 2006). Die Untersuchungsparameter der einzelnen Modelle umfassten u. a. die Charakterisierung der subklinischen Erkrankungsphase anhand des temporären, qualitativen und quantitativen Auftretens pathohistologischer Veränderungen, der Erregerausscheidung und der humoralen sowie zellulären Immunantwort (Munjal et al. 2005; Storset et al. 2001). Untersucht wurden außerdem die Auswirkungen von Impfungen auf die Läsionsausprägung, die ausgeschiedene Erregermenge und die Lymphozytenreaktion (Begg und Griffin 2005). Auch der Vergleich der Eignung diagnostischer Methoden wie Antikörper-ELISA, MAP-PCR im Kot oder IFN- $\gamma$ -Assay im Infektionsverlauf (Munjal et al. 2007; Gwozdz et al. 2000b) oder die Beschreibung der an der Auseinandersetzung mit dem Erreger beteiligten M-Zellen und der PP sind Gegenstand von Tiermodellstudien (Sigurðardóttir et al. 2001; Valheim et al. 2002). Um eine Standardisierung und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Studien mit gleicher Problemstellung zu erreichen, wurden tierartspezifische Etablierungsrichtlinien für Tiermodelle entwickelt (Hines et al. 2007a). Insbesondere die geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stellte einen Mangel vieler Studien dar (Begg und Whittington 2007).

Tab. 2.6 Übersicht über caprine Langzeitmodelle für die Paratuberkulose zur Untersuchung der Immunantwort (modifiziert nach Hines et al., 2007a und Begg und Whittington, 2007).

Quelle	Ziel	Anzahl Versuchstiere	Alter (Wo)*	Gesamtdosis Inokulations-schema	Dauer (Wo)	Endpunkt-/Verlaufsstudie	Infektionsrate (%) <sup>1</sup>	Sektion	Klinik (%)	Immunantwort	
										zellulär	humoral
Munjal et al. (2005)	Untersuchung zellulärer Immunität Evaluation Diagnostika	10	5-8	1 × 10 <sup>10</sup> MAP 7x alle 2 Tage	2-39	Verlauf	50	X	40	X	X
Munjal et al. (2007)	Evaluation Diagnostika	10	5-8	1 × 10 <sup>10</sup> MAP 7x alle 2 Tage	2-39	Verlauf	6	X	10	X	X
Storset et al. (2001)	Untersuchung zellulärer Immunität	7	5-8	250 mg BFM 3x/Woche 9 Wochen	106-117	Verlauf	86	X	0	X	X
Valheim et al. (2002)	Beschreibung von Zusammenhängen zwischen Läsionen und GALT-Struktur	7	5-8	250 mg BFM 3x/Woche 9 Wochen	104	Endpunkt	86	X	0	NU	NU
Hines et al. (2007b)	Impfstoff-evaluation	74	1-4	6 × 10 <sup>9</sup> MAP 4x alle 2 Tage	24/36	Verlauf	100	X	4	X	X

Erläuterungen: \* zum Inokulationszeitpunkt, <sup>1</sup> basierend auf Erregernachweis oder histologischer Untersuchung, BFM = Bakterienfeuchtmasse, GALT = Gut Associated Lymphoid Tissue, MAP = *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis, NU = nicht untersucht, Wo = Wochen

### 3 Arbeitshypothesen

Derzeit existiert kein zuverlässig reproduzierbares Langzeitmodell für die Paratuberkulose, das jedoch eine Voraussetzung wäre, um unklare Fragestellungen hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort und der Schwere der Läsionen zu untersuchen. Ältere existierende Modelle sind aufgrund fehlender Standardisierung nicht vergleichbar. Nur nach einer sicheren Infektion ist die Evaluation von Diagnostika möglich. Insbesondere für die frühen Infektionsstadien der Paratuberkulose fehlen sichere Tests. Der IFN- $\gamma$ -Assay gilt als potentieller Testkandidat für die subklinische und latente Infektionsphase der Paratuberkulose, seine Sp ist jedoch aufgrund fehlender spezifischer Antigene begrenzt.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Die Etablierung eines reproduzierbaren caprinen Langzeitinfektionsmodells für die Paratuberkulose, das internationalen Standards entspricht, ist möglich.
2. Die zelluläre, proinflammatorische Immunantwort ist abhängig von der Inokulationsdosis und dem Inokulationszeitpunkt.
3. Sie hängt außerdem mit der Ausprägung der histologischen Veränderungen an Darm und Lymphknoten des Darmes, der Erregerausscheidung und der MAP-Konzentration in betroffenen Geweben zusammen.
4. Der Übergang zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort wird durch eine steigende IL-10-Sekretion ausgelöst.
5. Rekombinante MAP-Proteine eignen sich als spezifische Antigene im IFN- $\gamma$ -Test, seine Se kann außerdem durch die Neutralisation von IL-10 erhöht werden.
6. Zwischen infizierten und gesunden Ziegen existieren eindeutige Unterschiede in der Genexpression verschiedener Zytokine, die diagnostisch nutzbar sind.



## 4 Eigene Untersuchungen

### 4.1 Tiere, Materialien und Methoden

#### 4.1.1 Tiere

Der Tierversuch wurde vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigt (Tierversuchsantragsnummer 04-002/08) und stand im Einklang mit dem derzeit geltenden Tierschutzgesetz.

##### 4.1.1.1 Identität und Herkunft

Die 39 männlichen Thüringer Wald Ziegen (Nummern 1 - 39) stammten aus einem Bestand in Thüringen. Alle 78 laktierenden Muttertiere dieses Bestandes wurden vor Versuchsbeginn ein Mal mittels kulturellen MAP-Nachweises im Kot auf das Freisein von Paratuberkulose hin überprüft. Klinische Verdachtsfälle waren in diesem Bestand noch nie aufgetreten.

Die Versuchstiere kamen innerhalb von 17 Tagen zur Welt. Sie wurden unmittelbar nach der Geburt von ihren Muttertieren getrennt in Gruppenboxen mit Wärmelampe aufgestellt. Die Geburtsgewichte lagen zwischen 2,2 kg und 4,4 kg. (Kapitel 10.1.1; Tab. 10.1)

##### 4.1.1.2 Umstallung und Einstellungsmanagement

Die Umstallung aus dem Ursprungsbestand erfolgte zu drei Zeitpunkten, an denen jeweils zwölf, 22 und sechs Ziegen an das Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena (FLI) verbracht wurden. Die Einstellungs-gewichte bewegten sich zwischen 2,6 kg und 6,0 kg (Kapitel 10.1.1; Tab. 10.1).

Um einen Befall mit Erregern auszuschließen, die einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnten, wurden verschiedene Einstellungsuntersuchungen durchgeführt (Kapitel 10.1.1, Tab. 10.2).

Während des Versuchs trat ein Befall mit *Chorioptes* spp. auf. Alle Tiere wurden daraufhin lokal mit den Wirkstoffen Ivermectin und Phoxim behandelt. Kotprobenanalysen einzelner Tiere aus den verschiedenen Gruppen ergaben einen geringgradigen Befall mit *Eimeria* spp., *Trichuris* spp. und *Nematodirus* spp.

#### 4.1.1.3 Fütterung

In den ersten fünf Lebenstagen (LT) bekamen die Lämmer Kolostrum ihrer Muttertiere mittels einer Saugflasche<sup>1</sup> verabreicht. Bis zur Umstallung an das FLI erhielten sie anschließend Mischkolostrum. Danach wurde jedem Tier drei Mal täglich 500 ml eines kommerziellen Milchaustauschers (MAT)<sup>2</sup> für Ziegen in einer Saugflasche angeboten. Später wurde der MAT in einem Saugeimer<sup>3</sup> für bis zu sechs Tiere gegeben. Ab dem zehnten LT wurden Heu<sup>4</sup> und Kraftfutter angeboten. Die Menge wurde allmählich - je nach Aufnahme durch die Lämmer - gesteigert, bis sie zwei Mal täglich Heu und je 0,25 kg Kraftfutter pro Tier und Tag erhielten. Bis zum 60. LT bekamen die Ziegen ein kommerzielles Alleinfuttermittel für Ziegenlämmer<sup>5</sup>. Anschließend wurde aufgrund der dem Alter der Tiere entsprechenden günstigeren Nährstoffzusammensetzung zu einem Milchleistungsfutter für Ziegen<sup>6</sup> gewechselt. Das Heu wurde per Raufe, das Kraftfutter in einem gemeinschaftlichen Flachtrog gegeben. Wasser stand über zwei Selbsttränken pro Abteil zur freien Verfügung.

#### 4.1.1.4 Gruppeneinteilung

Die Lämmer wurden in sechs Tiergruppen mit etwa gleichem Durchschnittsgewicht eingeteilt, wobei Vollgeschwister nicht gemeinsam aufgestallt wurden. Die Tiere, deren Geburtstermine zeitlich enger zusammen lagen, wurden der Kontrollgruppe K1, sowie den Versuchsgruppen V1 und V2 zugeteilt, so dass die Tiere über einen ähnlichen Entwicklungsstatus des Immunsystems verfügten. Die Ziegenlämmer der beiden Versuchsgruppen wurden ab dem 3. LT mit MAP inokuliert, beide Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Inokulationsdosis (Abb. 4.1 und Abschnitt 4.1.3.3). Alle anderen Lämmer wurden in die Kontrollgruppe K2 sowie die Versuchsgruppen V3 und V4 aufgeteilt. Bei den Ziegenlämmern der Gruppen V3 und V4 erfolgte die Inokulation ab dem 42. LT mit verschiedenen Inokulationsdosen (Abb. 4.1 und Abschnitt 4.1.3.3). Beide Kontrollgruppen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten scheininokuliert. Die Gruppen V1, V2 und V4 umfassten je sieben Tiere. Die Gruppe V3 und die beiden Kontrollgruppen bestanden aus je sechs Ziegenlämmern.

Die Aufstallung erfolgte in drei geschlossenen Räumen der Sicherheitsstufe S2 nach der „Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen“ (1999), die nur durch eine eigene Hygieneschleuse zu betreten waren. Jeder Raum verfügte über zwei hintereinander liegende Abteile, die durch eine Gittertür

---

<sup>1</sup> Lämmerflasche „Anti Vac“ 500 ml, ARNDT Europadiscount, Hochdorf

<sup>2</sup> DenkaVit, bezogen über Landhandelsgesellschaft Schmölln, Schmölln

<sup>3</sup> Lammeimer Kunststoff für 6 Lämmer, ARNDT Europadiscount, Hochdorf

<sup>4</sup> Lokal ansässiger Schäfer, Jena

<sup>5</sup> Alleinfuttermittel für Ziegenlämmer 406, bezogen über Landhandelsgesellschaft Schmölln, Schmölln

<sup>6</sup> Milchleistungsfuttermittel II, bezogen über Landhandelsgesellschaft Schmölln, Schmölln

voneinander getrennt waren. Pro Abteil wurde eine Tiergruppe auf Stroh gehalten. In Raum eins wurden beide Kontrollgruppen, in Raum zwei die Gruppen V1 und V3 und in Raum drei die Gruppen V2 und V4 aufgestellt. Das von der Hygieneschleuse weiter entfernt liegende Abteil wurde jeweils mit den Ziegen belegt, die zum späteren Zeitpunkt inokuliert bzw. scheininokuliert worden waren (Abb. 4.1).

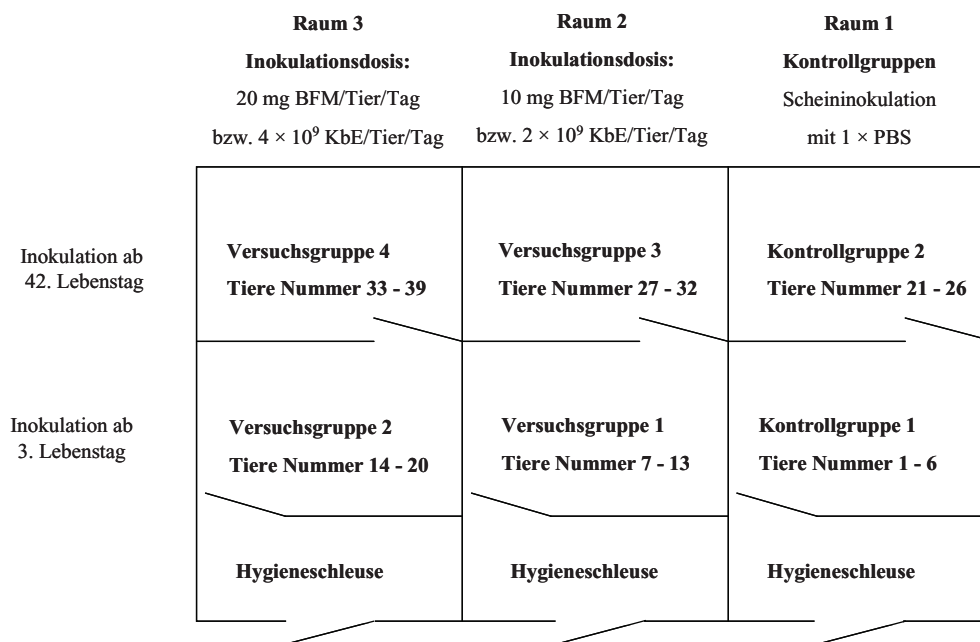


Abb. 4.1 Gruppeneinteilung, Aufstallungsregime und Inokulationsschema der Versuchstiere. Erläuterungen: BFM = Bakterienfeuchtmasse, KbE = Koloniebildende Einheiten, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat Buffered Saline)

#### 4.1.1.5 Betreuung und Hygieneregime

Die Pflege erfolgte durch zwei Personen, die wöchentlich zwischen den einzelnen Gruppen wechselten, um einen Einfluss des Pflegers auf das Wohlbefinden der Tiere auszuschließen. Die Tiere wurden in 14tägigem Rhythmus gewogen und die Räume im Abstand von zwei bis drei Wochen entmistet. Alle sechs bis acht Wochen wurde eine manuelle Klauenpflege durchgeführt. Um eine Erregerverschleppung zu vermeiden, wurden zunächst die Kontroll- und anschließend die Versuchsgruppen versorgt. In den Hygieneschleusen lagen separate Hygienekleidung und entsprechendes Schuhwerk sowie Latex-Schutzhandschuhe und raumbezogene Geräte zur Untersuchung und Betreuung der Tiere bereit. Beim Verlassen des Stalltraktes waren die Pfleger angewiesen zu duschen. Diese Maßnahmen waren auch vor dem Betreten der Abteile der Kontrollgruppen durchzuführen, wenn es sich durch arbeitstechnische Abläufe nicht vermeiden ließ, von der Betreuungsreihenfolge abzuweichen.

## **4.1.2 Materialien**

### **4.1.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände, Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien**

Die verwendeten Geräte und Gebrauchsgegenstände, die Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien und die benötigten Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang unter Angabe der jeweiligen Bezugsquelle aufgeführt (Kapitel 10.1, Tab. 10.3, Tab. 10.4, Tab. 10.5).

### **4.1.2.2 Kits und Fertiglösungen, Medien und Lösungen zur PBMC-Isolation, PBMC-Restimulantien, Antikörper- und Reaktionskomponenten für die Zytokin-ELISAs**

Kits und Fertiglösungen sind im Anhang unter Angabe der jeweiligen Bezugsquelle gelistet (Kapitel 10.1, Tab. 10.6). Auch die Medien und Lösungen zur Isolation von PBMC und die PBMC-Restimulantien werden dort aufgeführt (Kapitel 10.1, Tab. 10.7). Die zur Durchführung der Zytokin-ELISAs benötigten Antikörper und Reaktionskomponenten werden entsprechend dokumentiert (Kapitel 10.1, Tab. 10.8, Tab. 10.9). Alle verwendeten Antikörper wurden von der Firma AbD Serotec, Düsseldorf bezogen und bei -20 °C gelagert.

Das ELISA-Testsystem „ID Screen® Paratuberculosis Indirect“ zur Antikörperbestimmung wird in den weiteren Ausführungen als ELISA oder Antikörper-ELISA bezeichnet.

### **4.1.2.3 Primer**

Alle verwendeten Primer für die Reverse-Transkriptions-(RT)-real-time PCR, die IS900- und die IS1245-PCR wurden von der Firma Jena Bioscience, Jena synthetisiert und als Lyophilisat geliefert. Sie wurden den Herstellerangaben entsprechend in Aqua bidest. gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (Kapitel 10.1, Tab. 10.10, Tab. 10.11).

### **4.1.2.4 Puffer, Lösungen, Medien**

Die Rezepte der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sind in Kapitel 10.1, Tab. 10.12. zu finden.

#### 4.1.2.5 Programme, Datenbanken, Online-Ressourcen

Auswertung der ELISA-Ergebnisse	Tecan EasyWin fitting, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
RNA-Konzentrationsbestimmung	ND-1000 Software, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Auswertung der real-time PCR	7000 Sequence Detection Software, Version 1.2.3, Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Datenaufbereitung und ELISA-Validierung	Microsoft® Office Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Statistische Auswertung	PASW 17, IBM Deutschland GmbH, München Statgraphics +4.0, ISE DATA GmbH, Offenbach

#### 4.1.3 Methoden

##### 4.1.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen zu den verwendeten Methoden

Der Transport von Kot- und Blutproben sowie der Bakterienfeuchtmasse (BFM) für die Inokulation der Tiere zwischen dem Mikrobiologischen Labor und dem Tierhaus des FLI erfolgte in einer dicht verschlossenen SteriSet®-Box. Soweit nicht anders vermerkt, wurden Proben jeglicher Art bei Zimmertemperatur aufgetaut oder inkubiert. Fanden Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank statt, wurde diese vorher mit 2-Propanol desinfiziert. Verwendete PCR-Hauben waren vor der Benutzung 20 min mit ultraviolettem Licht bestrahlt und anschließend je nach Arbeitsschritt mit RNase oder DNase away ausgesprüht worden.

##### 4.1.3.2 Herstellung der Inokulationsdosis und Inokulation

Die Inokulationsdosen wurden von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Mykobakterien des Instituts für molekulare Pathogenese, FLI, Jena hergestellt. Verwendet wurde ein Isolat des MAP-Stammes 03 A 1961, das aus dem *Ileocaecal*-Lymphknoten eines nachweislich klinisch an Paratuberkulose erkrankten Rindes aus Thüringen stammte und eine hohe genetische Übereinstimmung zum internationalen MAP-Referenzstamm K10 aufweist (Möbius unveröffentlicht). Dieses Feldisolat war zuvor nur drei Mal passagiert worden. Es wurde zunächst in Middlebrook-Bouillon bei 37 C im Schüttelinkubator bei ca. 80 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*,

rpm) angezüchtet. Dem Nährmedium waren Mycobactin, Ölsäure, BSA, Dextrose und Catalase zugesetzt. Vier Tage vor der Inokulation wurde diese Bakteriensuspension auf zuvor leer gewogene ( $M_a$ ) Zentrifugenröhrchen (50 ml) verteilt und bei  $2880 \times g$  für 20 min zentrifugiert.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Röhrchen erneut gewogen ( $M_b$ ) und die BFM je Röhrchen nach folgender Formel aus dem Bodensatz bestimmt:

$$\text{BFM (mg)} = M_b \text{ (mg)} - M_a \text{ (mg)} \quad (1.1)$$

Danach wurde jedes Pellet in 10 ml steriler phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) resuspendiert, um die einzelnen Proben nun in einem Glaskolben zusammenzuführen. Nach gründlichem Mischen wurde mit zwei Einmalimpfösen Material abgenommen und als Sterilkontrolle auf zwei Blutagarplatten ausgestrichen. Außerdem wurde mit weiterem Material eine Ziehl-Neelsen-Färbung durchgeführt. Wurden säurefeste Stäbchen nachgewiesen, erfolgte die Identifizierung als MAP mit einer Insertionssegment900 (IS900)- und einer IS1245-PCR mit Primern nach Englund et al. (1999) bzw. Guerrero et al. (1995). Die IS900-PCR ist spezifisch für MAP, das IS1245 kommt bei *M. avium* spp. *avium* sowie *M. avium* spp. *hominisuis* vor. Diese Arbeiten beruhten auf einer Laborarbeitsanweisung (LAA) des FLI.

Der Glaskolben mit dem restlichen Erregermaterial wurde fortwährend geschwenkt. Die Bakteriensuspension wurde so auf 22 Stück 50 ml-Röhrchen verteilt, dass jedes Röhrchen mindestens 220 mg BFM enthielt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wie oben beschrieben, wurde erneut die BFM bestimmt. Die Röhrchen wurden verschlossen und bei 5-8 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Am Vortag der Inokulation wurde die jeweils benötigte Menge BFM in sterilem  $1 \times$  PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in eine sterile Glasflasche überführt und die BFM mit  $1 \times$  PBS auf 0,001 g/ml eingestellt. Um Kontaminationen der Suspension auszuschließen, wurde erneut eine Sterilkontrolle wie oben beschrieben angelegt und ausgewertet. Die Bakterienlösung wurde über Nacht bei 37 °C und 80 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Unmittelbar vor der oralen Inokulation der Gruppen V1 und V3 wurde die Suspension in acht Portionen zu je 10 ml Bakteriensuspension aufgeteilt und mit sterilem  $1 \times$  PBS auf 20 ml aufgefüllt. Portion acht galt als Reserve. Weitere acht Röhrchen für die Gruppen V2 bzw. V4 wurden mit 20 ml Bakteriensuspension befüllt. Aus der in der Glasflasche verbliebenen Bakteriensuspension wurde eine retrospektive Keimzahlbestimmung vorgenommen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Stufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  angelegt und anschließend 0,1 ml pro Röhrchen auf je eine halbe Middlebrook-Agar-Platte verimpft. Diese wurden bei 37 °C aerob sechs Wochen bebrütet. Danach wurde unter dem Lichtmikroskop eine Auszählung der einzelnen Kolonien pro Verdünnungsstufe vorgenommen und die Keimzahl pro Milliliter

Suspension errechnet. Dann wurde der Mittelwert aus allen auswertbaren Platten gebildet.

Im Tierhaus stand für jedes Tier eine eigene, mit der Tiernummer beschriftete Saugflasche zur Verfügung. Es wurden jeweils 50 ml MAT in die Saugflasche vorgelegt, die Bakteriensuspension eingemischt und vertränkt.

#### 4.1.3.3 Versuchsaufbau

Der Gesamtversuch umfasste einen Zeitraum von insgesamt 54 Wochen (Abb. 4.2). Die Untersuchungen fanden zwischen dem 19. Februar 2009 und dem 26.03. 2010 statt. Es sollte der Einfluss von zwei verschiedenen Inokulationszeitpunkten und je Zeitpunkt zwei Inokulationsdosen auf die zelluläre und humorale Immunantwort untersucht werden.

Unmittelbar vor der ersten MAP-Gabe wurden Kot- und Blutproben von jeder Ziege entnommen. Die Gruppeneinteilung ist in Abschnitt 4.1.1.4 beschrieben. Die Gruppen V1 und V2 wurden ab dem dritten LT (früh) inokuliert. Jedes Tier der Gruppe V1 erhielt 10 mg BFM pro Inokulationstag. Diese Menge entsprach  $2 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten (KbE, geringe Dosis). Die Tiere der Gruppe V2 bekamen 20 mg BFM bzw.  $4 \times 10^8$  KbE (hohe Dosis) verabreicht. Als Negativkontrolle wurde beiden Tiergruppen die Gruppe K1 zugeordnet. Mit den Tiergruppen V3 und V4 wurde ebenso verfahren, die Inokulation begann ab dem 42. LT (spät). Beiden Versuchsgruppen wurde als Negativkontrolle die Gruppe K2 zugeteilt.

Zur besseren Orientierung für den Leser werden die einzelnen Gruppen im Folgenden mit V1 (früh, geringe Dosis), V2 (früh, hohe Dosis), K1 (früh), V3 (spät, geringe Dosis), V4 (spät, hohe Dosis), K2 (spät) bezeichnet. Die Angaben „früh“ und „spät“ beziehen sich dabei auf den Inokulationszeitpunkt, die Bezeichnung „geringe“ bzw. „hohe Dosis“ auf die Inokulationsdosis.

Jedes Tier wurde insgesamt zehn Mal im Abstand von zwei bis drei Tagen inokuliert bzw. scheininokuliert. Während dieser Zeit wurde wöchentlich eine Kotprobe entnommen. Nach der Inokulation fanden in vierwöchigem Abstand Blut- und Kotprobenentnahmen für jedes Einzeltier statt. Um eine zügige Probenbearbeitung zu gewährleisten, wurden nach einem festgelegten Schlüssel aus jeder Gruppe drei bis vier Tiere pro Woche beprobt. Den anderen Gruppenmitgliedern wurden eine Woche später Proben entnommen. Der im Folgenden verwendete Begriff „Beprobungszeitpunkt“ (BZP) umfasst also zwei Tage im Abstand von einer Woche (Abb. 4.2). Ist die jeweilige Woche nach Inokulationsbeginn (*post inoculationem, p. i.*) angegeben, schließen die zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten auch die in der darauf folgenden Woche *p. i.* gewonnenen Ergebnisse ein.

Aus dem Kot wurde MAP angezüchtet. Aus dem Vollblut wurde zum einen Serum für die Antikörperbestimmung gewonnen. Außerdem wurden PBMC aus dem Blut isoliert,

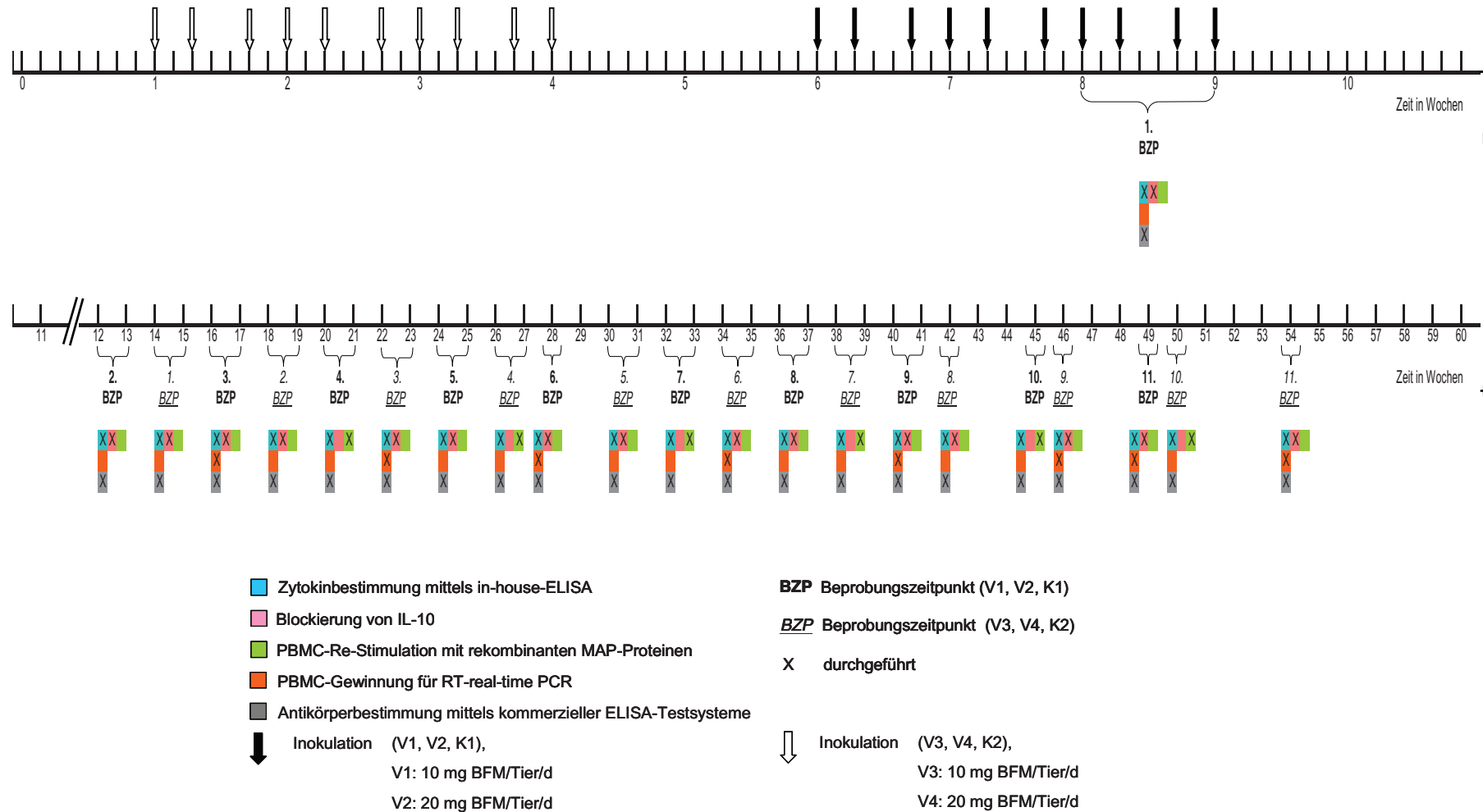


Abb. 4.2 Versuchsdesign

Erläuterungen: BFM = Bakterienfeuchtmasse, BZP = Beprobungszeitpunkt, d = Tag, ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay, IL = Interleukin, K = Kontrollgruppe, MAP = *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, PCR = Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction), RT = reverse transkription, V = Versuchsgruppe



mit verschiedenen Substanzen restimuliert, inkubiert und anschließend mittels ELISA die IFN- $\gamma$ - und IL-10-Gehalte in den Kulturüberständen bestimmt.

Zum vierten, siebten und zehnten BZP wurden rekombinant hergestellte MAP-Proteine auf ihre Fähigkeit getestet, PBMC zu restimulieren. Zum dritten, sechsten, neunten und elften BZP wurden nach der Restimulation auch PBMC selbst gewonnen. Die in ihnen enthaltene RNA wurde isoliert, transkribiert und die Expression der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und IL-12p40 in einer relativen RT-real-time PCR bestimmt.

Weiterhin wurden die Tiere von einer Mitarbeiterin des Instituts für Molekulare Pathogenese täglich klinisch untersucht. Nach Abschluss des Versuchs fand eine Sektion aller Tiere statt. Es wurden nach einem festen Schema Proben zur histologischen Untersuchung, für den immunhistochemischen Mykobakteriennachweis und für die Anzüchtung von MAP aus Gewebeproben entnommen. Ein Teil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde in die vorliegende Arbeit aufgenommen, so dass im Folgenden auch kurz auf die dort verwendeten Methoden eingegangen wird.

#### 4.1.3.4 Gewinnung von Kotproben und Untersuchung auf MAP

Die Kotproben wurden manuell aus dem After der Lämmer entnommen oder während des spontanen Absetzens aufgefangen, zunächst in eine Petrischale mit Deckel verbracht und außerhalb der Tierräume in ein Stuhlgefäß umgefüllt.

Die Anzüchtung von MAP aus dem Kot erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Mykobakterien des Instituts für molekulare Pathogenese, FLI, Jena nach einer institutsinternen LAA, deren Inhalte auf der Methodensammlung des Arbeitskreises für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft und den Grundsätzen der OIE beruhen.

Es wurden pro Probe jeweils 3 g Kot für 48 h mit 30 ml 0,75 %iger Hexapyridiniumchlorid-Lösung inkubiert und anschließend auf vier Kulturröhrchen mit Herrold's Egg Yolk Medium mit Mycobactin verimpft. Für ein gleichmäßiges Wachstum wurden die Röhrchen zunächst für sieben Tage in Schräglage bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet, anschließend aufrecht gestellt und insgesamt sechs Monate bebrütet. Alle zwei Wochen erfolgte eine visuelle Wachstumskontrolle. Der Zeitpunkt des Nachweises sichtbarer Kolonien sowie die Intensität des Wachstums wurden wie folgt aufgezeichnet:

1-20 Kolonien	= Angabe der Koloniezahl, Score 1
21-50 Kolonien	= 20-50 Kolonien, Score 2
51-100 Kolonien	= 50-100 Kolonien, Score 3
Mehr als 100 Kolonien	= Score 4
Zeitpunkt des ersten Nachweises	= Wochen <i>p. i.</i>

Aus diesen Daten wurde ein Wachstumsindex (WI) pro Röhrchen nach folgender Formel berechnet:

(1.2)

$$WI = \frac{Score \times 100}{Wochen \text{ p.i.}}$$

Der WI aller vier Röhrchen wurde gemittelt. Von verdächtigen Kulturen wurde eine molekularbiologische Spezifizierung mittels IS900- und IS1245-PCR durchgeführt (Kapitel 4.1.3.2).

#### 4.1.3.5 Gewinnung von Blut und Serum

Für die entsprechenden Ziegen wurde am Vortag der Blutentnahme eine 20 ml-Kunststoffspritze mit 2 ml der Natrium-Heparin-Gebrauchslösung befüllt, so dass sich eine Konzentration von 75 Internationalen Einheiten (IE)/ml Blut ergab. Auf die Spritzen wurde ein Membran-Adapter aufgesetzt und mit Alufolie umwickelt. Die Spritzen wurden mit den Tiernummern beschriftet, in ein steriles Becherglas verbracht, dieses mit Alufolie verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Mit einer Flügelkanüle wurde die *Vena jugularis* der Ziegen punktiert und je 20 ml Vollblut gewonnen. Zusätzlich wurden 9 ml Blut mit einer S-Monovette<sup>®</sup> entnommen.

#### 4.1.3.6 PBMC-Isolierung und deren Re-Stimulation

##### 4.1.3.6.1 Vorbereitungen

In je ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pro Tier wurden 20 ml LSM<sup>®</sup> vorgelegt. Die Röhrchen wurden steril verschlossen. In weitere zehn Röhrchen wurden jeweils 10 ml Hanks-Puffer ohne Kalzium-II-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) und Magnesium-II-Ionen (Mg<sup>2+</sup>) vorgelegt.

In sterile 96-Well-Mikrotestplatten wurden verschiedene Restimulantien in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen vorgelegt. Die Verdünnung erfolgte in 100 µl Zellkulturmedium/Well. Als mykobakterielle Restimulantien wurden jPPD in Konzentrationen von 4 µg/ml und 25 µg/ml und aPPD in Konzentrationen von 125 IE/ml und 625 IE/ml eingesetzt. Zur Überprüfung der Restimulierbarkeit der PBMC wurden ConA (20 µg/ml) und ab dem zweiten BZP SEB (4 µg/ml) als Positivkontrollen verwendet. Alle Restimulationen wurden im Vergleich zu unstimulierten Zellen durchgeführt.

In einigen Probenansätzen wurde IL-10 durch den spezifischen Mouse anti bovine Interleukin-10: Low Endotoxin-Antikörper (*cell clone* CC320) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml neutralisiert. Um die Spezifität dieses Antikörpers zu verifizieren, wurde weiteren Proben der Mouse IgG1 Negative Control: Low Endotoxin-Antikörper (2,5 µg/ml, Immunglobulin-G-(IgG)-Isotyp-Kontrolle) zugefügt.

Weiterhin wurden die vier rekombinant hergestellten MAP-Proteine MAP1272c, MAP1204, MAP2077e und MAP3481 in einer Konzentration von 5 µg/ml zu den in Kapitel 4.1.3.3 angegebenen BZP als PBMC-Restimulantien eingesetzt. Um die spätere Überstandsgewinnung, die für beide Zytokine zu je einem anderen Zeitpunkt erfolgte, zu erleichtern, wurden jeweils zwei verschiedene Mikrottestplatten belegt.

#### 4.1.3.6.2 PBMC-Isolation

Die mit Vollblut gefüllten Spritzen wurden äußerlich mit 70 %igem 2-Propanol desinfiziert. Unter der Sicherheitswerkbank wurde das Blut auf das LSM<sup>®</sup> überschichtet, die Röhren verschlossen und bei  $1400 \times g$  für 30 min zentrifugiert. Der entstandene PBMC-Saum wurde mit einer 1000 µl-Kolbenhub-Pipette geerntet und in den vorgelegten Hanks-Puffer ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  verbracht. Anschließend wurde bei  $350 \times g$  für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Dann wurde das entstandene Zellpellet mit weiteren 10 ml Hanks-Puffer ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  und einer 10 ml Glasmesspipette resuspendiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min schloss sich an. Der eben beschriebene Waschschritt wurde wiederholt, der entstandene Überstand wurde vorsichtig in ein Becherglas abgeschüttet. Danach wurde das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

Zur Einstellung der Zellzahl wurde zunächst eine Vital-Färbung angefertigt. Dazu wurden aus jedem Röhren 10 µl Zellsuspension entnommen und in einem Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit 90 µl Hanks-Puffer ohne  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  verdünnt. In einem weiteren Well wurden 50 µl dieser Zelllösung mit 50 µl Trypan-Blau vermischt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde befüllt und bei 100facher Vergrößerung die lebenden PBMC ( $z$ ) in vier Quadranten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Aus dem erhaltenen Wert wurde die Zellzahl pro Milliliter ( $r$ ) nach der Formel:

(1.3 a)

$$r = \frac{z}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times \text{Kammervolumen} \times \text{Verdünnungsstufe}$$

bzw.

(1.3 b)

$$r = \frac{z}{4} \times 10^4 \times 20$$

ermittelt und anschließend die Einstellung auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Glaszentrifugenröhren mit Zellkulturmedium vorgenommen.

Pro Tier wurden je Stimulans drei Wells mit jeweils 100 µl eingestellter Zellsuspension befüllt. Für beide Zytokinbestimmungen wurden unter Berücksichtigung von Volumenverlusten beim Umschütten und Pipettieren insgesamt 7 ml eingestellter Zellsuspension pro Tier angesetzt. Die zu pipettierenden Milliliter Ursprungssuspension ( $y$ ) und Medium ( $u$ ) pro Tier sind wie folgt berechnet worden:

(1.4)

$$y = \frac{7 \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen}}{r}$$

$$u = 7 - y$$

Die eingestellte Zellsuspension wurde in sterile Petrischalen umgeschüttet und mit einer 1200 µl-Achtkanalpipette auspipettiert. Die Platten wurden steril abgedeckt und in einer Kunststoffkammer mit umlaufender Lüftung bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert.

#### 4.1.3.6.3 Gewinnung der Zellkulturüberstände und Probenlagerung

Die Überstände in denen IFN-γ bestimmt werden sollte, wurden 24 h nach der Zugabe der Zellsuspension zu den Restimulantien gewonnen, die zur Bestimmung von IL-10 nach 64 h. Damit sich die Zellen am Plattenboden absetzen, wurden die Mikrottestplatten zunächst bei 350 × g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 150 µl Überstand aus den Wells abgenommen und zu jeweils 75 µl auf zwei 96-Well-Mikrotiter-Platten (Platten a) und b)) dispensiert. Die Platte a) wurde für den ELISA verwendet, Platte b) stand für eventuelle Wiederholungsuntersuchungen zur Verfügung. Die Platten wurden mit sterilen Folien abgedeckt und bei -20 °C gelagert.

#### 4.1.3.7 Zytokinbestimmung auf Gen-Ebene mittels relativer real-time RT-PCR

##### 4.1.3.7.1 Gewinnung von RNA aus PBMC

Zu den entsprechenden unter Kapitel 4.1.3.3 aufgeführten BZP wurden zusätzliche Zellrestimulationen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um PBMC für die Ribonukleinsäureisolation (*ribonucleic acid*, RNA) zu gewinnen. Es wurden dazu je 100 µl Restimulantien-Vorverdünnung in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben und mit je 1 ml auf 2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellter PBMC-Suspension versetzt. Die Konzentrationen der Restimulationen entsprechen denen in Kapitel 4.1.3.6.1. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Zellsuspension aus je einem Well in je ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert. Im Well der 24Well-Platte verbliebene Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit abgeschwemmt und lysiert. Nach der Zentrifugation wurde das überständige Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Der Lysepuffer aus dementsprechenden Well der Platte wurde auf das entstandene Zellpellet gegeben. Durch auf- und abpipettieren wurden die Zellen resuspendiert und aufgeschlossen. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und die Proben bei -80 °C eingefroren. Die weitere Bearbeitung der Proben fand unter PCR-Hauben statt.

Nach dem Auftauen erfolgte die RNA-Isolation nach den Herstellerangaben mit dem RNeasy Mini-Kit. Nach dem angegebenen ersten Waschschrift wurde zusätzlich ein

DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 80 µl einer 1 : 7 in RNase freiem Wasser verdünnten DNase Lösung aus dem RNase-Free DNase Set zum Nukleinsäurengemisch pipettiert und 30 min inkubiert. Außerdem erfolgte die Trocknung der Silikagel-Membran abweichend vom Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kits durch zwei Zentrifugationsschritte. Die erste Zentrifugation dauerte 1 min, die zweite doppelt so lange. Zum Abschluss wurde das die isolierte RNA enthaltende Wasser auf zwei Reaktionsgefäße zu je 25 µl aufgeteilt und auf Eis gestellt.

Um die Ergebnisse der späteren real-time PCR direkt vergleichen zu können, musste der RNA-Gehalt der Proben standardisiert werden. Deshalb war es notwendig, die RNA-Konzentration und ihre Reinheit in den einzelnen Proben zu bestimmen. Dies erfolgte unter Verwendung von 1 µl der RNA-Lösung bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm im Vergleich zu Aqua dest. im Nano-Drop.

Die ND-1000-Software bestimmt zunächst die Absorption der Probe nach der Formel

$$Absorption = - \log \frac{Intensität\ der\ Probe}{Intensität\ des\ Nullwerts}$$

(1.5)

*Quelle: Bedienungsanleitung des ND-1000 Spektralphotometer*

Danach wird auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes die RNA-Konzentration in der Probe berechnet. Um die Nukleinsäurekonzentration in ng/µl angeben zu können, muss der Extinktionskoeffizient in der Einheit ng × cm/ml in die Formel eingegeben werden. Deshalb verwendet die Software hier eine modifizierte Formel:

(1.6)

$$c = \frac{A \times e}{b}$$

*c: Nukleinsäurekonzentration (ng/ml)*

*A: Absorption in Absorptionseinheiten (A)*

*e: Wellenlänge-abhängiger molarer Extinktionskoeffizient (ng×cm/µl)*

*b: Lichtweg (cm)*

*Quelle: Bedienungsanleitung des ND-1000 Spektralphotometer*

Anhand des vom Gerät berechneten Quotienten aus den gemessenen Wellenlängen 260/ 280 kann auf die Reinheit der RNA geschlossen werden. Reine RNA soll einen Quotienten von 2,0 zeigen. Die RNA-Menge und ihre Reinheit wurden dokumentiert und die Proben bei -80 °C eingefroren.

## 4.1.3.7.2 Reverse Transkription (RT)

Bei diesem Schritt wurde der RNA-Gehalt auf 25 ng/μl eingestellt. Da man davon ausgeht, dass 100 % der RNA umgeschrieben werden, entspricht dies gleichzeitig der bei der PCR verwendeten cDNA-Konzentration. Die Berechnung der dazu umzuschreibenden RNA-Menge erfolgte nach folgenden Formeln:

(1.7 a)

$$i = \frac{p}{f} \times h$$

(1.7 b)

$$l = j - k$$

(1.7 c)

$$n = l - i$$

*f*: gemessener RNA Gehalt (ng/μl)

*i*: zu pipettierende RNA-Menge (μl)

*j*: Gesamtansatzvolumen pro Reaktionsgefäß (20 μl)

*k*: Gesamtansatzvolumen des Mastermixes pro Reaktionsgefäß (7,25 μl)

*l*: Volumen der Differenz zum Gesamtansatz pro Reaktionsgefäß (12,75 μl)

*n*: Volumen des zu pipettierenden Wassers (μl)

*p*: 25 μl RNA-Lösung

*h*: Menge umzuschreibender RNA pro Gesamtansatzvolumen in einem Reaktionsgefäß (4 μg)

Zunächst wurde der Mastermix aus den Bestandteilen des Omniscript-Kits in separate 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Zusätzlich zu den vom Hersteller vorgesehenen Komponenten wurden ein Ribonuklease-Hemmer und die Random Hexamers hinzugefügt.

Danach wurden die errechneten Mengen Wasser und RNA-Probe in 0,2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Die sich anschließende Denaturierung der RNA fand für 5 min bei 65 °C im Thermoheizblock statt. Währenddessen wurden die Reverse Transkriptase zum Mastermix und dann 7,25 μl dieser Lösung zu jeder Probe pipettiert. Die Reverse Transkription schloss sich für eine Stunde bei 37 °C an. Dann wurde die Reverse Transkriptase für 5 min bei 93 °C inaktiviert. Die nun hergestellte kopierte (*copy*, cDNA) wurde bei -20 °C eingefroren. Pro Tier wurde eine Probe ohne RNA (*reverse transcription non template control*, RTNTC) mitgeführt. Pro Stimulans war außerdem eine Kontrolle angelegt worden, die keine Reverse Transkriptase enthielt (RTK).

#### 4.1.3.7.3 Relative quantitative real-time PCR

Die PCR wurde nach einer institutsinternen LAA des FLI durchgeführt. Die Proben, die zum zweiten der vier BZP gewonnen worden waren, wurden von Frau Beate Appelt bearbeitet. Ihre Ergebnisse wurden in diese Untersuchungen mit einbezogen (Appelt, unveröffentlicht).

Je Zytokin wurden eine NTC (*non template control*) als Doppelbestimmung und pro Platte eine der RTK's und eine RTNTC aus der RT als Einfachbestimmung mitgeführt. Pro Tiergruppe waren vorher vier Tiere anhand der Ergebnisse des IFN- $\gamma$ -ELISAs und RT-real-time PCR von Proben des zweiten BZP ausgewählt worden. Es wurden nur die Proben verwendet, die unstimuliert waren und solche, die mit jPPD 4  $\mu$ g/ml, aPPD 125 IE/ml und SEB 4  $\mu$ g/ml restimuliert worden waren.

Als erstes wurde das Wasser in die Reaktionsgefäße pipettiert, dann je 40  $\mu$ l Mastermix. Die aufgetauten Primer-Vorverdünnungen wurden in die Reaktionsgefäße gegeben, diese verschlossen und die PCR-Haube gewechselt. Von der cDNA wurden jeweils 1,6  $\mu$ l in das Mastermix-Wasser-Gemisch pipettiert, die Reaktionsgefäße gevortext und 10 sec abzentrifugiert. Dann wurden pro Well 25  $\mu$ l der Proben als Doppelbestimmung auf die real-time-Platte übertragen. Die Platten wurden mit Folie luftdicht abgedeckt, in das real-time PCR-Gerät verbracht, die Plattenbelegung, die zu bestimmenden Zytokine, sowie das Probenvolumen programmiert und die Messung gestartet. Anschließend wurde eine Schmelzkurve angefertigt, um die Spezifität der Reaktionen zu prüfen. Unspezifisch reagierende Proben und solche, die positive Negativkontrollen aufwiesen, wurden in einer zweiten real-time PCR wiederholt analysiert. Im Zweifelsfall erfolgte vorher eine erneute RT der entsprechenden RNA.

#### 4.1.3.8 Zytokinbestimmungen auf Proteinebene mittels hauseigener ELISAs

Die einzelnen Arbeitsschritte für die Bestimmung von IL-10 bzw. IFN- $\gamma$  sind identisch, so dass die Beschreibung der Methode für beide Zytokine gemeinsam im Anhang erfolgt (Kapitel 10.1, Tab. 10.13). Vor der Zytokinbestimmung wurden die Nunc Maxisorp F96-Well-Platten entsprechend der ersten beiden Arbeitsschritte vorbereitet. Dies und der eigentliche ELISA fanden an unterschiedlichen Tagen statt. Deshalb wurden die Nunc Maxisorp F96-Well-Platten nach dem zweiten Waschschrift mit Abdeckfolien versehen und bei -20 °C eingefroren. Pro ELISA wurden Überstände von zwei bzw. für die IL-10-Bestimmung von vier BZP zusammengefasst.

Nach dem Auftauen der 96-Well-Mikrotiter-Platten und der Nunc Maxisorp F96-Well-Platten wurde eine Standardverdünnungsreihe angelegt. Dazu wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß, das die höchste IFN- $\gamma$ -Konzentration von 9,167 ng/ml enthalten sollte, 580  $\mu$ l Medium und 20  $\mu$ l Standardlösung vorgelegt. Pro Verdünnungsstufe wurden in je ein weiteres Reaktionsgefäß 400  $\mu$ l Medium gegeben. Anschließend wurden, vom ersten Gefäß aus beginnend, mit einer Kolbenhubpipette jeweils 200  $\mu$ l der vorherigen Verdünnungsstufe entnommen und in das nächste Reaktionsgefäß eingefüllt, so dass

sieben Verdünnungen in 3er-Stufen entstanden. Danach wurden jeweils 50 µl der einzelnen Verdünnungsstufen in zwei Wells der der Nunc Maxisorp F96-Well-Platten gefüllt.

Die Herstellung der Standardverdünnungsreihe für die Bestimmung von IL-10 erfolgte analog. Die Konzentration im ersten Reaktionsgefäß wurde auf 30 U/ml eingestellt. Es enthielt also 595,91 µl Medium und 4,09 µl Standardlösung, was einer Anfangsverdünnung von 1 : 100 entsprach. Alle weiteren Stufen erfolgten wiederum in Dreier-Schritten.

Als Leerwert für den ELISA wurde für beide Zytokine komplettes Zellkulturmedium verwendet und in Doppelbestimmung aufgetragen.

Um eine Validierung der beiden *in-house* ELISAs zu ermöglichen, wurde ein Zellkulturüberstand von mit ConA-behandelten PBMC gesunder, adulter Ziegen als Positivkontrolle in Zweifachbestimmung mitgeführt. Der Überstand für die Bestimmung von IFN- $\gamma$  wurde nach 24 h, der für die IL-10-Bestimmung nach 64 h Zellstimulation abgenommen. Zur Verdünnung des Standards, der Proben und der Kontrollen wurde das Medium verwendet, mit dem die Proben angesetzt worden waren.

Zum Waschen der Platten wurde Waschpuffer in das entsprechende Gefäß des Skatron Plattenwashers Modell 12201 gefüllt. Nach der Spülung aller Leitungen mit 10 %igem 2-Propanol wurde das Gerät mit Waschpuffer kalibriert. Dann wurde jede Platte sechs Mal mit je 300 µl Puffer/Well gewaschen. Zwischen die Waschschritte wurde eine Aspirationsphase von 2 sec geschaltet. Am Ende des Waschvorganges wurde der in den Wells der Platte befindliche Puffer 6 sec lang abgesaugt. Anschließend wurden die Platten per Hand auf Zellstoff ausgeklopft.

Nach Zugabe der Stopplösung wurde innerhalb von 30 min im Photometer "Spectra-Fluor" die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Auf letztere musste ab der 24. Woche *p. i* aufgrund eines Messgerädefektes bei der IL-10-Bestimmung verzichtet werden. Mittels der Photometer-Software "Tecan easyWIN fitting" wurde nach der Messung die optische Dichte (OD) anhand der Standardkurve in die entsprechende Zytokinkonzentration umgerechnet, diese um den Leerwert korrigiert, die drei Einzelwerte gemittelt sowie die Standardabweichung berechnet. Die Daten wurden in eine Excel-Tabelle exportiert.

Proben, die IFN- $\gamma$ - bzw. IL-10-Konzentrationen aufwiesen, die die maximal vom Gerät detektierbare OD überstiegen, wurden in einem erneuten ELISA 1 : 2 oder höher im Zellkulturmedium vorverdünnt. Für diese Wiederholungsuntersuchungen wurden die Überstände der Reserveplatte b) genutzt.



#### **4.1.3.9 Antikörperbestimmung mittels eines kommerziellen ELISA-Testsystems**

Die Antikörperbestimmung mit einem kommerziellen ELISA-Testsystem wurde von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Mykobakterien des Instituts für molekulare Pathogenese, FLI, Jena durchgeführt.

Nach der Zentrifugation des Blutes in den Monovetten ( $2000 \times g$  für 30 min), wurde je 1 ml Serum mit einer Kolbenhubpipette in Deepwellplatten überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach dem Auftauen wurde nach den Herstellerangaben eine Bestimmung der MAP-Antikörperkonzentration durchgeführt und ausgewertet. Die vorgegebenen Inkubationszeiten zwischen den einzelnen Schritten waren variabel; es wurde die kürzeste Zeit gewählt. Die Substratinkubation wurde jeweils auf 5 min begrenzt, um den Messbereich des Gerätes für die OD nicht zu überschreiten und gültige Messwerte zu erhalten. Die Messung der OD und die anschließende Berechnung des Verhältnisses zwischen der Antikörperkonzentration in der Probe und der Antikörperkonzentration in der Positivkontrolle erfolgten am Photometer „Spectra Fluor“. Alle Ergebnisse wurden quantitativ und qualitativ in tabellarischer Form erfasst.

#### **4.1.4 Weitere im Rahmen der Etablierung des Tiermodells durchgeführte Untersuchungen**

##### **4.1.4.1 Pathologische Untersuchung und Untersuchung von Gewebeproben auf MAP**

Nach Versuchsende wurden die Tiere einzeln euthanasiert und einer pathologischen Untersuchung zugeführt (Meyer 2011). Makroskopisch sichtbare Abweichungen vom physiologischen Zustand der Organe wurden unter besonderer Berücksichtigung der Beschaffenheit, der Dicke, des Reliefs und sonstiger Veränderungen der Darmschleimhaut und der Beschaffenheit PP dokumentiert.

Insgesamt wurden 36 Lokalisationen für die weiterführenden Untersuchungen beprobt (Kapitel 10.1, Tab. 10.15), wobei der Magen-Darm-Trakt und die dazu gehörigen Lymphknoten des Darmes die Schwerpunkte der Probenentnahme darstellten. Alle anderen entnommenen Proben wurden als „externe Organe“ definiert. Die Befundung der Organe erfolgte nach einem festen Schlüssel (modifiziert nach Meyer 2011, Kapitel 10.1, Tab. 10.14).

Das für die histologische Untersuchung gewonnene Gewebe wurde direkt nach der aseptischen Entnahme in neutral gepuffertes Formalin gelegt. Proben der Darmschleimhaut und der PP, die einer immunhistochemischen Beurteilung zugeführt werden sollten, wurden mit der Schleimhautoberfläche auf ein mit Nadeln auf einem Stück Styropor fixierten Stück Leber gelegt und in Methylbutan gekühlt, so dass sie auf der Leber festfroren. Anschließend wurden sie in Alufolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Proben anderer Organe wurden in Methylbutan

schockgefroren und anschließend in Alufolie verpackt. Das Gefäß mit Methylbutan befand sich in einem Behälter, der mit flüssigem Stickstoff befüllt war.

Von den Formalin-fixierten Proben wurde eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung angelegt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Präparate auf Zellinfiltrate und Erreger untersucht. Von den in Stickstoff fixierten Proben wurden Gefrierschnitte angefertigt und eine Immunhistologie mit einem MAP-spezifischen polyklonalen Antikörper durchgeführt. Bei unspezifischen Färbungen, bzw. wenn in der Immunhistologie eine spezifische Färbung vorhanden war, in der Hämatoxylin/Eosin-Färbung jedoch keine Infiltrate zu sehen waren, wurde ein Nachweis säurefester Stäbchen mit einer Ziehl-Neelsen-Färbung geführt.

#### **4.1.4.2 Anzüchtung von MAP aus Gewebeproben**

Die beprobten Lokalisationen für die Erregeranzüchtung sind in Kapitel 10.1, Tab. 10.15 dargestellt.

Nach dem Transport ins Labor wurden die Proben bis zur Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Organproben entsprechend einer institutsinternen LAA aufgearbeitet. Die anschließende Beimpfung der Nährböden, die Bebrütung und Befundung erfolgten analog Kapitel 4.1.3.4. Es wurde gleichzeitig Gewebematerial zur Herstellung von Abklatschpräparaten entnommen, von denen eine Acridinorange-Färbung zum Nachweis säurefester Stäbchen nach einer LAA des FLI angefertigt wurde. Bei Verdacht auf MAP-Wachstum wurden zum Nachweis von Mykobakterien eine Kinyoun-Färbung nach einer institutsinternen LAA und eine anschließende Speziesbestätigung mit den PCRs aus Kapitel 4.1.3.2 durchgeführt.

#### **4.1.4.3 Klinische Untersuchung**

Die Pfleger erhoben einmal täglich die Atmungsfrequenz und zwei Mal täglich die Rektaltemperatur der Ziegen. Außerdem wurden die Kotbeschaffenheit, das Vorhandensein von Nasen- oder Augenausfluss sowie Husten, der Appetit und das Allgemeinbefinden von den Pflegern beurteilt und in einem Score notiert. Von einem Tierarzt wurden werktags folgende Befunde erhoben:

- Herzfrequenz (Schläge/min)
- Haut- und Haarkleid (Score)
- Farbe der Maulschleimhaut und der Bindehaut (Score)
- Pansenkontraktionen (Anzahl x/min)
- Vorhandensein von Ödemen in der Unterhaut

#### 4.1.5 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurden in das Statistikprogramm PASW 17 exportiert und mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test darauf geprüft, ob eine Normalverteilung vorlag.

Zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen zwei Zytokinen innerhalb der einzelnen Tiergruppen wurde der Wilcoxon-Test zur Berechnung genutzt, da es sich um abhängige Stichproben handelte. Bei Vergleichen zwischen den Tiergruppen handelte es sich um unabhängige Stichproben, weshalb der U-Test nach Mann und Whitney angewendet wurde. Für Korrelationsberechnungen fand der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r) Anwendung. Die Art eines eventuell festgestellten Zusammenhangs wurde nach dem linearen Regressionsmodell berechnet. Die Evaluierung der Zytokin-ELISAs erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse im Programm Statgraphics +4.0.

Um Zusammenhänge der erhobenen Parameter der Immunreaktion mit den pathologischen Befunden und den Ergebnissen des Erregernachweises in Kot und Organen nachvollziehen zu können, wurden die Summenscores der immunhistochemischen Untersuchung für das Lymphatische System und den Magen-Darm-Trakt herangezogen. Die Versuchstiere wurden jeweils entsprechend der Scores für die Gewebeveränderungen an Darm und Lymphknoten des Darmes und denen des immunhistochemischen Mykobakteriennachweises in Darm und Lymphknoten neu gruppiert und die entsprechenden Parameter der Immunreaktion und der Ausscheidung von MAP mit dem Kot zwischen den Gruppen verglichen.

Bei den in den Abbildungen dargestellten Box-Whiskerplots stellt die Linie in der Box den Median dar. Die Box selbst umfasst den Datenbereich zwischen dem ersten und dem dritten Quartil. Die Whiskers stellen den kleinsten und größten Wert dar, sofern diese keine Extremwerte sind. Extremwerte die um mehr als drei Boxlängen außerhalb dieser liegen werden mit einer Raute gekennzeichnet, solche die um mehr als 1,5 Boxlängen außerhalb dieser liegen mit einem Kreis.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung des Tiermodells

#### 5.1.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Die Auswertung des Einflusses der Inokulation auf die klinischen Befunde ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen hinsichtlich des Allgemeinbefindens, des Auftretens erkrankungstypischer Veränderungen an Haut und Haarkleid sowie des Vorkommens von Ödemen in der Unterhaut und an den Gelenken. Auch bezüglich des Parameters „Augenausfluss“ unterschieden sich Kontroll- und Versuchsgruppen nicht. Gruppenunterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts wurden ebenfalls nicht festgestellt. Im Vergleich zur Gruppe K1 (früh) war die Rektaltemperatur in den Gruppen V1 und V2 (früh, hohe Dosis) in den Wochen 27 *p. i.* und 31 *p. i.* signifikant erhöht. In den Wochen 22 und 26 *p. i.* wurden signifikant höhere Rektaltemperaturen der Tiere aus den Gruppen V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) im Vergleich zu denen der Gruppe K2 (spät) gemessen. Zu den genannten Zeitpunkten herrschten außerhalb des Tierhauses Umgebungstemperaturen von über 30,0 °C.

Der Median der Herzfrequenz (Schläge/min) war in beiden früh inokulierten Tiergruppen gegenüber dem der Gruppe K1 (früh) in der 14., 22., 27., 31., 35., 40. und 49. Woche *p. i.* signifikant erhöht. Für die spät inokulierten Tiere der Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) wurde im Vergleich zu den Werten der Tiere aus der Gruppe K2 (spät) in der 17. Woche *p. i.* eine signifikant höhere Herzfrequenz nachgewiesen.

Ein Einfluss der Inokulation auf die Kotkonsistenz, die Verschmutzung des Afters und den Appetit der Ziegenlämmer war im Gruppenmittel statistisch ebenso wenig nachweisbar, wie auf die Befunde Husten, Atemfrequenz und Nasenausfluss. Allerdings trat bei zwei Tieren hochgradig Durchfall auf, der aus Tierschutzgründen zur Euthanasie der Tiere führte (Tab. 5.1).

Für die detaillierte Darstellung, Auswertung und Interpretation der einzelnen Befunde wird auf Meyer (2011) verwiesen.

#### 5.1.2 Ergebnisse der pathologischen, histologischen und immunhistologischen Untersuchungen

Die ausführliche Darstellung, Auswertung und Interpretation der Befunde der einzelnen entnommenen Gewebeproben findet sich in Meyer (2011). Eine Übersicht über die

Stärke und Verteilung der Veränderungen des Gewebes im Darm und in den entnommenen Lymphknoten sowie über den immunhistologischen Mykobakteriennachweis wird in Tab. 5.2 gegeben. Es wird zur besseren Orientierung darauf hingewiesen, dass „Veränderungen des Gewebes“ neben den morphologischen Befunden der makroskopischen und histologischen Untersuchung auch den immunhistologischen Mykobakteriennachweis einschließen.

Im Rahmen der pathologischen Untersuchung, der histologischen Beurteilung der Gewebeproben und des immunhistologischen Mykobakteriennachweises gelang bei keinem Kontrolltier ein Nachweis von Mykobakterien oder Paratuberkulose-typischer Veränderungen. Von den beprobten Darmabschnitten der Versuchstiere waren in keinem Fall das *Duodenum*, die *Ansa centralis*, das *Colon descendens* und das *Rectum* von Veränderungen betroffen (Meyer, 2011).

Ein Teil der Versuchstiere schied vorzeitig aus dem Versuch aus (Tab. 5.1). Um die Ergebnisse der pathologischen Untersuchung dieser Tiere mit nicht inokulierten Tieren vergleichen zu können, wurde 41 Wochen *p. i.* das Kontrolltier Nummer vier euthanasiert.

Tab. 5.1 Übersicht über die vorzeitig aus der Studie ausgeschiedenen Versuchstiere, ihren Todeszeitpunkt, die Todesursache und die Todesart

Nr.	Gruppe	Todeszeitpunkt (Wochen <i>p. i.</i> )	Todesursache	Todesart
14	V2 früh, hohe Dosis	40	ZNS-Symptome	verendet
15	V2 früh, hohe Dosis	40	Durchfall	Euthanasie
16	V2 früh, hohe Dosis	41	ZNS-Symptome	Euthanasie
17	V2 früh, hohe Dosis	42	ZNS-Symptome	verendet
33	V4 spät, hohe Dosis	40	Durchfall	Euthanasie

Erläuterungen: Nr. = Identifikationsnummer der Ziege, *p. i.* = *post inoculationem*,  
V = Versuchsgruppe, ZNS = Zentrales Nervensystem

Bei 23 Versuchstieren gelang kein immunhistologischer Mykobakteriennachweis aus dem Darmgewebe. War ein Nachweis möglich, waren die Bakterien mit einer Ausnahme (Score 2, Tier Nummer sieben) nur in geringer bis mittlerer Anzahl vorhanden (Score 1). Alle Tiere mit positivem Erregernachweis in den Darmproben wiesen Gewebeveränderungen vom Score 2 auf. Bei einem negativen

Mykobakteriennachweis traten mit Ausnahme der Tiere Nummer 15, 18 und 34 (Score 2) keine Veränderungen oder Läsionen des Scores 1 auf. Gewebeveränderungen vom Score 2 waren am häufigsten in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) feststellbar. In dieser Gruppe gelang in drei Fällen (43,85 %) ein Erregernachweis während dies in den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V3 (spät, geringe Dosis) bei keinem und in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) nur bei einem Tier (14,29 %) möglich war. Die Ausprägung der Gewebeveränderungen erwies sich in Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) als besonders homogen (Tab. 5.2).

In den Lymphknoten waren bei 74,07 % der Versuchstiere keine Mykobakterien nachweisbar. Sechzehn der 20 negativen Ziegen zeigten jedoch histologische Läsionen, die bis auf Ziege Nummer 32 (Score 1) dem Score 2 zuzuordnen waren. (Tab. 5.2). In beiden spät inokulierten Gruppen war nur bei einem (Gruppe V3, geringe Dosis) bzw. keinem Tier (Gruppe V4, spät, hohe Dosis) ein Mykobakteriennachweis möglich. Am häufigsten wurden in Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) Erreger nachgewiesen.

Bei 66,67 % der Versuchstiere waren morphologische Veränderungen im Gewebe des Darms und bei 59,26 % Läsionen in den Lymphknoten darstellbar, ohne dass ein immunhistologischer Erregernachweis gelang (Tab. 5.2). Weiterhin war zu beobachten, dass bei der Mehrheit der Fälle (17 Ziegen) sowohl Gewebeveränderungen im Darm als auch in den Lymphknoten auftraten, wobei die Scores der Darmveränderungen bei neun Tieren geringer ausfielen als die der Lymphknotenläsionen. Bei Tier Nummer 39 aus der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) war weder ein immunhistologischer Erregernachweis noch ein Nachweis von Gewebeveränderungen möglich.

### **5.1.3 Ergebnisse der kulturellen Anzüchtung von MAP aus Gewebeproben verschiedener Organe**

Für keines der Kontrolltiere gelang die MAP-Anzüchtung aus einer der beprobten Lokalisationen. Bei 20 Versuchstieren wurde in mindestens einer der entnommenen Proben am Darm ein MAP-Nachweis geführt. Am häufigsten wurde MAP aus Darmproben der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) isoliert. Hier waren 50,88 % der auswertbaren Proben positiv. Die geringste Nachweishäufigkeit trat in Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) auf (32,79 %). Von den Ziegen Nummer sieben (V1, früh, geringe Dosis), 31 (V3, spät, geringe Dosis) und 38 (V4, spät, hohe Dosis) war MAP mit jeweils einer Ausnahme aus allen Darmabschnitten isolierbar. Kein kultureller Erregernachweis aus Darmgewebe war bei je zwei Ziegen aus den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis, Nummer 8 und 10) und V3 (Nummer 30 und 32, spät, geringe Dosis) und jeweils einem Tier aus den Gruppen V2 (Nummer 20, früh, hohe Dosis) und V4 (Nummer 39, spät, hohe Dosis) möglich. Bei Tier 37 (V4) führte die Kontamination eines Großteils der Proben dazu, dass eine abschließende Aussage zum Vorhandensein des Erregers nicht möglich war.

Tab. 5.2 Pathologische Scores der Gewebeeränderungen und des immunhistologischen Mykobakteriennachweises in den entnommenen Proben aus Darm und Lymphknoten des Darmes für die einzelnen Ziegen

Tiergruppe	Tier- nummer	Score			
		Darm	Lnn.	Darm	Lnn.
		Veränderungen des Gewebes und Mykobakteriennachweis		immunhistologischer Mykobakterien- nachweis	
V1 früh geringe Dosis	7	2	2	2	2
	8	0	2	0	1
	9	2	2	1	1
	10	0	2	0	0
	11	2	2	1	1
	12	1	2	0	0
	13	1	0	0	0
V2 früh hohe Dosis	14	1	2	0	0
	15	2	2	0	1
	16	1	2	0	0
	17	1	2	0	0
	18	2	2	0	0
	19	0	2	0	0
	20	0	2	0	1
V3 spät geringe Dosis	27	1	2	0	0
	28	1	2	0	0
	29	1	2	0	0
	30	1	2	0	0
	31	1	2	0	0
	32	0	1	0	0
V4 spät hohe Dosis	33	1	0	0	0
	34	2	2	0	0
	35	2	2	1	0
	36	1	2	0	1
	37	0	2	0	0
	38	1	0	0	0
	39	0	0	0	0

Erläuterungen:

Zur Definition der Scores für die Gewebeeränderungen in Darm- und Lymphknoten sowie für den immunhistochemischen Mykobakteriennachweis in beiden Geweben siehe Kapitel 10.1 Tab. 10.14.

Erläuterungen: Lnn. = Lymphknoten (Pl.), V = Versuchsgruppe

Besonders häufig betroffene Lokalisationen waren in allen Gruppen das *Jejunum* und die *Ileocaecalklappe*. In beiden spät inokulierten Gruppen wurde der Erreger auch häufig aus den PP von *Jejunum* und *Colon* isoliert (Tab. 5.3).

Die WI der Ziegen aus den Versuchsgruppen wiesen Werte zwischen 1,19 und 100 auf, wobei Werte größer als 37,17 lediglich in Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) auftraten (Tab. 5.3).

Bei 22 der 27 Versuchstiere wurde MAP in mindestens einem der entnommenen Lymphknoten nachgewiesen. Dabei war der Anteil positiver Proben an allen auswertbaren Proben in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) mit 53,06 % am höchsten, in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) mit 34,69 % am geringsten. Am häufigsten wurde MAP aus dem *Lymphonodus (Ln.) ileocaecalis* und den *Lnn. jejunales* isoliert. Dabei fällt auf, dass MAP in 68,42 % der positiven Fälle in allen 3 Proben der *Lnn. jejunales* nachzuweisen war. Besonders auffällig ist dies in Gruppe V4 (spät, hohe Dosis). Bei 10,53 % war der Erreger in nur einer der drei beprobten *Lnn.* des *Jejunums* isolierbar (Tab. 5.4).

Während die Häufigkeit des Nachweises im *Ln. ileocaecalis* in den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) sowie den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) mit je fünf Tieren gleich ist, wurde MAP in diesem Lymphknoten von Tieren der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) nur in drei Fällen kultiviert. Von den nicht direkt zum Darm gehörenden Lymphknoten war die Nachweishäufigkeit im *Ln. hepaticus* am höchsten, im *Ln. cervicalis superficialis* war MAP nur in einem Fall nachweisbar. Bei je zwei Tieren aus den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) und einem Tier der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) war kein MAP-Nachweis in den Lymphknoten möglich.

Die berechneten WI wiesen Werte zwischen minimal 0,93 und maximal 50,0 auf (Tab. 5.4), wobei der maximale Wert in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) erreicht wurde.

Bei Ziege Nummer sieben (V1, früh, geringe Dosis) wurden außerdem aus Leber (WI = 16,67), der Milz (WI = 12,50), der Tonsille (WI = 26,04), der beprobten Niere (WI = 23,81), dem Zwerchfell (WI = 4,17) und der Oberschenkelmuskulatur (WI = 32,14) Erreger angezüchtet. Bei Tier Nummer elf (V1, früh, geringe Dosis) gelang der Erregernachweis in der Leber (WI = 22,87) und der Milz (WI = 11,46). Das Bakterium wurde aus der Tonsille (WI = 3,57) des Tieres Nummer 18 (V2, früh, hohe Dosis) isoliert. Bei den Tieren Nummer 31 (Gruppe V3, spät, geringe Dosis), 34 und 35 (Gruppe V4, spät, hohe Dosis) gelang es MAP in der Leber (WI = 12,5 bzw. 16,79 und 4,29) nachzuweisen.



Tab. 5.3 Kultureller MAP-Nachweis in den beprobten Lokalisationen des Darmes (WI).

Tier- gruppe	Tier- nummer	Beprobte Lokalisation								
		D	Ip	Id	J1	J2	J3	ICK	PPC	PPJ
K1 früh	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V1 früh, geringe Dosis	7	<b>25,00</b>	0,00	<b>20,14</b>	<b>4,21</b>	<b>6,25</b>	<b>20,14</b>	<b>21,53</b>	<b>21,53</b>	<b>12,50</b>
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	0,00	0,00
	9	x	<b>35,00</b>	<b>40,00</b>	<b>23,57</b>	<b>40,00</b>	<b>40,00</b>	<b>100,00</b>	x	<b>40,00</b>
	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	<b>7,50</b>	<b>25,00</b>	<b>26,25</b>	<b>20,00</b>	<b>38,75</b>	<b>18,75</b>	x	x	<b>19,38</b>
	12	x	0,00	0,00	0,00	<b>8,26</b>	0,00	<b>3,13</b>	0,00	0,00
	13	0,00	0,00	0,00	<b>16,67</b>	<b>16,67</b>	<b>25,00</b>	<b>22,22</b>	<b>2,78</b>	0,00
V2 früh, hohe Dosis	14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>1,85</b>	—
	15	0,00	<b>16,67</b>	<b>12,79</b>	<b>11,11</b>	0,00	<b>5,56</b>	<b>12,11</b>	0,00	<b>14,38</b>
	16	0,00	0,00	0,00	<b>1,67</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	17	0,00	0,00	0,00	0,00	x	0,00	<b>6,25</b>	0,00	0,00
	18	0,00	<b>11,11</b>	<b>26,39</b>	<b>16,67</b>	<b>20,83</b>	<b>20,83</b>	<b>16,67</b>	0,00	<b>20,83</b>
	19	0,00	0,00	<b>4,17</b>	<b>8,33</b>	0,00	0,00	0,00	<b>8,33</b>	<b>16,67</b>
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
K2 spät	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
V3 spät, geringe Dosis	27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>5,00</b>	x	x
	28	<b>2,50</b>	<b>2,17</b>	0,00	<b>8,33</b>	<b>8,33</b>	<b>7,50</b>	<b>9,33</b>	x	<b>8,33</b>
	29	0,00	0,00	<b>2,50</b>	<b>10,00</b>	0,00	0,00	<b>7,50</b>	<b>8,33</b>	<b>16,67</b>
	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	0,00
	31	0,00	<b>9,72</b>	<b>15,48</b>	<b>11,31</b>	<b>32,14</b>	<b>20,24</b>	<b>16,67</b>	<b>8,33</b>	<b>4,17</b>
	32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x
V4 spät, hohe Dosis	33	<b>3,33</b>	<b>10,00</b>	<b>8,33</b>	0,00	x	0,00	<b>14,35</b>	<b>10,00</b>	0,00
	34	<b>4,17</b>	0,00	<b>25,00</b>	<b>16,67</b>	<b>25,00</b>	<b>16,67</b>	<b>16,67</b>	<b>20,21</b>	<b>37,37</b>
	35	0,00	<b>23,81</b>	0,00	<b>33,33</b>	<b>35,71</b>	<b>5,00</b>	x	<b>1,19</b>	<b>16,67</b>
	36	0,00	0,00	0,00	<b>8,33</b>	<b>6,25</b>	0,00	0,00	<b>18,89</b>	<b>1,19</b>
	37	0,00	x	x	x	x	0,00	0,00	0,00	x
	38	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>19,09</b>	<b>8,33</b>	0,00	0,00	x
	39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Erläuterungen: x = Kontamination der Kultur, Auswertung nicht möglich, – = Probengewinnung nicht möglich, K = Kontrollgruppe, V = Versuchsgruppe, WI = Wachstumsindex

Lokalisationen der Probenentnahme: D = Duodenum, Ip = proximales Ileum, Id = distales Ileum, J1-3 = Jejunum (Proben 1-3), ICK = Ileocaecalklappe, PPC = Peyer'sche Platten des Colons, PPJ = Peyer'sche Platten des Jejunums

Tab. 5.4 Kultureller MAP-Nachweis in den beprobten Lokalisationen des lymphatischen Systems (WI).

Tier- gruppe	Tier- nummer	Beprobte Lokalisation						
		LnJ1	LnJ2	LnJ3	LnICK	LnH	LnCs	LnRP
<b>K1</b> früh	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>V1</b> früh, geringe Dosis	7	<b>3,26</b>	<b>12,50</b>	<b>25,00</b>	<b>37,50</b>	<b>25,00</b>	<b>15,63</b>	<b>10,42</b>
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	9	<b>20,00</b>	<b>50,00</b>	<b>40,00</b>	<b>40,00</b>	<b>13,93</b>	0,00	0,00
	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	<b>15,00</b>	<b>16,25</b>	<b>6,25</b>	<b>40,00</b>	<b>14,17</b>	0,00	0,00
	12	0,00	<b>4,96</b>	<b>6,75</b>	<b>6,25</b>	0,00	0,00	0,00
<b>V2</b> früh, hohe Dosis	13	<b>17,80</b>	<b>11,11</b>	0,00	<b>22,22</b>	0,00	0,00	0,00
	14	0,00	0,00	0,00	<b>7,50</b>	0,00	0,00	<b>5,26</b>
	15	<b>12,46</b>	<b>8,33</b>	<b>8,33</b>	0,00	<b>1,85</b>	0,00	0,00
	16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	17	0,00	0,00	<b>7,29</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
	18	<b>6,25</b>	<b>20,83</b>	<b>25,00</b>	<b>31,79</b>	<b>3,57</b>	0,00	<b>4,17</b>
<b>K2</b> spät	19	<b>8,33</b>	<b>8,33</b>	<b>8,33</b>	<b>8,33</b>	0,00	0,00	0,00
	20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>V3</b> spät, geringe Dosis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	27	0,00	<b>4,80</b>	<b>5,88</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
	28	<b>13,26</b>	<b>10,83</b>	<b>4,17</b>	<b>9,33</b>	0,00	0,00	0,00
	29	0,00	<b>2,50</b>	0,00	<b>8,69</b>	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	0,00	<b>2,00</b>	0,00	0,00	0,00
<b>V4</b> spät, hohe Dosis	31	<b>17,14</b>	<b>6,17</b>	<b>15,48</b>	<b>31,25</b>	<b>8,33</b>	0,00	0,00
	32	0,00	0,00	0,00	<b>8,63</b>	0,00	0,00	0,00
	33	<b>8,89</b>	<b>13,29</b>	<b>16,67</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
	34	<b>33,33</b>	<b>33,33</b>	<b>0,93</b>	<b>41,67</b>	<b>8,33</b>	0,00	<b>8,33</b>
	35	<b>35,00</b>	<b>30,00</b>	<b>35,00</b>	<b>40,00</b>	<b>22,50</b>	0,00	<b>7,94</b>
	36	<b>10,24</b>	<b>12,54</b>	<b>9,42</b>	<b>20,51</b>	0,00	0,00	0,00
<b>V4</b> spät, hohe Dosis	37	<b>5,00</b>	0,00	<b>18,75</b>	<b>15,83</b>	0,00	0,00	0,00
	38	<b>9,40</b>	<b>16,91</b>	<b>11,11</b>	<b>11,11</b>	0,00	0,00	0,00
	39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, Ln = Lymphknoten (Sing.), V = Versuchsgruppe

Lokalisationen Probenentnahme: J1-3 = Ln. jejunales (Proben 1-3), ICK = Ln. ileocaecalis, H = Ln. hepaticus, Cs = Ln. cervicalis superficialis, RP = Ln. retropharyngealis

#### 5.1.4 Ergebnisse der kulturellen Anzucht von MAP aus dem Kot

Bei keinem der Kontrolltiere wurde während des Versuchszeitraumes MAP im Kot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Bereits ab der ersten Woche nach Inokulationsbeginn wurde MAP mit dem Kot der Versuchstiere ausgeschieden. Der Nachweis gelang eine Woche *p. i.* bei 77,78 % (21 Ziegen), drei Wochen *p. i.* bei 92,59 % der Tiere (25 Ziegen). Vier Wochen *p. i.* ging die Anzahl der Ziegen, bei denen MAP im Kot nachweisbar war, auf 22,22 % (sechs Tiere) zurück. Zu diesem Zeitpunkt war die Inokulation seit einer Woche beendet. Ausscheidende Tiere gehörten mit einer Ausnahme stets zu den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis). Der entsprechende WI lag jeweils deutlich unter dem zu den getesteten BZP davor und danach. (Tab. 5.5). Acht und zwölf Wochen *p. i.* schieden alle Versuchstiere MAP im Kot aus. Eine Ausnahme stellte Ziege Nummer 18 aus der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) in der 8. Woche *p. i.* dar.

Im weiteren Versuchszeitraum ließen sich drei verschiedene Ausscheidungsprofile nachweisen: Insgesamt sechs Tiere schieden den Erreger kontinuierlich bis zum Versuchsende aus, wobei die Hälfte dieser Ziegen aus Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) stammte. Auffallend war, dass MAP bei diesen Tieren auch zum Sektionszeitpunkt anzüchtbar war, was nur bei drei weiteren Ziegen mit anderen Ausscheidungsprofilen gelang. In der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) schied keine Ziege den Erreger kontinuierlich aus (Tab. 5.5).

Im Kot von dreizehn Versuchstieren war MAP zunächst kontinuierlich anzüchtbar. Ab einem bestimmten, individuell verschiedenen BZP sistierte die Ausscheidung dann. Während in den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) bis V3 (spät, geringe Dosis) jeweils mindestens drei Tiere dieses Profil aufwiesen, traf dies in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) nur auf zwei Ziegen zu. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit schied keines der Tiere das Bakterium nach der 32. Woche *p. i.* aus (Tab. 5.5).

Ein drittes Ausscheidungsprofil wurde bei acht Tieren beobachtet, die MAP intermittierend ausschieden. Der größte Anteil innerhalb dieser Gruppe gehörte zur Versuchsgruppe V4 (drei Tiere, spät, hohe Dosis). Zum Sektionszeitpunkt ließ sich MAP lediglich bei den Tieren Nummer 13 und Nummer 19 aus dem Kot anzüchten (Tab. 5.5).

Die Tiere, die nicht bis zur 48. Woche *p. i.* im Versuch verblieben, wiesen mit Ausnahme von Ziege 33 (V4, spät, hohe Dosis) mindestens zum letzten BZP vor dem Ausscheiden aus der Studie keine Erregerausscheidung mehr auf (Tab. 5.5).

Tab. 5.5 Wachstumsindex (WI) nach der Anzüchtung von MAP aus Kotproben.

Tier-Gruppe	Nummer des Tieres	Wochen p. i.																Sektion
		0	1	2	3	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	
V1 früh, geringe Dosis	7	0,00	0,00	0,00	27,67	0,00	12,50	28,13	37,50	20,83	25,00	20,83	45,83	41,67	31,25	33,33	45,83	26,98
	8	0,00	0,00	0,00	18,75	0,00	21,25	12,50	15,63	31,25	22,92	25,00	10,42	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27
	9	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	17,92	15,00	11,46	16,67	13,89	16,67	6,25	5,00	18,75	19,17	20,83	9,92
	10	0,00	0,00	—	8,33	0,00	11,90	10,12	11,88	22,92	22,29	17,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	0,00	12,50	0,00	16,79	0,00	20,83	15,63	31,25	25,00	30,00	20,83	44,17	11,81	12,50	8,33	33,33	13,70
	12	0,00	0,00	8,33	0,00	0,00	10,83	8,33	21,46	22,92	23,96	31,25	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	13	0,00	60,00	0,00	9,90	0,00	22,29	14,58	4,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	4,17	9,38	5,77
V2 früh, hohe Dosis	14	0,00	10,00	0,00	41,67	8,33	14,58	22,92	22,92	2,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	x	0,00
	15	0,00	4,55	5,63	12,50	0,00	13,33	10,42	25,00	31,25	31,25	14,58	3,13	0,00	x	x	x	0,00
	16	0,00	7,41	0,00	33,33	0,00	14,58	2,50	0,00	0,00	0,00	—	0,00	0,00	0,00	x	x	0,00
	17	0,00	20,56	6,25	15,63	0,00	11,46	13,96	12,92	29,58	17,50	12,50	0,00	5,63	0,00	x	x	0,00
	18	0,00	36,46	—	8,33	0,00	0,00	6,67	7,29	19,79	20,95	33,33	33,33	45,83	42,50	45,83	33,33	5,36
	19	0,00	10,89	7,81	26,79	0,00	21,67	16,67	0,00	0,00	3,13	0,00	0,00	0,00	0,00	46,88	0,00	5,36
V3 spät, geringe Dosis	20	0,00	41,67	—	0,00	0,00	12,50	8,33	15,63	20,83	18,75	9,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	27	0,00	6,25	8,33	7,29	2,08	16,67	16,67	11,79	23,33	13,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	0,00
	28	0,00	10,00	11,46	10,86	0,00	11,46	14,06	16,56	31,25	25,00	12,50	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	29	0,00	—	0,00	10,83	0,00	16,67	10,42	14,58	22,02	36,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	15,63	12,50	3,13	2,50	7,29	2,08	11,46	0,00	12,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	31	0,00	12,50	8,33	9,79	6,25	14,58	12,92	9,47	6,25	0,00	0,00	6,25	10,00	2,08	2,50	4,17	0,00
V4 spät, hohe Dosis	32	0,00	6,25	9,47	15,54	0,00	4,06	5,45	10,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	33	0,00	10,42	12,50	15,00	0,00	12,50	12,20	12,08	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	x	x	x	0,00
	34	0,00	16,67	16,67	10,12	3,13	17,71	42,50	33,13	20,21	35,00	15,52	16,79	15,03	25,00	9,38	12,50	18,75
	35	0,00	10,42	0,00	14,58	0,00	17,50	22,92	25,00	18,75	45,83	37,50	16,67	19,79	33,33	15,63	18,75	37,50
	36	0,00	7,50	10,83	12,50	0,00	6,25	12,50	25,00	18,75	22,92	8,33	0,00	0,00	7,50	0,00	0,00	0,00
	37	0,00	12,50	6,25	12,50	0,00	12,92	12,65	9,17	13,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	38	0,00	9,38	21,25	13,96	0,00	13,75	14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,17	0,00
39	0,00	12,20	22,50	10,42	2,50	18,75	9,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Erläuterungen: p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

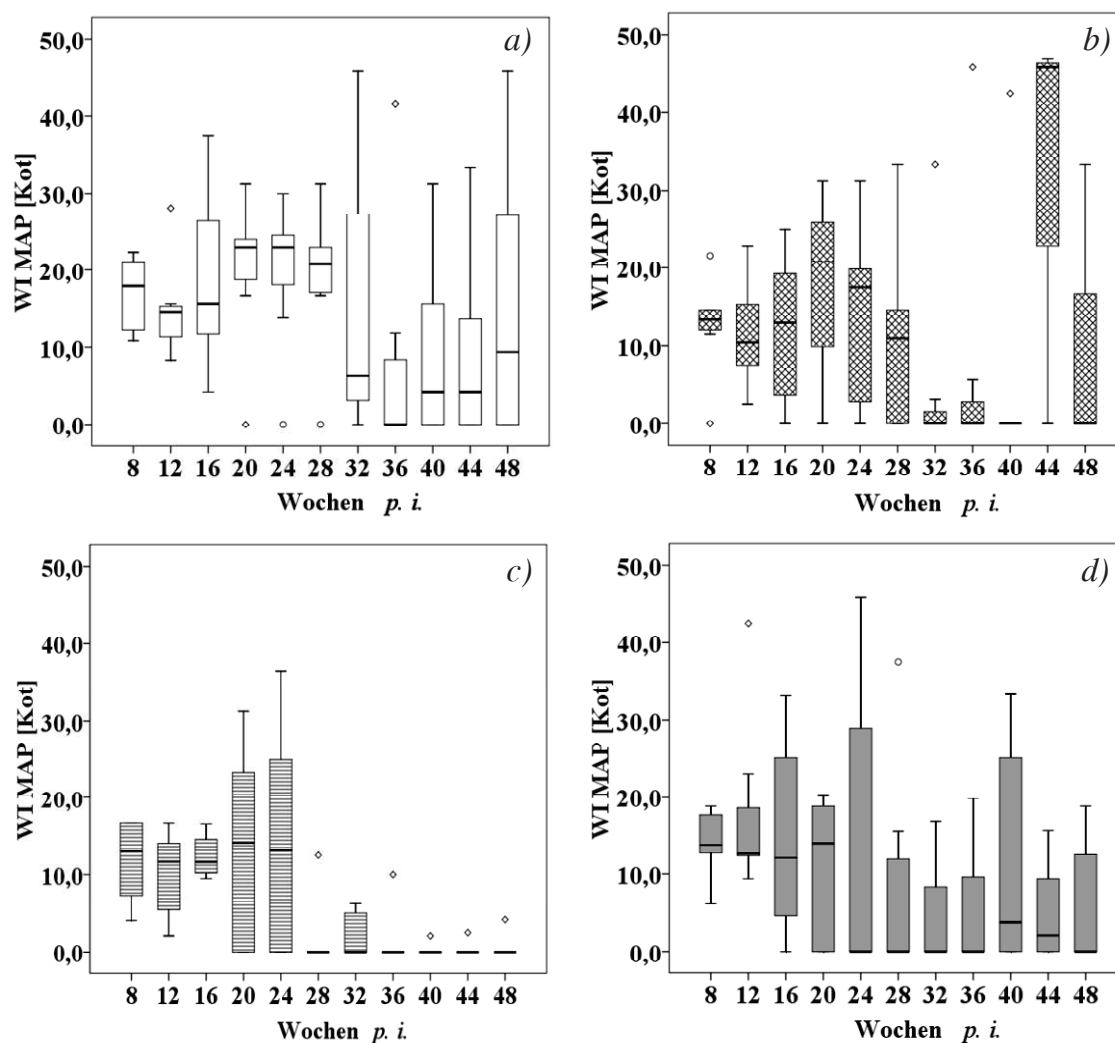


Abb. 5.1 Entwicklung der Ausscheidung von MAP im Kot über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind a) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) die Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) die Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) die Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: p. i. = post inoculationem, WI MAP [Kot] = Wachstumsindex von *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, Nachweis aus dem Kot

### 5.1.5 Angaben zur Messunsicherheit der *in-house*-ELISAs zur Bestimmung von IFN- $\gamma$ und IL-10

Zur Prüfung des IFN- $\gamma$ -ELISAs wurden die Zytokinkonzentrationen aus der Doppelbestimmung der Positivkontrolle insgesamt zwischen sechs verschiedenen Plattenbeschichtungsansätzen, zwischen 15 verschiedenen Untersuchungstagen und zwischen 140 verschiedenen 96-Well-Platten verglichen. Es lagen insgesamt 280 Messwerte vor.

Der Mittelwert der IFN- $\gamma$ -Konzentration aus den 280 Messungen betrug 1,56 ng/ml. Die Zytokinkonzentrationen der Platten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten beschichtet worden waren, schwankten um 0,14 ng/ml um das Gesamtmittel. Dies entspricht einem

Variationskoeffizienten ( $cv$ ) von 9,06 %. Zwischen den verschiedenen Untersuchungstagen lag die Standardabweichung ( $s$ ) ebenfalls bei 0,14 ng/ml und der dazugehörige  $cv$  bei 9,13 %. An einem Untersuchungstag betrug die Streuung zwischen den Mittelwerten der einzelnen Platten 0,13 ng/ml ( $cv$  von 8,23 %). Die Konzentrationen in den beiden Wells, die pro Platte mit der Positivkontrolle belegt worden waren, streuten mit 0,11 ng/ml ( $cv$  von 6,94 %) um den Mittelwert.

Zur Prüfung des IL-10-ELISAs wurde der restimierte PBMC-Überstand von sieben Untersuchungstagen auf 77 verschiedenen Platten untersucht, so dass 154 Messwerte vorlagen. Der Mittelwert der IL-10-Konzentration aller 154 Messungen betrug 1,61 U/ml. Zwischen den verschiedenen Untersuchungstagen lag die  $s$  bei 0,16 U/ml, der entsprechende  $cv$  bei 9,70 %. An einem Untersuchungstag betrug die Streuung zwischen den Mittelwerten der einzelnen Platten 0,37 U/ml ( $cv$  von 23,33 %). Die Konzentrationen in den beiden Wells, die pro Platte mit der Positivkontrolle belegt worden waren, streuten mit 0,42 U/ml ( $cv$  von 26,40 %) um den Mittelwert. Eine Untersuchung des Einflusses eines Beschichtungsansatzes von mehreren ELISA-Platten war aufgrund fehlender Dokumentation für den IL-10-ELISA nicht möglich.

### **5.1.6 Ergebnisse der Bestimmung von IFN- $\gamma$ und IL-10 auf Proteinebene mittels quantitativer *in-house*-ELISAs**

#### **5.1.6.1 Fähigkeit der PBMC zur Sekretion von IFN- $\gamma$ nach einer Restimulation mit ConA oder SEB**

Um beurteilen zu können, ob die isolierten Zellen über die Fähigkeit verfügten, restimulierbar zu sein, sollte zunächst die IFN- $\gamma$ -Sekretion nach der PBMC-Behandlung mit ConA bzw. SEB im Vergleich zu der unstimulierten Zellen betrachtet werden.

Unstimulierte Zellen bildeten in allen Versuchsgruppen mit im Mittel maximal 0,06 ng/ml im gesamten Versuchsverlauf nur geringe Mengen IFN- $\gamma$ ; z. T. war keine Sekretion nachweisbar (Abb. 5.3). Zwischen den Kontrollgruppen war lediglich 16 Wochen *p. i.* ein signifikanter Unterschied feststellbar (Abb. 5.2). Zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen traten überwiegend keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinsekretion auf.

In allen Tiergruppen bildeten Zellen, die mit ConA restimuliert worden waren, unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt im Mittel mehr IFN- $\gamma$  als unstimulierte PBMC. Dies zeigt sich auch in den Kontrollgruppen, wobei die Unterschiede in der Gruppe K2 (spät) häufiger signifikant waren (Abb. 5.2). Besonders früh waren die Differenzen in Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) nachweisbar (Abb. 5.3).

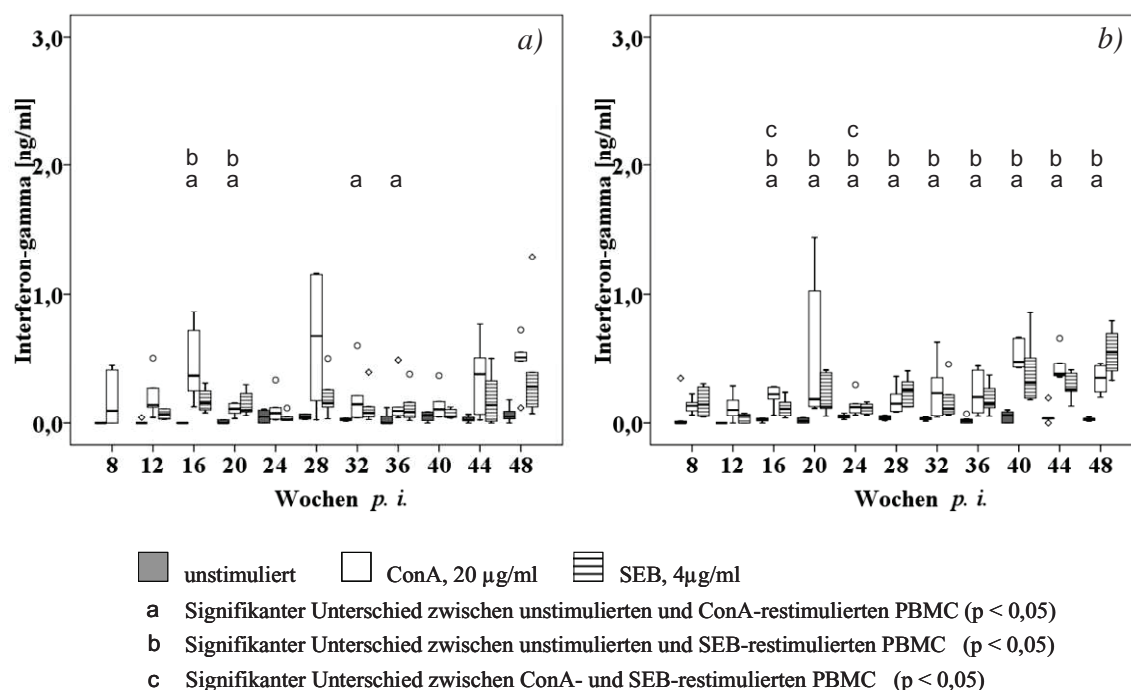


Abb. 5.2 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion der PBMC von Kontrolltieren (K). Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag) und b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells,  $p. i.$  = post inoculationem

Auch Zellen, die mit SEB restimuliert worden waren, bildeten zu allen BZP im Mittel mehr IFN- $\gamma$  als unstimulierte Zellen. Eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion restimulierter PBMC im Vergleich zu den unstimulierten Zellen trat überwiegend zu den BZP auf, an denen die Unterschiede auch nach einer Restimulation mit ConA statistisch nachweisbar waren (Abb. 5.2 und Abb. 5.3).

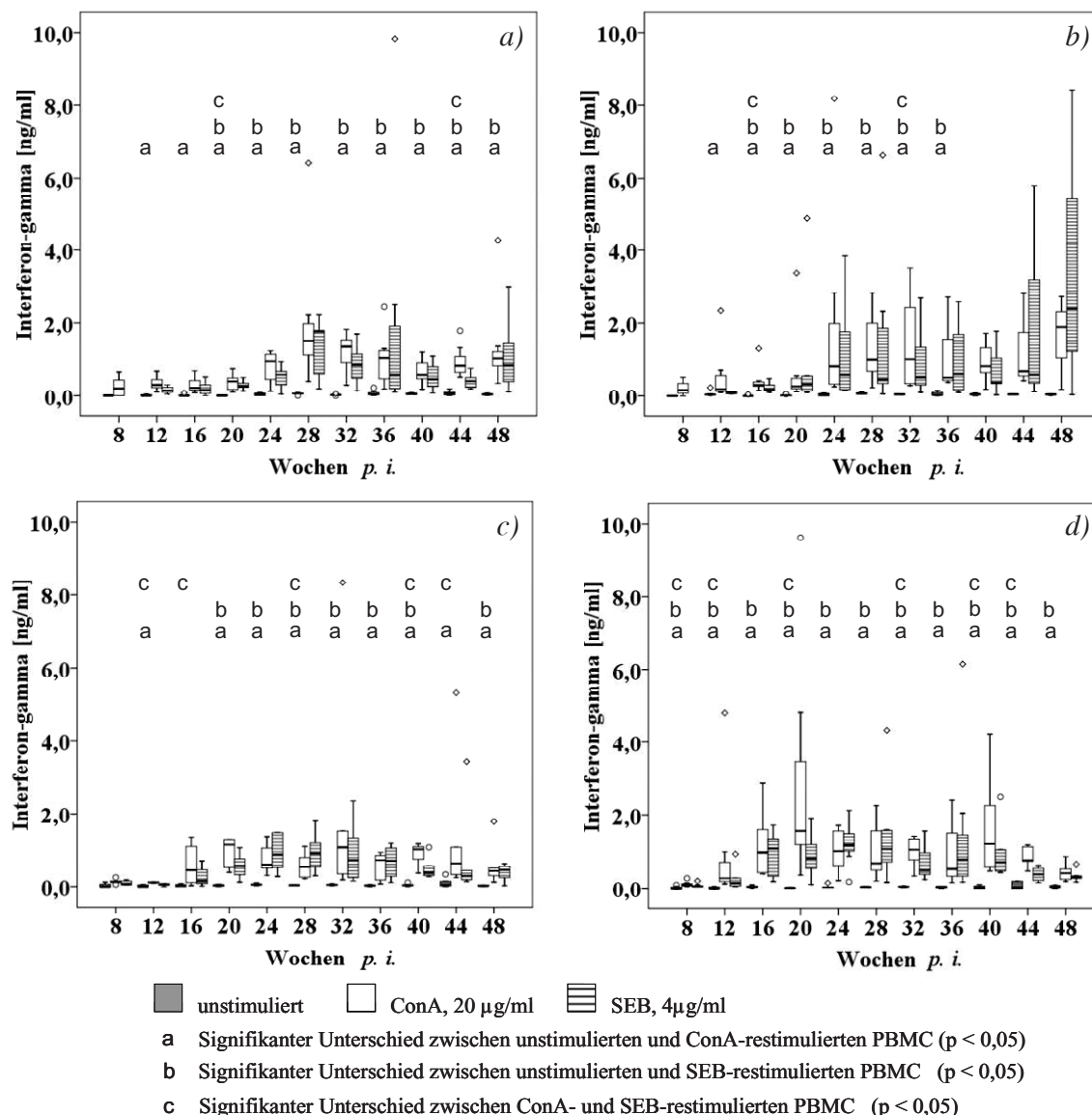


Abb. 5.3 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion der PBMC von MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells,  $p. i.$  = post inoculationem

Die Intensität der IFN- $\gamma$ -Reaktion gegenüber den beiden Positivkontrollen unterlag von der Gruppe und dem Zeitpunkt abhängigen Schwankungen, unterschied sich jedoch im Mittel nicht signifikant (Abb. 5.2 und Abb. 5.3).

Nach einer Restimulation mit ConA sezernierten Zellen der Versuchsgruppen mehr IFN- $\gamma$  als die der altersgleichen Kontrolltiere. PBMC beider früh inokulierten Gruppen bildeten ab der 20. Woche  $p. i.$  signifikant mehr IFN- $\gamma$ . Die Unterschiede waren bis zum Versuchsende (V1, geringe Dosis) bzw. bis zur 40. Woche  $p. i.$  (V2, hohe Dosis) signifikant (Abb. 5.4 und Abb. 5.5). Bei den spät inokulierten Tieren die eine geringere



Inokulationsdosis erhalten hatten, war eine weniger deutliche Reaktion feststellbar. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe traten in der Gruppe V3 (geringe Dosis) mit 24 Wochen *p. i.* deutlich später auf als in den anderen Versuchsgruppen und waren nur bis zur 32. Woche *p. i.* nachweisbar. In der Gruppe V4 (hohe Dosis) dagegen zeigten sich die Differenzen bereits in der 8. Woche *p. i.* und damit vier Wochen eher als in den übrigen Versuchsgruppen. Sie waren - wie in beiden früh inokulierten Gruppen - kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum nachvollziehbar (Abb. 5.5).

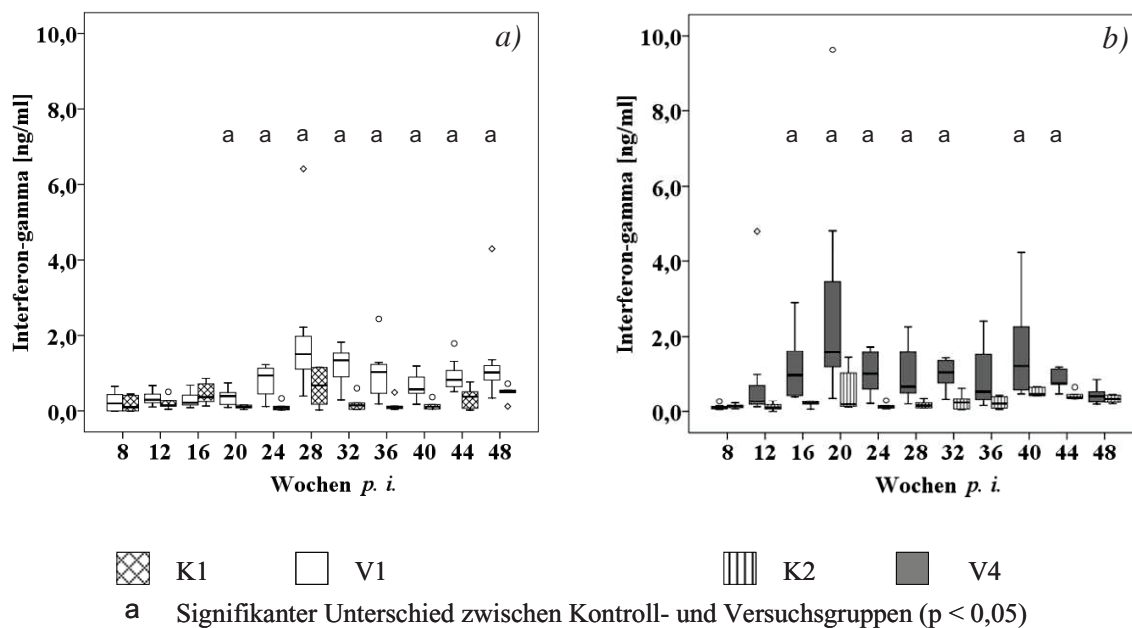


Abb. 5.4 Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit Concanavalin A, (20  $\mu$ g/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

Auch eine Restimulation mit SEB führte bei Zellen von inokulierten Tieren zu einer stärkeren Reaktion als bei Kontrolltieren. Die Unterschiede waren jedoch weniger häufig nachweisbar als nach einer Restimulation mit ConA (Abb. 5.5).

Wochen <i>p. i.</i>		8		12		16		20		24		28		32		36		40		44		48	
Restimulans		ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB	ConA	SEB
Vergleich	K1 zu V1								x		x		x		x		x		x		x		x
	K1 zu V2										x				x								
	K2 zu V3										x		x		x								
	K2 zu V4						x		x		x		x		x		x						x

 Signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Restimulation mit ConA

 Signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Restimulation mit SEB


 kein Einsatz von SEB als Stimulans

Abb. 5.5 Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen in der IFN- $\gamma$ -Konzentration nach Restimulation mit den Positivkontrollen Concanavalin A (ConA, 20  $\mu$ g/ml) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, 4  $\mu$ g/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, *p. i.* = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

### 5.1.6.2 Fähigkeit der PBMC zur Sekretion von IL-10 nach einer Restimulation mit ConA oder SEB

Sowohl in den Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen wurden nach einer Restimulation von Zellen mit ConA bzw. SEB im Vergleich zu den unstimulierten PBMC zu allen BZP im Mittel tendenziell höhere IL-10-Konzentrationen nachgewiesen. Diese Unterschiede waren nach einer Restimulation mit ConA bereits ab der achten Woche *p. i.* bzw. zwölften Woche *p. i.* (V3, spät, geringe Dosis) signifikant (Abb. 5.6 und Abb. 5.7).

Auch in Überständen SEB-restimulierter PBMC wurden unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Ziegenlämmer tendenziell stets höhere IL-10-Konzentrationen als in denen unstimulierter PBMC gemessen. Während dies unabhängig von der Inokulation bei den älteren Tieren bereits ab der 8. Woche *p. i.* nachweisbar war, traten signifikante Unterschiede bei den jüngeren Gruppen K1, V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) erst 16 Wochen *p. i.* auf (Abb. 5.6 und Abb. 5.7). Wie auch nach einer Restimulation mit ConA zeigten SEB-behandelte PBMC der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant stärkere IL-10-Freisetzung als unstimulierte Zellen, während dieses in den übrigen Versuchsgruppen nur bis maximal zur 36. Woche *p. i.* nachvollziehbar war (Abb. 5.6 und Abb. 5.7).

In allen Gruppen wurden zu mindestens 80 % der getesteten Zeitpunkte tendenziell höhere IL-10-Gehalte in Überständen SEB-restimulierter Zellen im Vergleich zu ConA-restimulierten PBMC nachgewiesen. Insbesondere zwischen der 20. und 32. Woche *p. i.* waren die Unterschiede in den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis), V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) statistisch nachweisbar. In der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) traten keine signifikanten Unterschiede in der IL-10-Sekretion auf (Abb. 5.7).

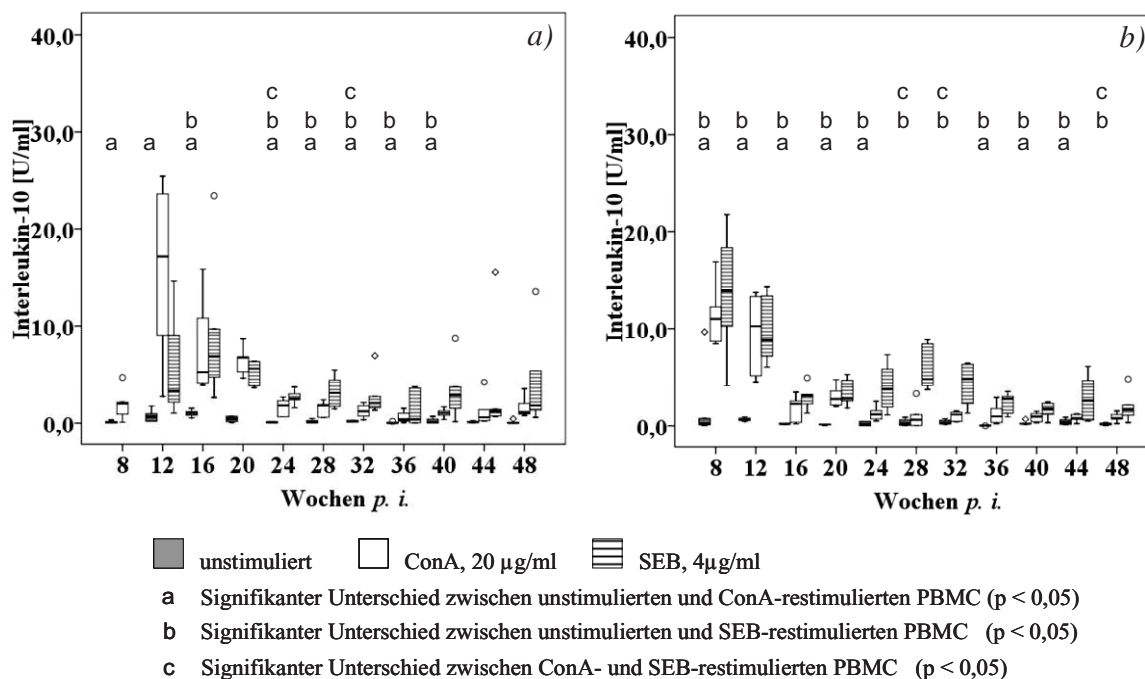


Abb. 5.6 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IL-10-Sekretion der PBMC der Kontrolltiere. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag). In der Gruppe K1 wurde SEB erst ab der zwölften Woche p. i. als Restimulans eingesetzt. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)

Zellen der Tiere aus den Kontrollgruppen sezernierten nach einer Restimulation mit ConA tendenziell mehr IL-10 als solche der Versuchsgruppen. Dies war insbesondere ab der 28. Woche p. i. (V1, früh, geringe Dosis) bzw. 16. Woche p. i. (V2 bis V4) feststellbar. Signifikant verschieden waren die Differenzen zwischen den Gruppen K1 (früh) und V2 (früh, hohe Dosis) 28, 32 und 40 Wochen p. i. Weitere Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen traten nicht auf (Abb. 5.8). Bei den MAP-inokulierten Gruppen war weder ein eindeutiger Einfluss des Inokulationszeitpunktes noch der Inokulationsdosis auf die ConA-induzierte IL-10-Sekretion nachweisbar. Nach einer Restimulation mit SEB traten ebenfalls nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen auf.

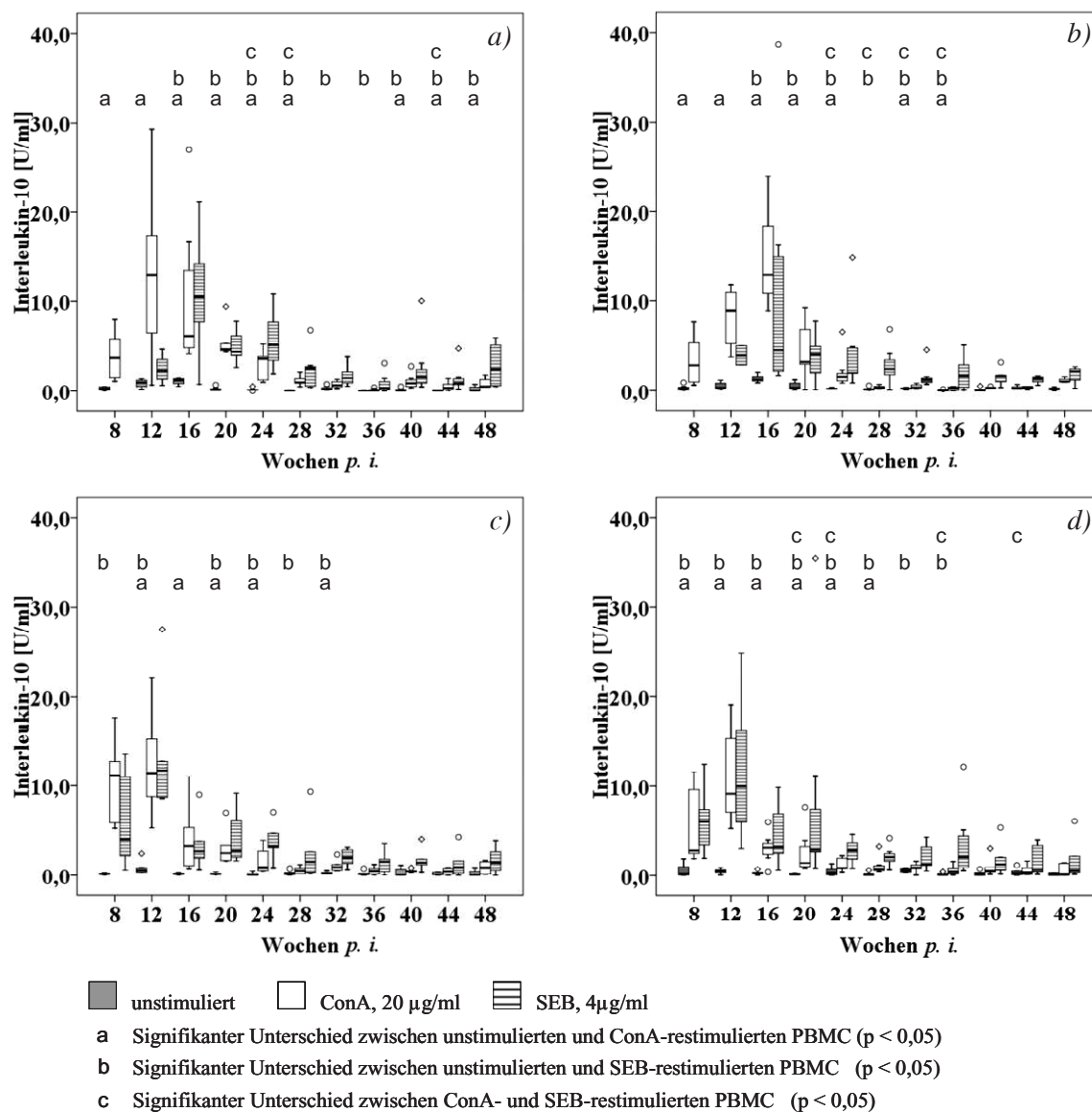


Abb. 5.7 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, 4  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die IL-10-Sekretion der PBMC MAP-inokulierter Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). In den Gruppen V1 und V2 wurde SEB erst ab der zwölften Woche p. i. als Stimulans eingesetzt. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)

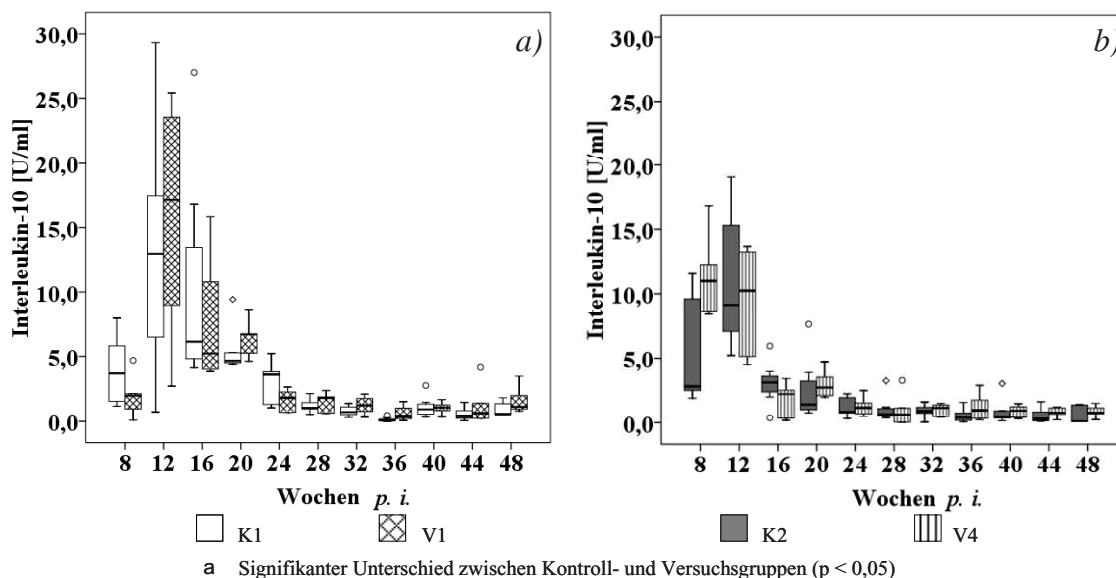


Abb. 5.8 Unterschiede in der IL-10-Konzentration zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20  $\mu$ g/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe,  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe

### 5.1.6.3 Unterschiede zwischen den IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Abhängigkeit von den zur Restimulation eingesetzten Konzentrationen von jPPD bzw. aPPD

Signifikante Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion von Zellen der beiden Kontrollgruppen unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von jPPD bzw. aPPD traten nicht auf (Abb. 5.9 a) und b)). Die geringere Konzentration jPPD führte in allen Versuchsgruppen zu einer tendenziell geringeren Induktion der IFN- $\gamma$ -Sekretion. Je nach Versuchsgruppe waren diese Unterschiede zu verschiedenen BZP signifikant (Abb. 5.9 c) und d)).

Innerhalb der Versuchsgruppen führte der Zusatz von 625 I. E. aPPD/ml im Mittel zu einer tendenziell stärkeren Bildung von IFN- $\gamma$  als eine Restimulation mit 125 I. E. aPPD/ml. Signifikante Unterschiede traten im Versuchsverlauf vereinzelt auf (Abb. 5.10 c, Abb. 5.10 d).

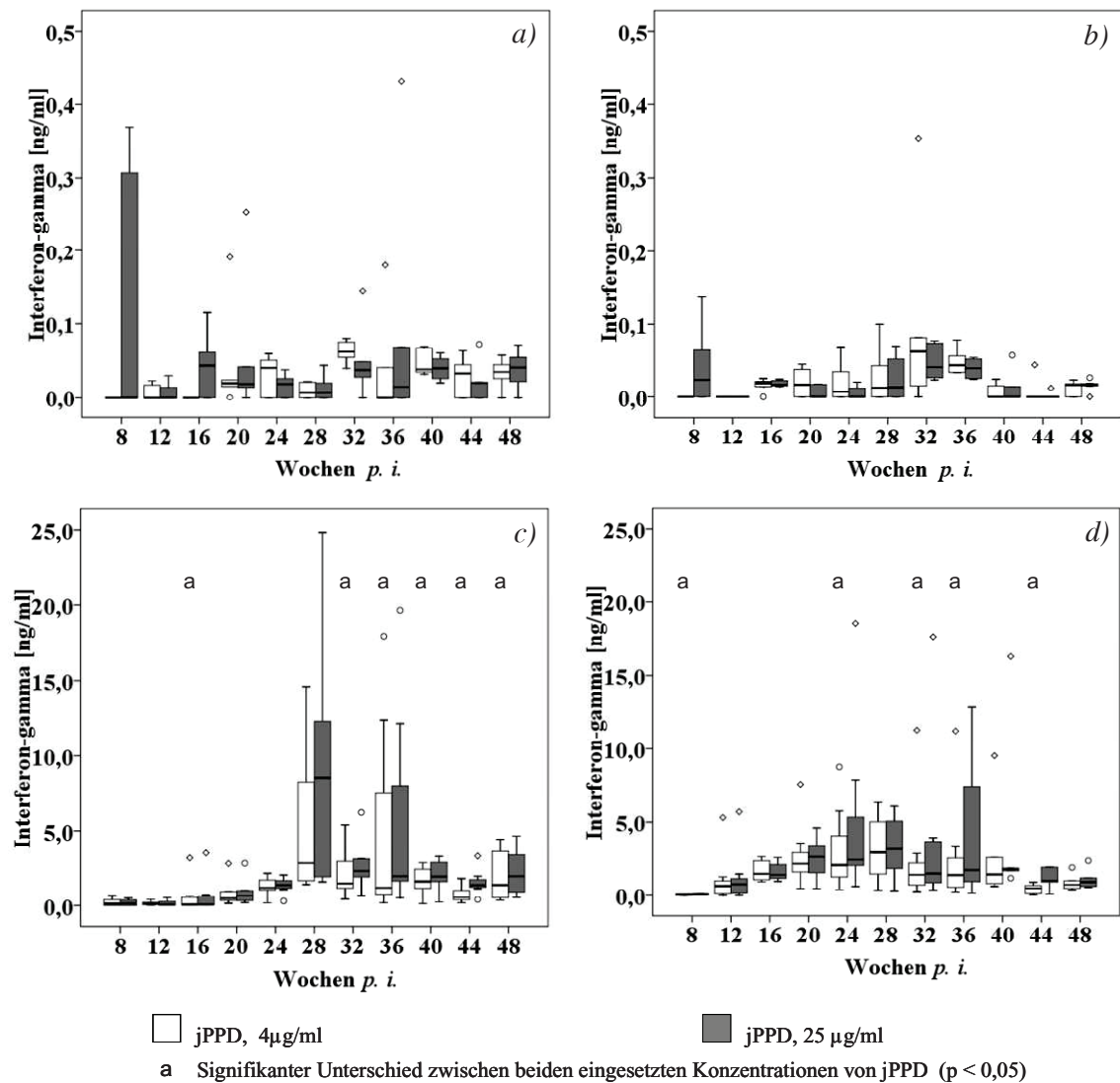


Abb. 5.9 Konzentrationsabhängiger Effekt von jPPD auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1(3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Teilabbildungen. Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate,  $p$  = Signifikanzniveau,  $p$  i. = post inoculationem

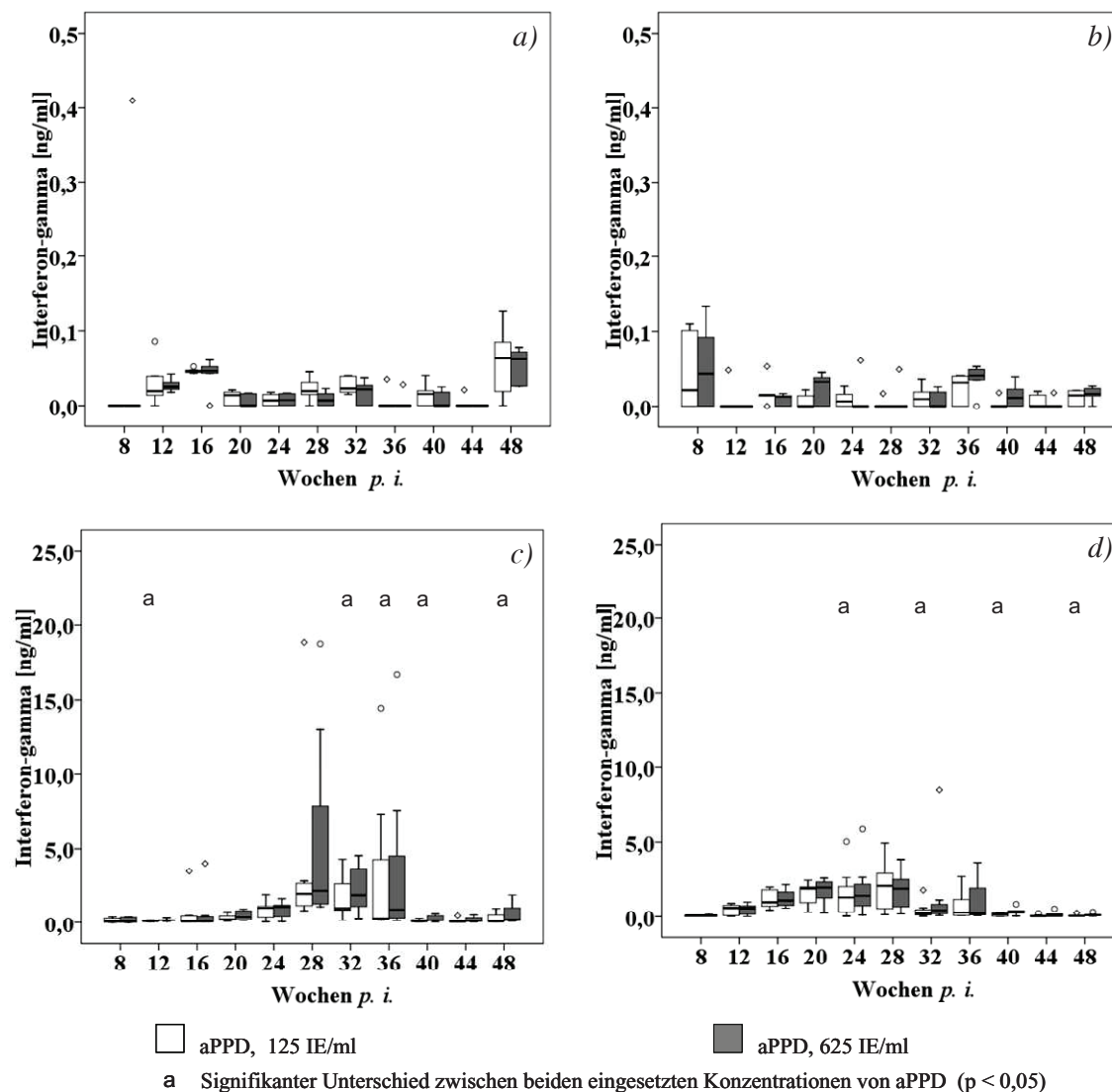


Abb. 5.10 Konzentrationsabhängiger Effekt von aPPD auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1 (3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Teilabbildungen. Erläuterungen: aPPD = aviäres purified protein derivate, IE = Internationale Einheit, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem

#### 5.1.6.4 Unterschiede zwischen den IL-10-Konzentrationen in Abhängigkeit von den zur Restimulation eingesetzten Konzentrationen von jPPD bzw. aPPD

Die mit der niedrigeren jPPD-Konzentration von  $4 \mu\text{g/ml}$  restimulierten PBMC sezernierten in allen Tiergruppen tendenziell weniger IL-10 als PBMC, die mit  $25 \mu\text{g/ml}$  jPPD restimuliert worden waren. Die sekretierte Zytokinmenge unterschied sich in den einzelnen Gruppen zu mehreren Zeitpunkten signifikant (Abb. 5.11). Während signifikante Unterschiede in den früh inokulierten Gruppen bereits acht Wochen p. i. auftraten, war dies in den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis), V4 (hohe Dosis) und der Gruppe K2 (spät) erst zwölf Wochen p. i. der Fall.

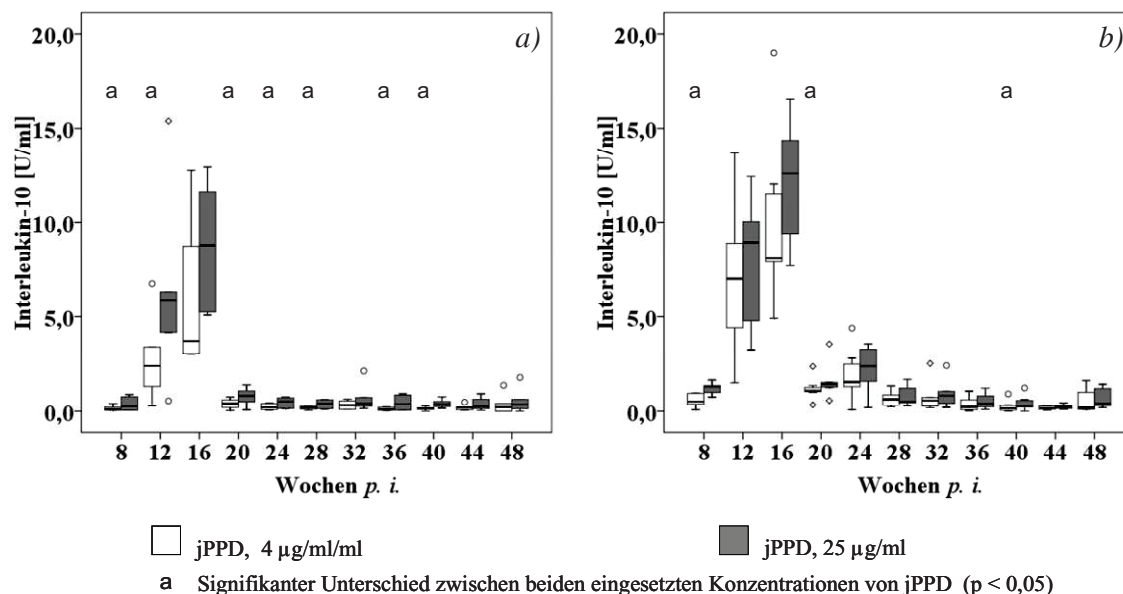


Abb. 5.11 Konzentrationsabhängiger Effekt von jPPD auf die IL-10-Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind a) die Gruppe K1(3. Lebenstag) und b) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)

Die mit 125 I. E./ml aPPD restimulierten PBMC der Kontrollgruppen (Abb. 5.12) sekretierten im Durchschnitt weniger IL-10 als solche, die mit 625 I. E aPPD restimuliert worden waren. Signifikante Unterschiede traten zu vereinzelt BZP auf. In beiden früh inokulierten Versuchsgruppen spiegelte sich diese Tendenz wider (Kapitel 10.2.1, Tab. 10.23). In den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) führte die höhere Konzentration aPPD nicht eindeutig zu einer stärkeren IL-10-Sekretion. Zu sieben bzw. fünf (V4, spät, hohe Dosis) BZP lag die mittlere IL-10-Sekretion nach Einsatz der höheren aPPD-Konzentration über der von PBMC, denen 125 I. E. aPPD/ml zugegeben worden waren (Abb. 5.12). In allen Gruppen ist - unabhängig vom Restimulans - die deutlich schwächere IL-10-Sekretion in der zweiten Versuchshälfte auffallend (Kapitel 5.1.6.8)



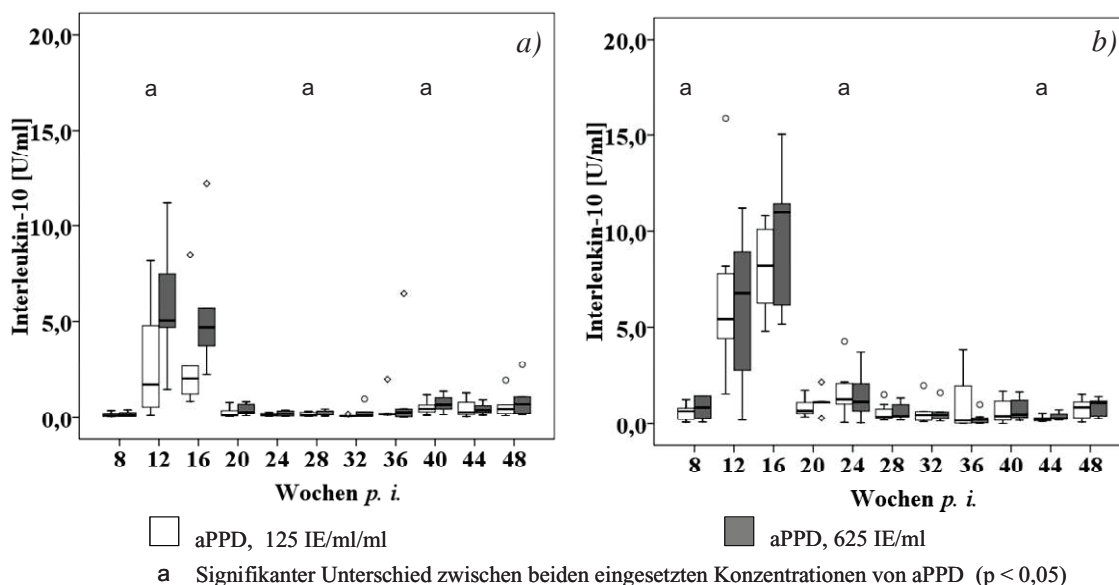


Abb. 5.12 Konzentrationsabhängiger Effekt von aPPD auf die IL-10-Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind a) die Gruppe K1 (3. Lebensstag) und b) die Gruppe V1 (3. Lebensstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: aPPD = aviäres purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)

Im Laufe des Versuchs entstand die organisatorisch bedingte Notwendigkeit, die Anzahl zu bearbeitender Proben für die Genexpressionsanalyse verschiedener Zytokine zu beschränken. Es wurde sich für die Aufarbeitung derjenigen Zellen entschieden, die mit der jeweils geringeren Konzentration von jPPD bzw. aPPD restimuliert worden waren. Daher werden im Folgenden nur diese Ergebnisse dargestellt.

### 5.1.6.5 Spezifität der IFN- $\gamma$ -Reaktion nach der Inokulation mit MAP

Vergleicht man die Zytokinsekretion von PBMC der inokulierten Versuchstiere, die mit jPPD oder aPPD restimuliert worden waren, bildeten Zellen nach Zusatz von jPPD mehr IFN- $\gamma$ . In den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) waren die Unterschiede ab der 20. Woche p. i., in den spät inokulierten Gruppen bereits vier Wochen früher statistisch nachweisbar. Der Unterschied ließ sich lediglich in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) 28 Wochen p. i. statistisch nicht verifizieren. In der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) fällt auf, dass ab der 36. Woche p. i., keine signifikanten Unterschiede mehr auftraten (Abb. 5.13).

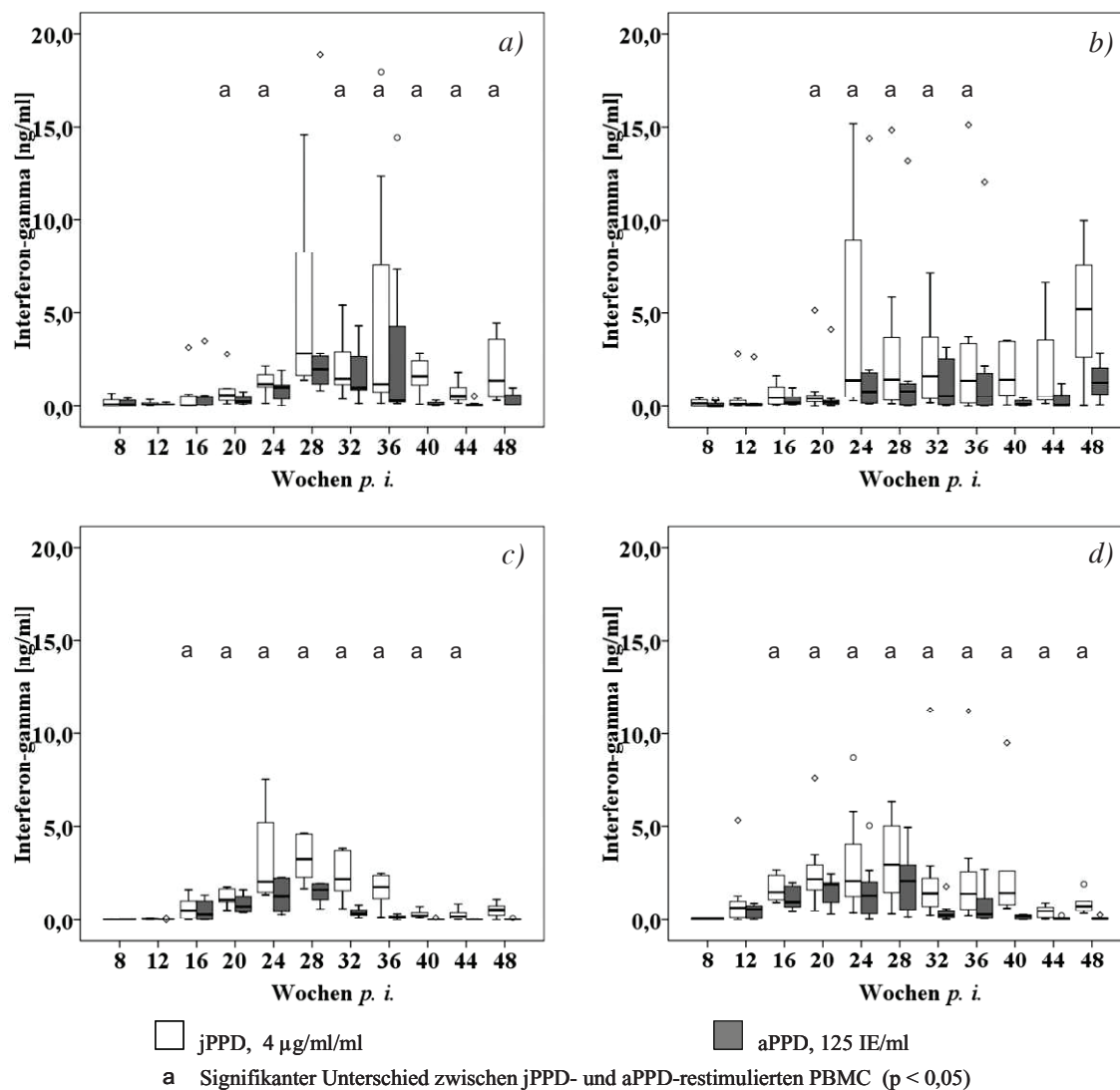


Abb. 5.13 Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach der Restimulation von PBMC a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) mit jPPD (4 µg/ml), sowie mit aPPD (125 I. E./ml). Erläuterungen: a = aviär, jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem

### 5.1.6.6 Spezifität der IL-10-Reaktion nach der Inokulation mit MAP

Nach einer spezifischen Restimulation von PBMC der Versuchstiere mit jPPD sezernierten die Zellen der früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) lediglich zu je drei BZP signifikant mehr IL-10 als solche, denen aPPD zugegeben worden war. In der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) war dies nur in der 20. und 44. Woche p. i. nachweisbar, in der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) traten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf (Abb. 5.14).

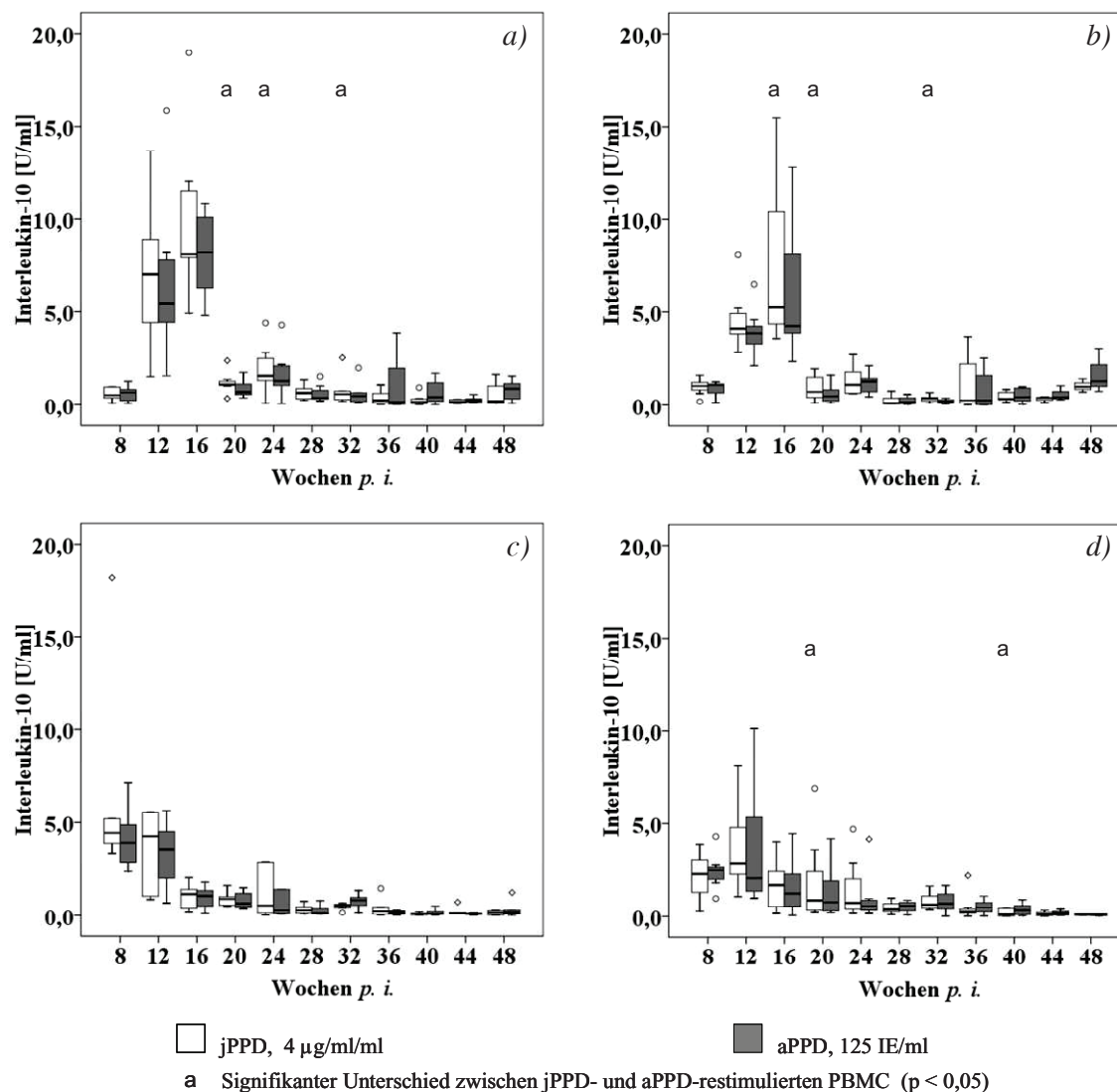


Abb. 5.14 Unterschiede in der IL-10-Sekretion nach der Restimulation von PBMC a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) mit jPPD (4 µg/ml), sowie mit aPPD (125 I. E./ml). Erläuterungen: a = aviär, IE = Internationale Einheit, jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)

### 5.1.6.7 Kinetik der IFN- $\gamma$ -Reaktion im Versuchsverlauf

Bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt ließen sich in allen Versuchsgruppen im Mittel höhere IFN- $\gamma$ -Mengen in Überständen jPPD-restimulierter PBMC als in den Kontrollgruppen messen. Signifikant höhere Zytokinkonzentrationen in Überständen von Zellen inokulierter Tiere waren ab der zwölften Woche p. i. bis zum Ende des Versuchs nachweisbar (Abb. 5.15).

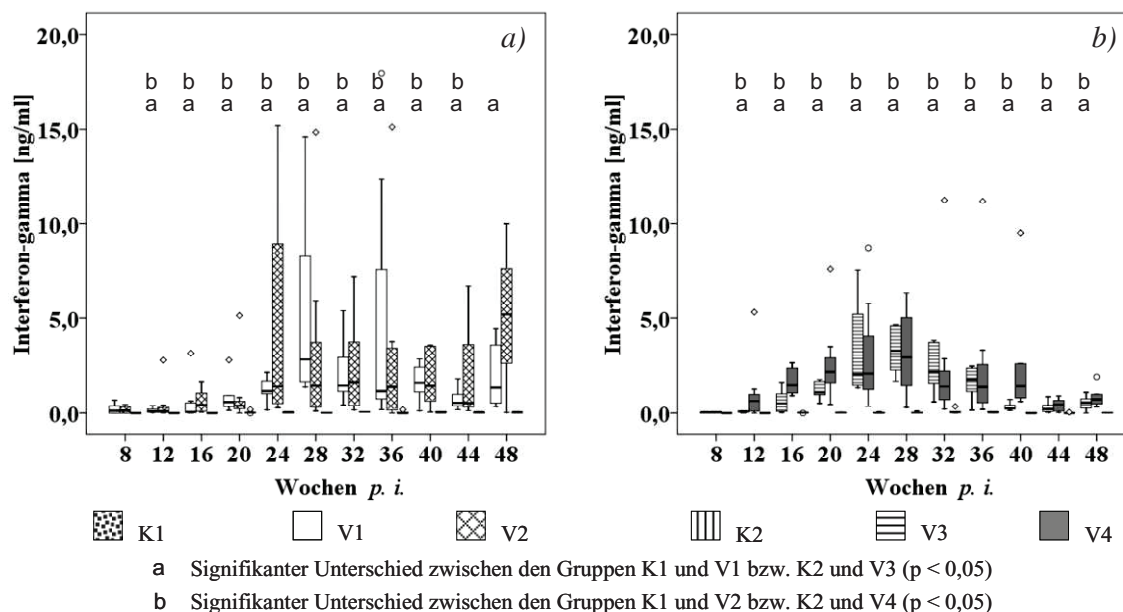


Abb. 5.15 Gruppenunterschiede in der IFN- $\gamma$ -Reaktion nach Restimulation der PBMC mit jPPD a) Vergleich der Gruppen K1 (3. Lebenstag), V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. b) Vergleich der Gruppen K2 (42. Lebenstag), V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

In allen Versuchsgruppen stiegen die Werte der Mediane in der ersten Hälfte des Versuchs zwischen den einzelnen BZP jeweils an (Abb. 5.15 a) und b)). Anschließend sanken sie bis zur 44. Woche p. i. in allen Gruppen, lagen jedoch oberhalb derer der Kontrollgruppen. Der Höhepunkt der Zytokinreaktion lag mit Ausnahme der Gruppe V2 (32. Woche p. i. früh, hohe Dosis) jeweils in der 28. Woche p. i. Im Gruppenvergleich bildeten zum Reaktionshöhepunkt PBMC der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) die größte IFN- $\gamma$ -Menge (3,28 ng/ml), die geringste Sekretion wiesen PBMC von Zellen der Gruppe V2 (1,63 ng/ml) auf. Zwischen der 44. und 48. Woche p. i. stieg die mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentration in allen Gruppen erneut an. Dies war in Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) ausgesprochen deutlich: Im gesamten Versuchszeitraum war in keiner der Gruppen ein höherer Median nachweisbar (5,196 ng/ml). Auffallend war weiterhin die große Spannweite der Werte innerhalb aller Versuchsgruppen zu den einzelnen BZP. Die Gruppen, die früh inokuliert worden waren, wiesen eine deutlich breitere Verteilung der Werte auf als Tiere der spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis).

Eine höhere Inokulationsdosis führte nicht zu einer vermehrten IFN- $\gamma$ -Konzentration in Zellkulturüberständen. Signifikante Unterschiede zwischen den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) wurden zu keinem Zeitpunkt festgestellt. PBMC von Ziegen der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis), die mit jPPD restimuliert worden waren, gaben in der 16. und 40. Woche p. i. mehr IFN- $\gamma$  an ihre Umgebung ab, als PBMC der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis).

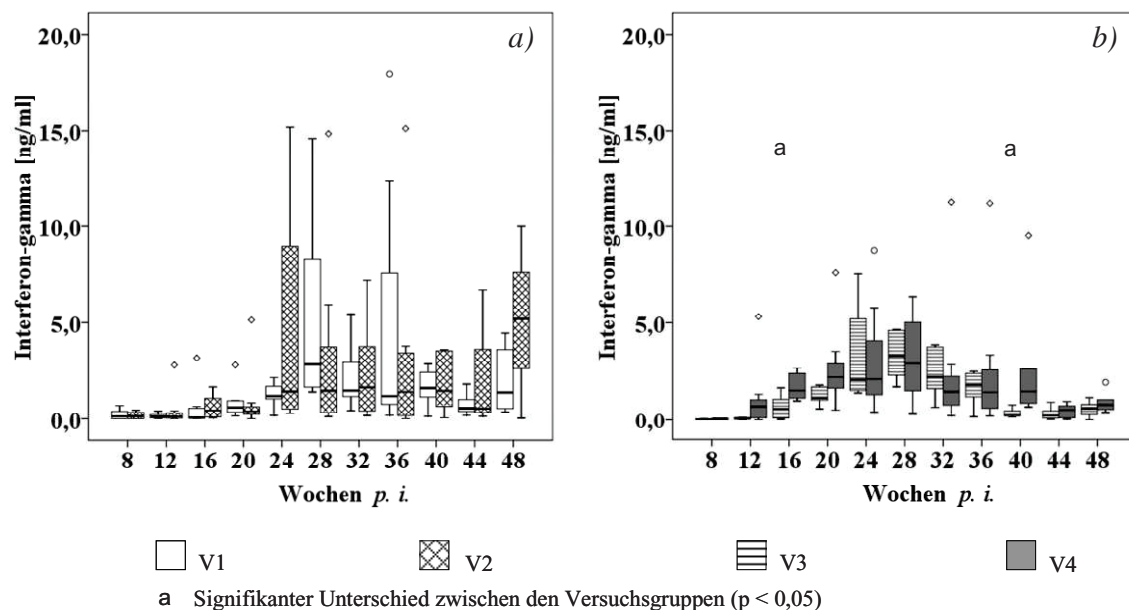


Abb. 5.16 Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE) und b) den Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

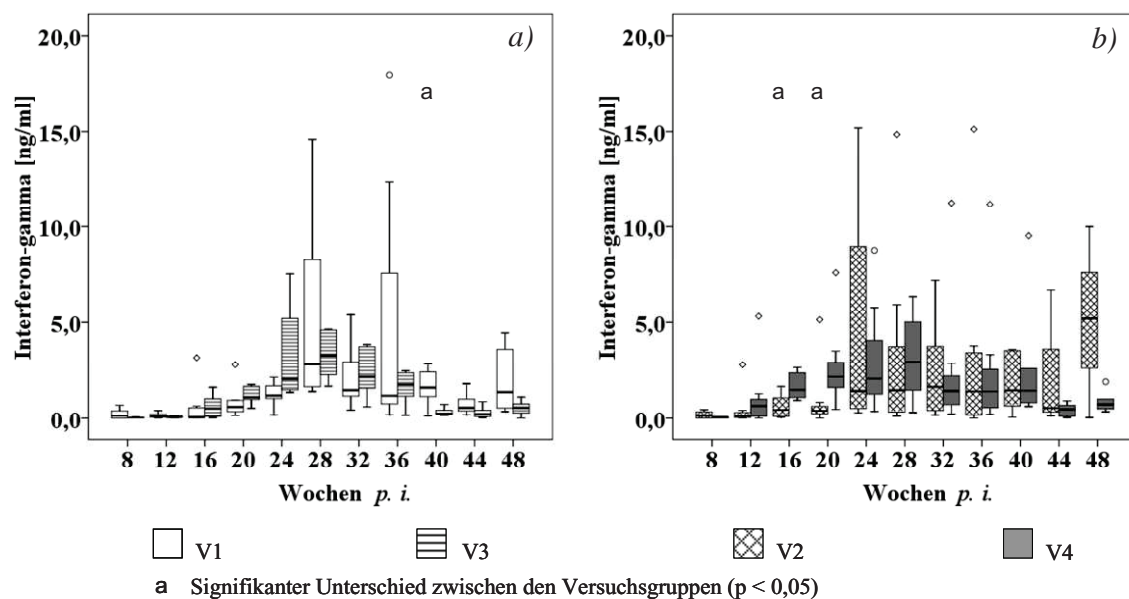


Abb. 5.17 Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) den Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

Auch der Inokulationszeitpunkt hatte keinen statistisch nachweisbaren Einfluss auf die Sekretion des Zytokins (Abb. 5.17). Nach Beginn des Anstiegs der Sekretion in den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) etwa ab der 16. Woche *p. i.* ließ sich in der ersten Versuchshälfte jedoch ein Trend ablesen: Im Mittel sekretierten PBMC von spät inokulierten Ziegen jeweils mehr IFN- $\gamma$  als Ziegen, die früher inokuliert worden waren (Abb. 5.17).

### 5.1.6.8 Kinetik der IL-10-Reaktion im Versuchsverlauf

Waren die Zellen mit jPPD restimuliert worden, wurden im Vergleich der IL-10-Sekretion zwischen der Gruppe K1 (früh) und den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V2 (früh, hohe Dosis) tendenziell höhere IL-10-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der inokulierten Tiere nachgewiesen. Sie unterschieden sich in der ersten Versuchshälfte z. T. signifikant (Abb. 5.18 a)).

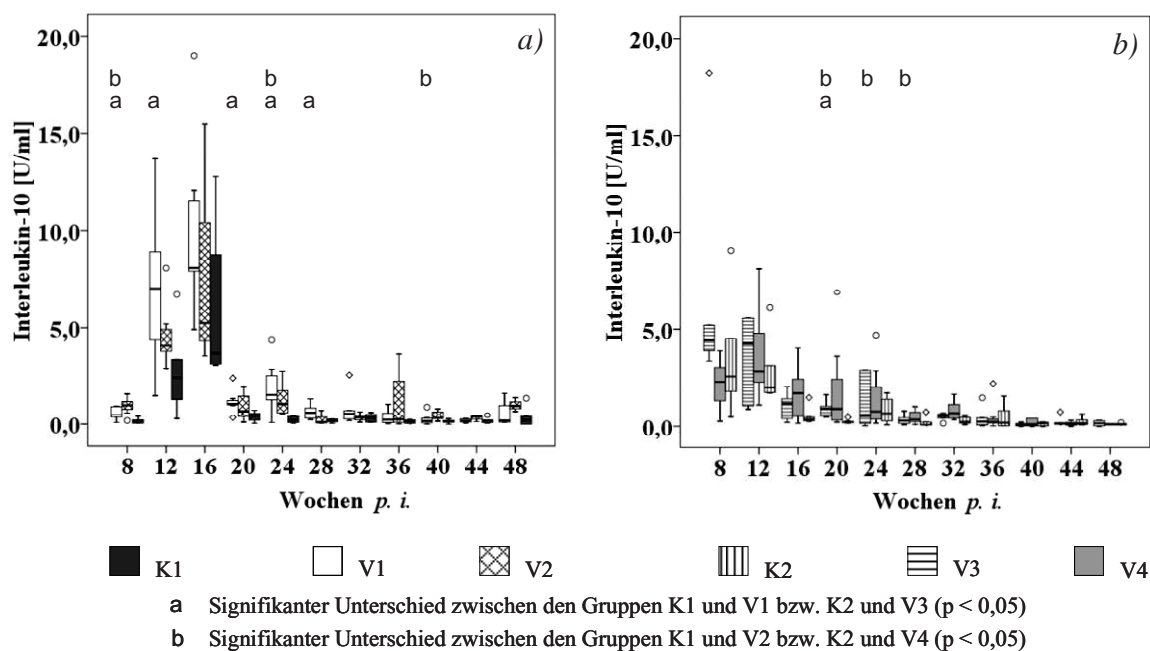


Abb. 5.18 Unterschiede in der IL-10-Sekretion von jPPD-restimulierten PBMC zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) sowie zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, *p* = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe

Auch Zellen der Tiere aus den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) sekretierten im Vergleich zu denen der Gruppe K2 (spät) in der Mehrzahl der BZP im Mittel mehr IL-10. Signifikant waren die Unterschiede nur vereinzelt (Abb. 5.18 b)). Erste deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) treten im Vergleich zu den früh inokulierten Gruppen etwa zwölf Wochen später auf.

In der Gruppe K1 und beiden früh inokulierten Versuchsgruppen stieg der mittlere IL-10-Gehalt im Zellkulturüberstand von jPPD-restimulierten PBMC zwischen der achten und der 16. Woche *p. i.* auf maximal 3,72 U/ml (K1), 8,07 U/ml (V1) und 5,24 U/ml (V2) an und sank anschließend bis zur 28. Woche *p. i.* (Abb. 5.18 a)). Zum Ende des Versuchs schwankten die Mediane auf niedrigem Niveau. In der 48. Woche *p. i.* lag der Median der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) mit 0,99 U/ml deutlich über dementsprechenden Wert der anderen Gruppen. Ein Einfluss der Inokulationsdosis auf die sekretierte IL-10-Menge war nicht nachweisbar. Auffallend ist die große Streuung innerhalb der Gruppen, die in der ersten Versuchshälfte besonders ausgeprägt war (Abb. 5.19 a)).

Die maximale mittlere IL-10-Konzentration wurde in den Gruppen K2 (spät) und V3 (spät, geringe Dosis) mit 2,57 U/ml (K2) bzw. 4,44 U/ml (V3) bereits zu Versuchsbeginn nachgewiesen. Auch in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) ließ sich der maximale Wert (2,83 U/ml) in der zwölften Woche *p. i.* und damit deutlich früher bestimmen als in den früh inokulierten Gruppen.

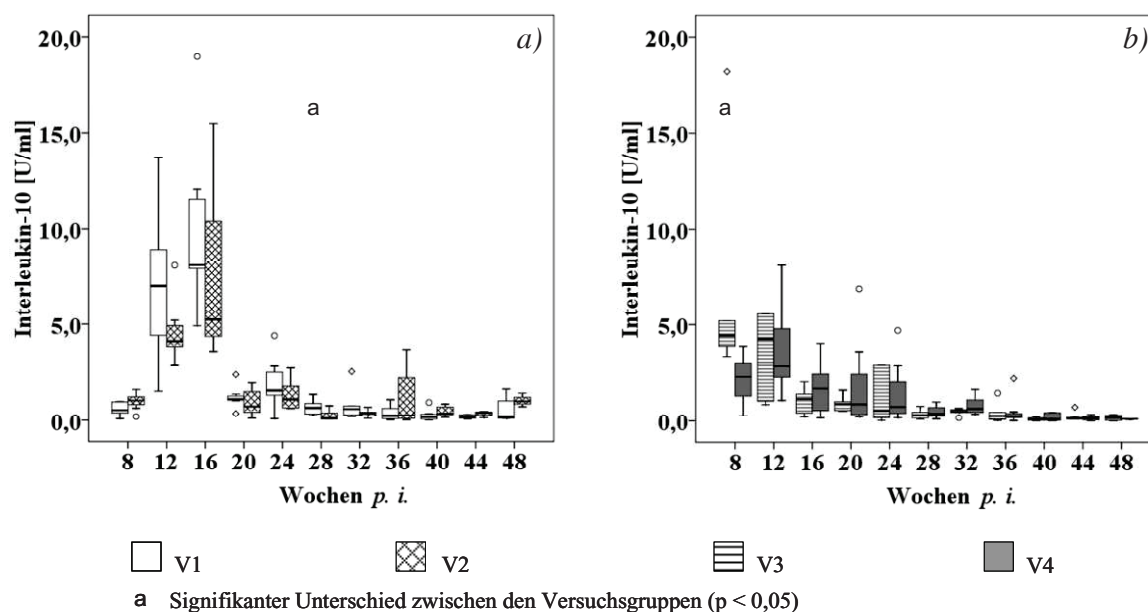


Abb. 5.19 Unterschiede in der IL-10-Konzentration der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE) und b) den Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe

Anschließend erfolgte ein Abfall der Zytokinsekretion bis zur 28. Woche *p. i.* Zwischen der 32. Woche *p. i.* und der 48. Woche *p. i.* schwankten die Mediane nur leicht (Abb. 5.18 b)).

Auch der Inokulationszeitpunkt hatte keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion. Zwar wurden zu zwei BZP signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V3 (spät, geringe Dosis) nachgewiesen, jedoch nicht mit

einheitlichem Muster (Abb. 5.20 a)). Ähnlich stellte es sich zwischen den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) dar (Abb. 5.20 b)).

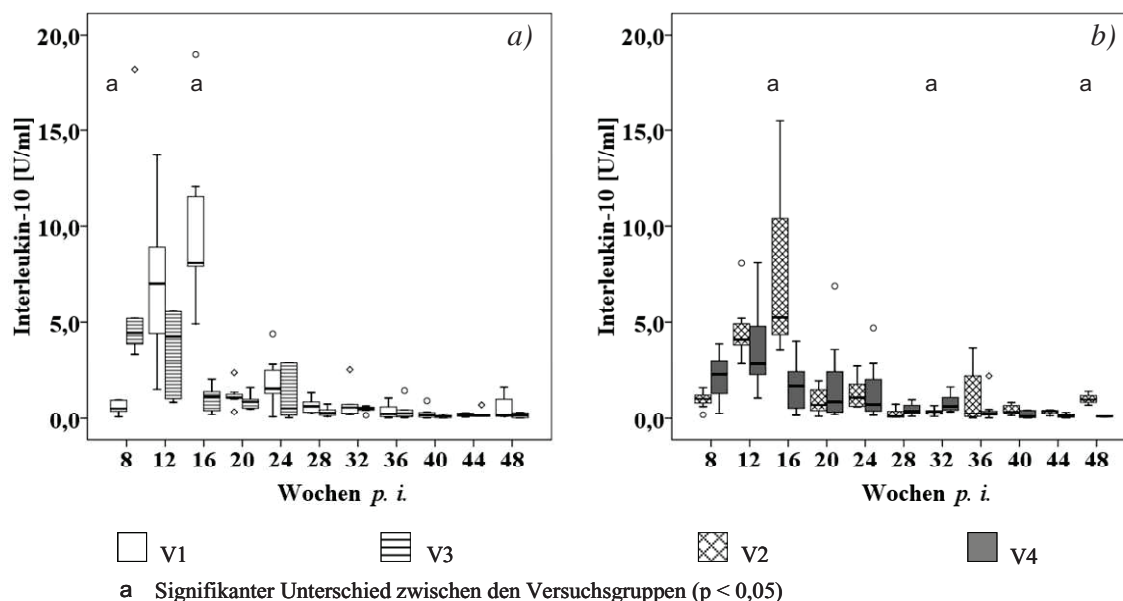


Abb. 5.20 Unterschiede in der IL-10-Sekretion der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) den Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe

Der beschriebene Verlauf der IL-10-Reaktion zeigte sich unabhängig von der Tiergruppe auch, wenn die Zellen unstimuliert geblieben (Abb. 5.21 a) und b)) oder mit aPPD restimuliert worden waren (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.7 Ergebnisse der mittels relativer real-time PCR bestimmten Expression verschiedener Zytokine

Die hier dargestellten Ergebnisse der Proben aus der 28. Woche  $p. i.$  wurden von Frau Beate Appelt in der Arbeitsgruppe Mykobakterien des FLI Jena erarbeitet. Aufgrund der Resultate und aus Gründen der Vergleichbarkeit der Daten, wurden Proben analysiert, die von unstimulierten PBMC und SEB-restimulierten PBMC als Positivkontrolle stammten. Es wurde außerdem die Genexpression in Zellen betrachtet, denen  $4 \mu\text{g/ml}$  jPPD und entsprechend 125 I. E./ml aPPD zugegeben worden war.



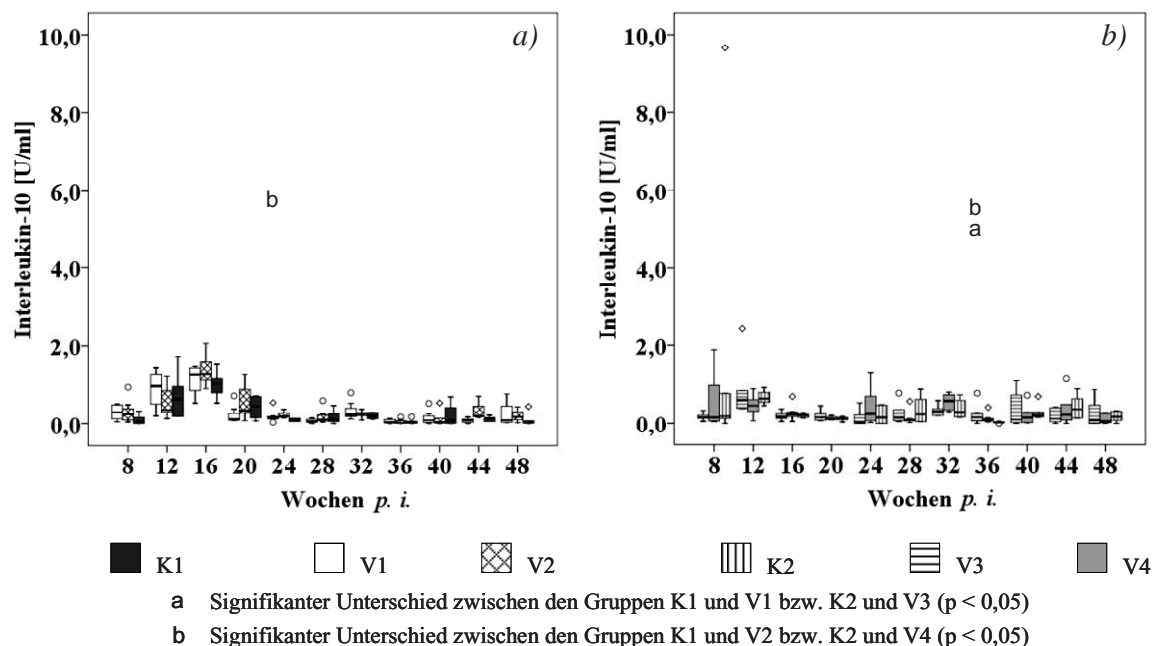


Abb. 5.21 Unterschiede in der IL-10-Sekretion von unstimulierten PBMC zwischen a) den Gruppen K1 und V1 bzw. V2 sowie zwischen b) den Gruppen K2 und V3 bzw. V4.

Die Reaktionen der Zellen auf verschiedene Restimulantien waren durch große Schwankungen in der Genexpression gekennzeichnet. Dies spiegelt sich in sehr großen Konfidenzintervallen wieder. Unterschiedliche Restimulantien führten nicht zu signifikanten Differenzen in der Genexpression eines Zytokins. Auch die Expression verschiedener Zytokine durch PBMC, die mit derselben Substanz restimuliert worden waren, unterschieden sich nicht signifikant. Lediglich die Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den untersuchten Zeitpunkten waren vereinzelt statistisch nachweisbar. Die folgende Darstellung der Ergebnisse kann daher nur Trends beschreiben.

#### 5.1.7.1 Vergleich der Transkriptionsrate der Gene einzelner Zytokine durch PBMC in Abhängigkeit vom Restimulans

Eine Restimulation von PBMC mit SEB führte unabhängig von einer Inokulation der Ziegen zu allen untersuchten BZP zu einer Steigerung der Genexpression von IFN- $\gamma$  und TGF $\beta$ . In beiden Kontrollgruppen lag die Expression deutlich über der in Zellen, denen jPPD oder aPPD zugegeben worden war. In den Versuchsgruppen ließ sich dies aufgrund der durch jPPD und aPPD hervorgerufenen Induktion beider Parameter nicht nachvollziehen. Während sich SEB bei diesen beiden Mediatoren als Positivkontrolle eignete, war dies bei IL-10, IL-12p40 und TNF $\alpha$  nicht der Fall. Es induzierte bei IL-10 keine einheitliche Hemmung oder Induktion der Genexpression. Im Gegensatz zu jPPD und aPPD war eine Verringerung tendenziell jedoch weniger stark und eine Steigerung der Expression deutlicher ausgeprägt, wenn den PBMC SEB zugegeben worden war. Auch IL-12p40 wurde gruppenunabhängig in seiner Genexpression durch SEB nicht

einheitlich gehemmt oder induziert, TNF $\alpha$  wurde in seiner Expression einheitlich gehemmt (Kapitel 10.2.2, Tab. 10.24 - Tab. 10.28).

Die Restimulation von PBMC beider Kontrollgruppen mit jPPD bewirkte nur geringgradige Reaktionen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Während zunächst in beiden Gruppen eine Steigerung der IFN- $\gamma$ -Expression stattfand, wurde diese in der zweiten Versuchshälfte überwiegend gehemmt. Gleiche Effekte ließen sich nach Zusatz von aPPD zu den Zellen beobachten (Kapitel 10.2.2, Tab. 10.24 bis Tab. 10.28). Auch TGF $\beta$ -Gene wurden durch jPPD im Vergleich zu unstimulierten PBMC nicht einheitlich induziert oder gehemmt. Dagegen bewirkte aPPD eine Induktion der Expression. Der Zusatz von jPPD und aPPD zu PBMC in den Kontrollgruppen führte überwiegend zu einer Verringerung der Genexpression von IL-10. Eine Zugabe von aPPD zu den Zellen in der Gruppe K1 (früh) bewirkte ab der 28. Woche *p. i.* eine Induktion des Zytokins. Auch die Expression von IL-12p40 zu den Zellen der Kontrolltiere wurde durch jPPD verringert. Im Gegensatz zu IL-10 führte auch aPPD in beiden Kontrollgruppen überwiegend zu einer Verminderung der Expression. Der Zusatz von jPPD bewirkte zu Beginn und zum Ende des Versuchs eine Verminderung der Expression von TNF $\alpha$ , in den Wochen 28 und 40 *p. i.* dagegen eine geringgradige Steigerung der Transkriptionshäufigkeit. Auch die Zugabe von aPPD zu PBMC der Kontrolltiere führte nicht zu einer einheitlichen Induktion oder Hemmung der Zytokinexpression (Kapitel 10.2.2 Tab. 10.24 - Tab. 10.28).

In allen Versuchsgruppen führte der Zusatz von jPPD und aPPD jeweils zu einer Steigerung der IFN- $\gamma$ -Expression. Dabei unterschied sich die Reaktion auf aPPD kaum gegenüber der auf jPPD. Die Konfidenzintervalle waren in den früh inokulierten Gruppen deutlich größer als in den Gruppen V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis). Die Expression der IL-10 mRNA wurde in den Versuchsgruppen durch den Zusatz von jPPD oder aPPD überwiegend gehemmt. Im Vergleich zu jPPD war die Veränderung nach Zugabe von aPPD zu mindestens zwei BZP schwächer. In den Versuchsgruppen führte jPPD zu einer Expressionssteigerung von TGF $\beta$ -Genen, wobei sich der Verlauf zwischen den Versuchsgruppen unterschied. Auch aPPD führt in den Versuchsgruppen überwiegend zu einer erhöhten Genexpression. Der Reaktionsverlauf spiegelte den nach jPPD-Zusatz in drei von vier Versuchsgruppen wider. Beide PPDs unterschieden sich kaum in der Reaktionsstärke. Die Zugabe von jPPD bewirkte in beiden früh inokulierten Versuchsgruppen zu allen BZP eine Induktion der Genexpression von IL-12p40. Auch die Restimulation mit aPPD führte überwiegend zu einer Steigerung der Genexpression. Die Reaktion auf aPPD war meist schwächer als die auf jPPD (Kapitel 10.2.2, Tab. 10.24 - Tab. 10.28). In der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) war nach Restimulation mit jPPD oder aPPD dagegen keine einheitliche Induktion oder Hemmung der Zytokinexpression nachweisbar. In der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) wurde die Genexpression durch die Zugabe von jPPD zu den PBMC zu Versuchsbeginn zunächst gehemmt, zu den übrigen drei BZP ließ sich eine Induktion nachweisen. Die Zugabe von aPPD führte überwiegend zu einer Expressionssteigerung.

In den Versuchsgruppen führt eine Restimulation mit jPPD oder aPPD zu einer Hemmung der Genexpression von TNF $\alpha$  (Kapitel 10.2.2, Tab. 10.24 - Tab. 10.28).

#### **5.1.7.1.1 Vergleich der Expression verschiedener Zytokine zwischen den getesteten Zeitpunkten nach Restimulation mit jPPD**

Signifikant unterschiedliche Zytokinexpressionen zwischen den vier BZP traten unabhängig vom betrachteten Zytokin nur vereinzelt auf (Abb. 5.22).

In beiden Kontrollgruppen verringerte sich die Expression von IFN- $\gamma$  im Versuchsverlauf stetig. In den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) dagegen verstärkte sich die Induktion jeweils zwischen der 16. und 28. Woche *p. i.* In der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) sank sie anschließend, um in der 48. Woche *p. i.* noch einmal anzusteigen, während sie sich in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) bis zum Versuchsende jeweils verringerte. In beiden spät inokulierten Gruppen dagegen war die stärkste Induktion bereits in der 16. Woche *p. i.* feststellbar. Anschließend schwächte sie sich ab.

Während in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) zu Versuchsbeginn eine geringe Induktion messbar war, wurde die IL-10-Expression in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) leicht gehemmt. Zu den übrigen BZP war in beiden Gruppen eine Expressionshemmung nachweisbar. Sie war in der 28. Woche *p. i.* am stärksten. Im Anschluss verringerte sich die Hemmung zum jeweils nächsten BZP. Dieser Effekt ließ sich auch in den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) nachvollziehen, wobei die stärkste Hemmung bereits in der 16. Woche *p. i.* nachweisbar war. In der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) verstärkte sich die Expressionsverringering in der 40. Woche *p. i.* noch einmal. Die IL-10-Sekretion von Kontrolltieren wurde nicht beeinflusst.

Die TGF $\beta$ -Expression wurde in beiden Kontrollgruppen im Versuchsverlauf nicht einheitlich beeinflusst. In der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) induzierte jPPD zu Beginn und zum Ende des Versuchszeitraumes die Genexpression auf etwa gleichem Niveau. Achtundzwanzig Wochen *p. i.* war sie am geringsten. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich dagegen in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) die maximale Induktion nachweisen. Anschließend verringerte sich die Transkriptionshäufigkeit der TGF $\beta$ -Gene bis zum Versuchsende. Dieser Verlauf war auch in der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) nachvollziehbar. In der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) zeigte sich nach jPPD-Restimulation zunächst eine homogene Induktion der Expression. Zum Versuchsende verstärkte sie sich geringgradig.

Eine Restimulation von PBMC mit IL-12p40 führt in der Gruppe K1 (früh) im Laufe des Versuchs zu einer sich abschwächenden Hemmung der Genexpression. In der Gruppe K2 (spät) war dies nur bis zur 40. Woche *p. i.* zu beobachten, anschließend verstärkte sich die Hemmung. In den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) sank die Expression zwischen dem ersten und zweiten BZP, stieg dann

wieder an und schwächte sich erneut ab. In den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) dagegen war der Verlauf reziprok dem der früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis). In den Kontrollgruppen schwankt die Expression von TNF $\alpha$  nur wenig und uneinheitlich. Dagegen führt die Restimulation mit jPPD in den Versuchsgruppen zu einer gleich bleibenden Expressionshemmung.

#### **5.1.7.1.2 Vergleich der Expression der verschiedenen Zytokingene zwischen den einzelnen Tiergruppen nach Restimulation mit 4 $\mu$ g/ml jPPD**

Die Expression von IFN- $\gamma$  verringerte sich im Versuchsverlauf in den Kontrollgruppen. In den Versuchsgruppen wurde sie dagegen gleich bleibend stärker induziert. Die dadurch entstehenden deutlichen Unterschiede waren z. T. signifikant (Abb. 5.23a). Besonders häufig stellten sie sich zwischen der Gruppe K2 (spät) und den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis, zwei BZP) und V4 (hohe Dosis, drei BZP) als statistisch verifizierbar heraus. In der 28. Woche *p. i.* war der Unterschied unabhängig von den verglichenen Kontroll- und Versuchsgruppen stets signifikant. Dagegen ließ sich keine eindeutige Beeinflussung der Genexpression durch die Inokulationsdosis oder den Inokulationszeitpunkt nachweisen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen traten nur zwischen den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V3 (spät, geringe Dosis) in der 16. und 28. Woche *p. i.* auf (Abb. 5.23 a).

Die Beeinflussung der Genexpression von IL-10 stellte sich zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen zu keinem BZP signifikant dar. Eine Ausnahme bildete die 28. Woche *p. i.*, in der eine Expressionssteigerung in Gruppe K1 (früh) und eine Verringerung der Transkriptionshäufigkeit in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) zu einem statistisch verifizierbaren Unterschied führte. Auch zwischen den Versuchsgruppen waren die Unterschiede in der IL-10-Expression nicht signifikant verschieden. Ein Einfluss des Inokulationszeitpunktes und der Inokulationsdosis konnte daher ausgeschlossen werden (Abb. 5.23b).

Die Genexpression von TGF $\beta$  schwankte nach einer Zugabe von jPPD in den Kontrollgruppen geringgradig, während sie in den Versuchsgruppen zunahm. Signifikante Unterschiede traten jedoch nur zwischen den Gruppen K1 (früh) und V1 (früh, geringe Dosis) sowie den Gruppen K2 (spät) und V4 (spät, hohe Dosis) zu jeweils einem BZP auf. Die Inokulation der Ziegen beeinflusste die Genexpression daher nicht. Auch unterschiedliche Inokulationsdosen und -zeitpunkte führten nicht zu statistisch nachweisbaren Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 5.23c).

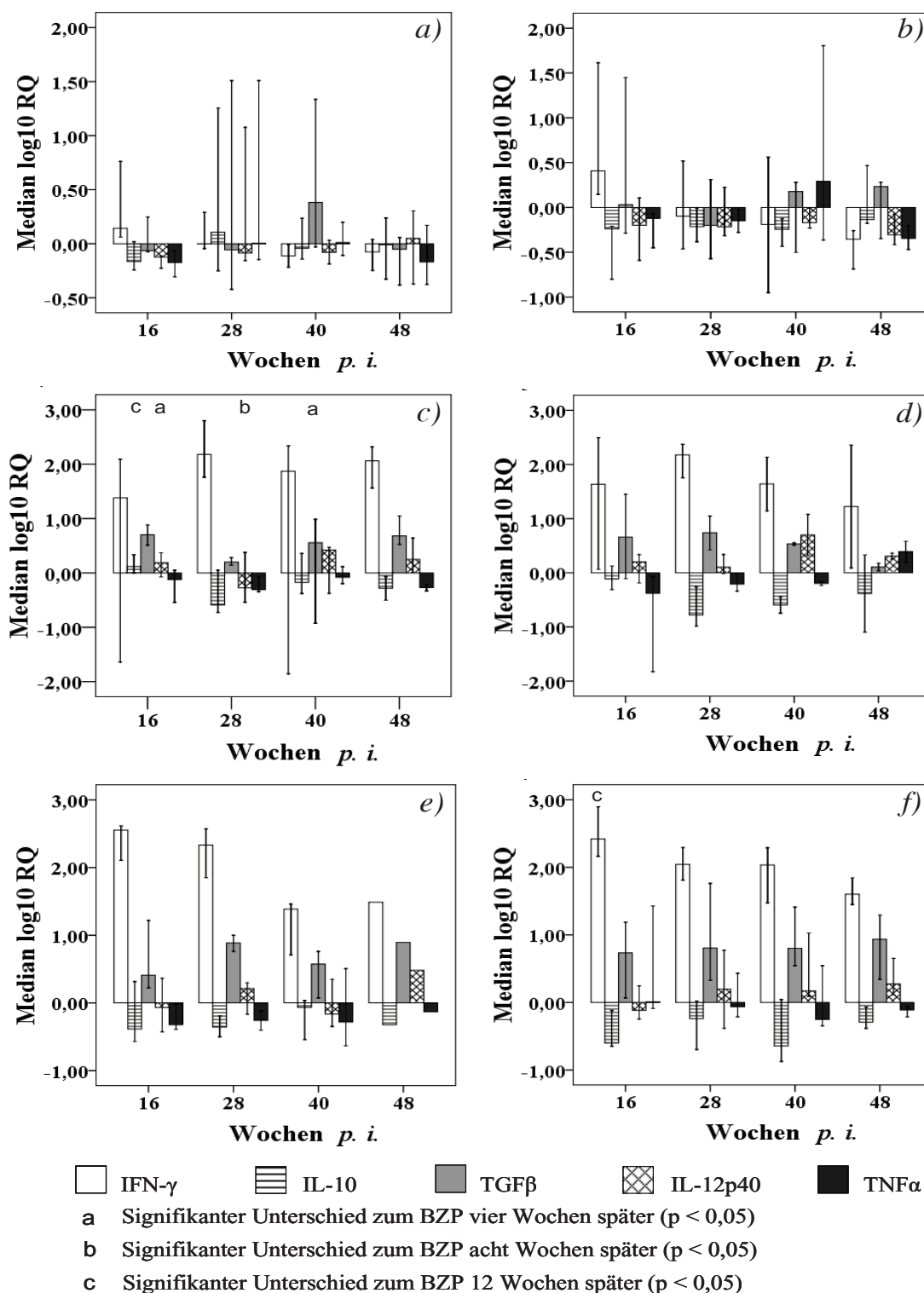


Abb. 5.22 Vergleich der Genexpression verschiedener immunmodulatorischer Zytokine durch jPPD-restimulierte PBMC als Verhältnis zu unstimulierten Zellen. Dargestellt sind die Gruppenmediane der logarithmierten RQ-Wert der Gruppen a) K1 (3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), e) V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Streuungsmaß: 95%iges Konfidenzintervall. Erläuterungen: BZP = Beprobungszeitpunkt, IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, IL = Interleukin, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha

Die Restimulation von PBMC mit jPPD induzierte in Kontroll- und Versuchsgruppen geringgradige Schwankungen der Transkriptionshäufigkeit der Gene von IL-12p40. Weder der Faktor Inokulation, noch die Inokulationsdosis oder der Inokulationszeitpunkt führten zu signifikanten Veränderungen in der Genexpression (Abb. 5.23d).

Sowohl in Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen führte die Restimulation von PBMC mit jPPD vorwiegend zu einer Expressionsverminderung von TNF $\alpha$ . Zu einzelnen BZP waren signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen nachweisbar, lediglich zwischen der Gruppe K2 (spät) und der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) war dies zu keinem Untersuchungszeitpunkt feststellbar. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen traten dagegen nur vereinzelt auf (Abb. 5.23e).

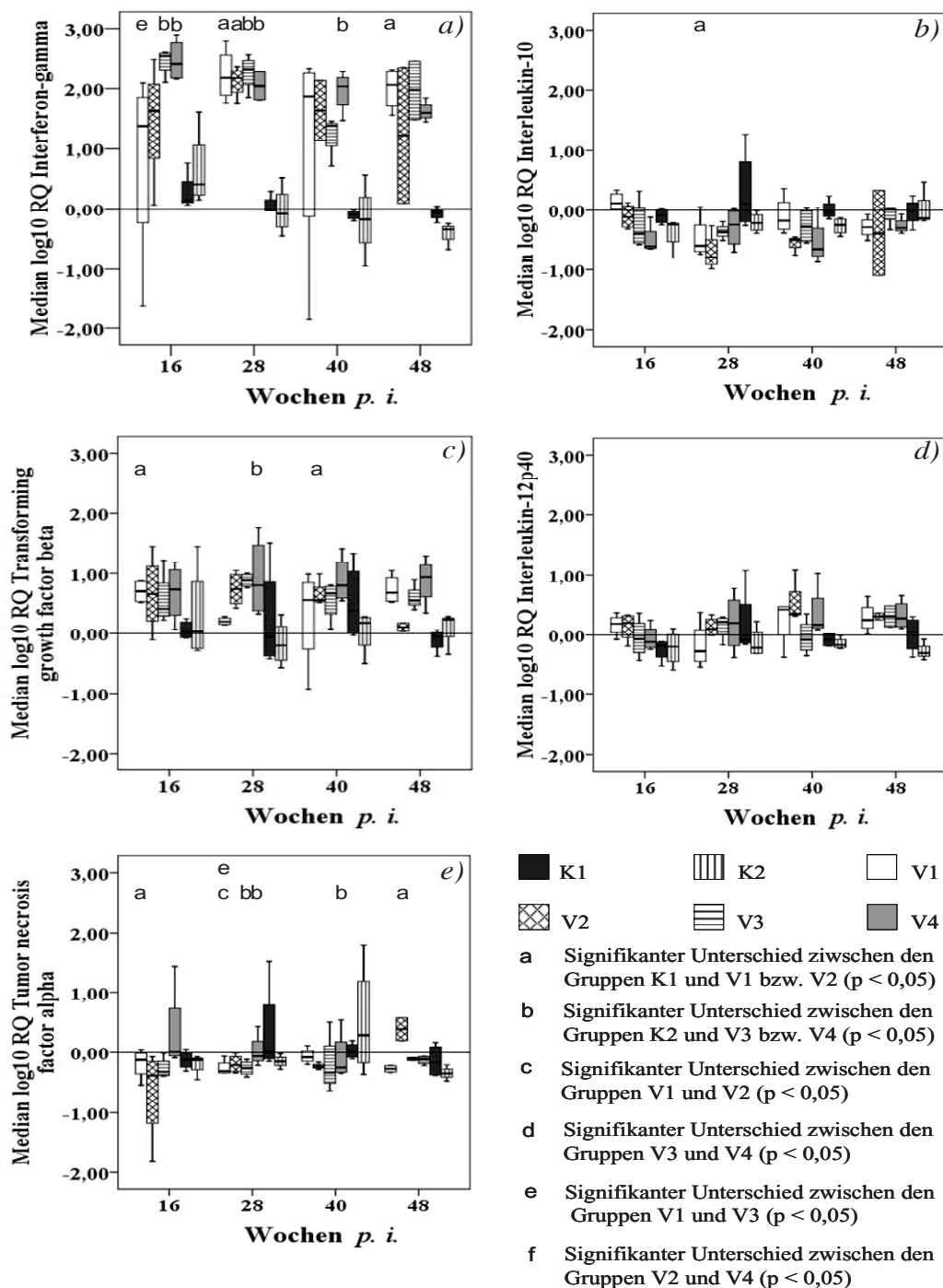


Abb. 5.23 Vergleich der Expression von a) Interferon-gamma, b) Interleukin -10, c) Transforming growth factor beta, d) Interleukin-12p40 und e) Tumor necrosis factor alpha durch *j*PPD-restimulierte PBMC zwischen den verschiedenen Tiergruppen. Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, *p* = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

## 5.2 Ergebnisse der Antikörperbestimmung

Die mittlere Antikörperkonzentration stieg zunächst in allen Versuchsgruppen zwischen den einzelnen BZP an. In den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) war die maximale Antikörpermenge in der 32. Woche *p. i.*, in den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) in den Wochen 24 (V3) bzw. 28 *p. i.* (V4) messbar. Anschließend wurde in den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis), V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) bis zum Versuchsende eine jeweils geringere mittlere Antikörperkonzentration im Vergleich zum vorherigen BZP nachgewiesen. Die mittlere Antikörpermenge innerhalb der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) stieg dagegen nach einer Plateauphase ab der 40. Woche *p. i.* erneut an. In den Wochen 44 und 48 *p. i.* befanden sich nur noch drei Tiere in dieser Gruppe. Die Durchschnittskonzentration die zu Beginn der Untersuchung in der achten Woche *p. i.* detektiert worden war, wurde in allen Versuchsgruppen auch in der 48. Woche *p. i.* nicht unterschritten (Abb. 5.24).

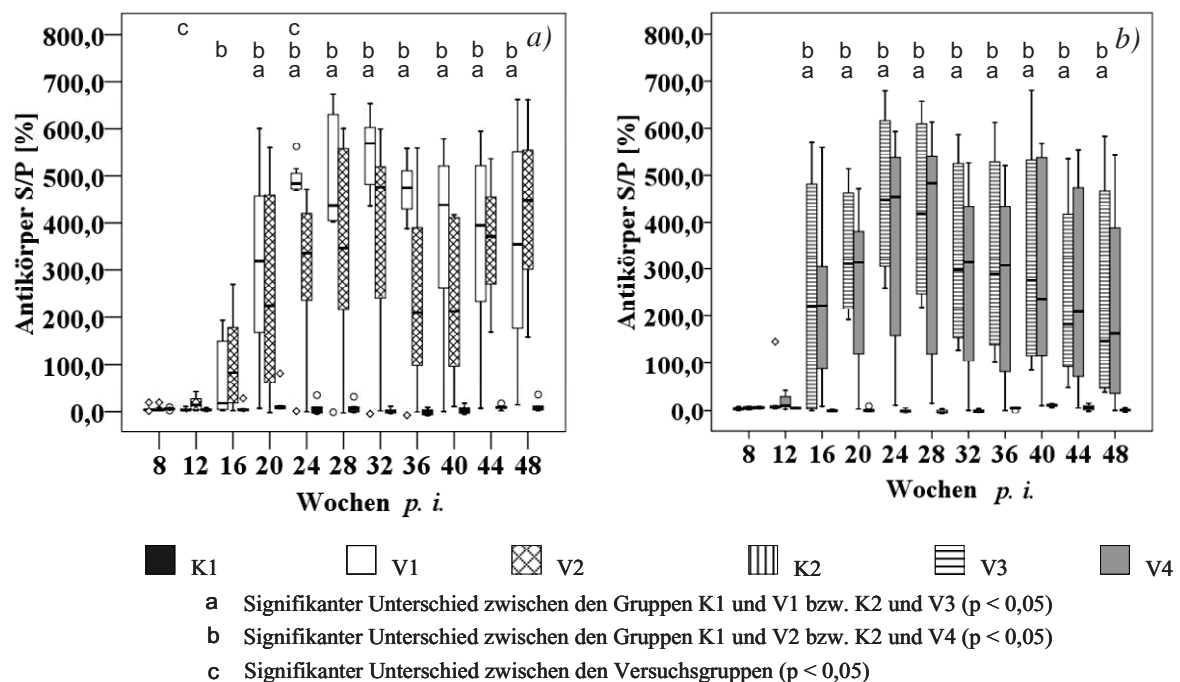


Abb. 5.24 Unterschiede zwischen den Antikörperreaktionen (als Verhältnis der Antikörperkonzentration in der Probe zu der der Positivkontrolle, S/P-Werte) der Kontroll- und der Versuchsgruppen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und b) der Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe



Im Serum der Tiere der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) wurden zwischen der 20. und 45. Woche *p. i.* im Mittel höhere Antikörperkonzentrationen als in dem von Tieren der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) nachgewiesen, ein signifikanter Unterschied trat nur in der 24. Woche *p. i.* auf (Abb. 5.24).

Mit Ausnahme der 40. Woche *p. i.* bildeten Tiere der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) durchschnittlich weniger Antikörper als die der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen konnten zu keinem Zeitpunkt ermittelt werden (Abb. 5.24). Ein Einfluss der Inokulationsdosis auf die Antikörpersekretion ist daher ausgeschlossen.

Auch im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen, die jeweils die gleiche Dosis erhalten hatten, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten inokuliert worden waren, wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) fiel, verglichen mit der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis), zwischen der 20. und 48. Woche *p. i.* eine im Mittel höhere Antikörperkonzentration auf (Abb. 5.25). Innerhalb der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) war dies im Vergleich zur Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) zwischen der 16. und der 28. Woche *p. i.* sowie in der 36. und 40. Woche *p. i.* zu beobachten (Abb. 5.25). Weiterhin auffällig ist die jeweils große Spannweite der Antikörpermenge innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

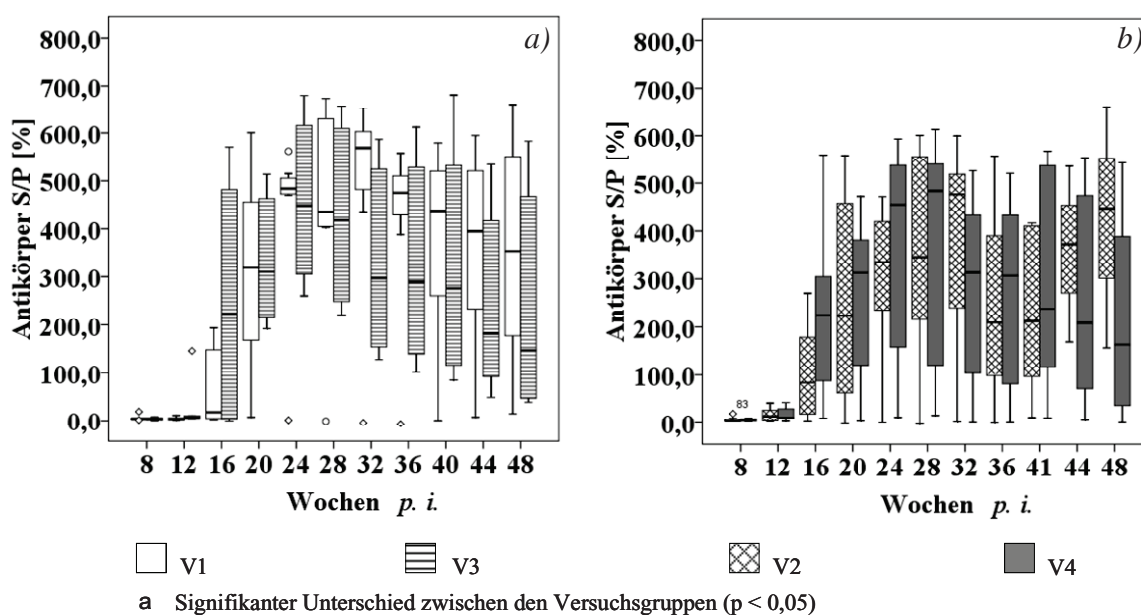


Abb. 5.25 Antikörperreaktion der MAP-inokulierten Tiere in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ziegen zum Zeitpunkt der Inokulation (als Verhältnis der Antikörperkonzentration in der Probe zu der der Positivkontrolle, S/P-Werte). Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) der Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

### 5.3 Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Zytokin- und Antikörperkonzentrationen sowie der Ausscheidung des Erregers mit dem Kot

Mit einer Ausnahme wurde entweder keine Korrelation zwischen den Zytokin- und Antikörperreaktionen sowie der Erregerausscheidung nachgewiesen oder nur ein Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r < 0,5$  festgestellt (Tab. 5.6). Für die Beziehung zwischen Antikörper- und IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde ein signifikanter Korrelationskoeffizient nach Spearman von  $r = 0,639$  berechnet.

Tab. 5.6 Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman und des Signifikanzniveaus für die Beziehungen zwischen IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot.

	IFN- $\gamma$	IL-10	AK	WI – MAP
<b>IL-10</b>	$r = -0,072$	-	$r = -0,176$	$r = 0,384$
	( $p = 0,225$ )	-	( $p < 0,001$ )	( $p < 0,001$ )
<b>AK</b>	$r = 0,639$	$r = -0,176$	-	$r = 0,208$
	( $p < 0,001$ )	( $p < 0,001$ )	-	( $p < 0,001$ )
<b>WI – MAP</b>	$r = 0,005$	$r = 0,384$	$r = 0,208$	-
	( $p = 0,930$ )	( $p < 0,001$ )	( $p < 0,001$ )	-

Erläuterungen:

IFN- $\gamma$	Interferon-gamma-Konzentration (ng/ml)
IL-10	Interleukin-10-Konzentration (U/ml)
AK	Antikörperreaktion als S/P-Verhältnis (%)
WI - MAP	Wachstumsindex, Intensität der MAP-Ausscheidung mit dem Kot
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
p	Signifikanzniveau

## **5.4 Darstellung der Zusammenhänge zwischen pathologischen Befunden, Erregernachweis im Kot und den Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand**

### **5.4.1 Gruppeneinteilung der Versuchstiere in Abhängigkeit von den histologischen Gewebeveränderungen und den Ergebnissen des immunhistochemischen Mykobakteriennachweises in den Darmabschnitten und den zugehörigen Lymphknoten**

Unabhängig von der Versuchsgruppe und entsprechend der Gewebeveränderungen an den Darmabschnitten wurden sieben Tiere in die Gruppe Score 0 (S0), dreizehn Ziegen in die Gruppe S1 und sieben in die Gruppe S2 eingeordnet (Kapitel 10.2.4, Tab. 10.30). In den beprobten Lymphknoten des Darmes wiesen vier Ziegen keine Gewebeveränderungen auf (Gruppe S0). Ein Tier (V3, spät, geringe Dosis) zeigte Veränderungen, die eine Zuordnung zum Score 1 erlaubten, weitere 22 Ziegen wurden der Gruppe S2 zugeteilt.

Im Darmgewebe von 23 Versuchstieren gelang kein Mykobakteriennachweis (Gruppe S0). Drei Tieren wurden der Gruppe S1 zugeordnet, ein Tier der Gruppe S2. Die Gruppe, in der keine Erreger in den Lymphknoten des Darmes feststellbar waren (S0), umfasste 20 Versuchstiere. Sechs weitere Tiere erhielten den S1, einem Versuchstier wurde der S2 zugeordnet (Kapitel 10.2.4, Tab. 10.30).

### **5.4.2 Vergleich der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung der Gewebeveränderungen am Darm**

Tiere ohne Veränderungen am Darmgewebe (S0) und solche mit geringen Veränderungen (S1) zeigten einen ähnlichen Verlauf und eine vergleichbare Intensität der MAP-Ausscheidung, so dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben. Während in der ersten Versuchshälfte eine deutliche Ausscheidung nachweisbar war, ließ sich MAP ab der 28. Woche *p. i.* nicht mehr oder nur noch in geringer Anzahl (S1) anzüchten. (Abb. 5.26 a)). Im Gegensatz dazu war in der Gruppe S2 zu allen BZP eine deutliche MAP-Ausscheidung nachweisbar, ab der 16. Woche *p. i.* war sie signifikant stärker als in den Gruppen S0 und S1. Innerhalb der Gruppen, insbesondere aber, wenn die Tiere starke Veränderungen am Darm aufwiesen (S2), war die Schwankungsbreite der Werte sehr groß. In den Gruppen S0 und S1 war dies vor allem in der Versuchsmitte zu beobachten, in der Gruppe S2 dagegen insbesondere in der zweiten Versuchshälfte (Abb. 5.26 a)).

Der Verlauf der Antikörperreaktion ähnelte sich in allen drei Gruppen bis zur 36. Woche *p. i.*, wobei der Höhepunkt der Reaktion bei Tieren mit starken Veränderungen am Darmgewebe vier Wochen später auftrat. Während in den Gruppen S0 und S1 mit fortschreitendem Versuchsverlauf stetig weniger Antikörper produziert wurden, stieg

die Konzentration in der Gruppe S2 in diesem Zeitraum noch einmal deutlich an. In der zweiten Versuchshälfte ließen sich die entstehenden Unterschiede statistisch nachweisen. Die mittleren Antikörperkonzentrationen der Gruppen S0 und S1 unterschieden sich nicht signifikant. Tendenziell zeigten Tiere mit leichten Gewebeveränderungen (S1) eine etwas stärkere Reaktion. In allen drei Gruppen, insbesondere aber in der Gruppe S1, war die Streuung der Antikörperreaktion sehr groß, lediglich in der Gruppe S2 verringerte sie sich mit zunehmender Versuchsdauer (Abb. 5.26 b).

Der Verlauf der IFN- $\gamma$ -Reaktion spiegelte den der Versuchsgruppen V1 (früh, geringe Dosis) bis V4 (spät, hohe Dosis) wider (Kapitel 5.1.6.7). In der zweiten Versuchshälfte bildeten Zellen der Tiere mit starken Darmveränderungen (S2) mehr Zytokin. Dies war jedoch lediglich im Vergleich zur Gruppe S1 statistisch nachweisbar, nicht jedoch verglichen mit der Gruppe S0, in der die Streuung der Werte sehr groß war (Abb. 5.26 c)).

Auch der Verlauf der IL-10-Reaktion der Gruppen S0 bis S2 glich dem der eigentlichen Versuchsgruppen (Kapitel 5.1.6.8). Der Höhepunkt der Reaktion trat in der Gruppe S2 vier Wochen später auf als in den Gruppen S0 und S1. Die Reaktion war signifikant stärker als in der Gruppe S1, aufgrund einer starken Wertestreuung - jedoch nicht im Vergleich zu Tieren ohne Gewebeveränderungen (S0). Während in der ersten Hälfte des Versuchs die Spannweiten der Werte sehr stark divergierten, streuten sie aufgrund der geringen Zytokinsekretion in der zweiten Hälfte weniger stark (Abb. 5.26 d)).

#### **5.4.3 Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung der Gewebeveränderungen in den Lymphknoten des Darmes**

Die Ausscheidung von MAP verlief in den Gruppen, die anhand der Gewebeveränderungen an den Lymphknoten definiert waren, in der ersten Versuchshälfte unterschiedlich. Während der WI von Ziegen der Gruppe S0 zu Versuchsbeginn am höchsten war und anschließend schnell bis zur 20. Woche *p. i.* sank, stieg die Ausscheidung im Gegensatz dazu in der Gruppe S2 zunächst und unterschied sich zwischen den Wochen 16 und 28 *p. i.* signifikant. Ab der 20. Woche *p. i.* waren in der Gruppe S0 fast ausschließlich WI von null zu berechnen. Bis zur 36. Woche *p. i.* schied keine der Ziegen den Erreger aus, erst danach zeigten einige Tiere wieder eine schwache Ausscheidung. Hatten Tiere starke Veränderungen an den Lymphknoten des Darmes (S2), schieden sie den Erreger deutlich länger aus als Tiere der Gruppe S0. In der zweiten Versuchshälfte dagegen ließ sich kein Median des WI größer null berechnen, es schieden jedoch immer einige Tiere MAP aus und die Streuung der Werte war deutlich höher als in der Gruppe S0.

Das Tier, dem der Score 1 zugeordnet war, folgte im Reaktionsverlauf bis zur 16. Woche *p. i.* der Gruppe S2, schied jedoch deutlich weniger Bakterien mit dem Kot aus.

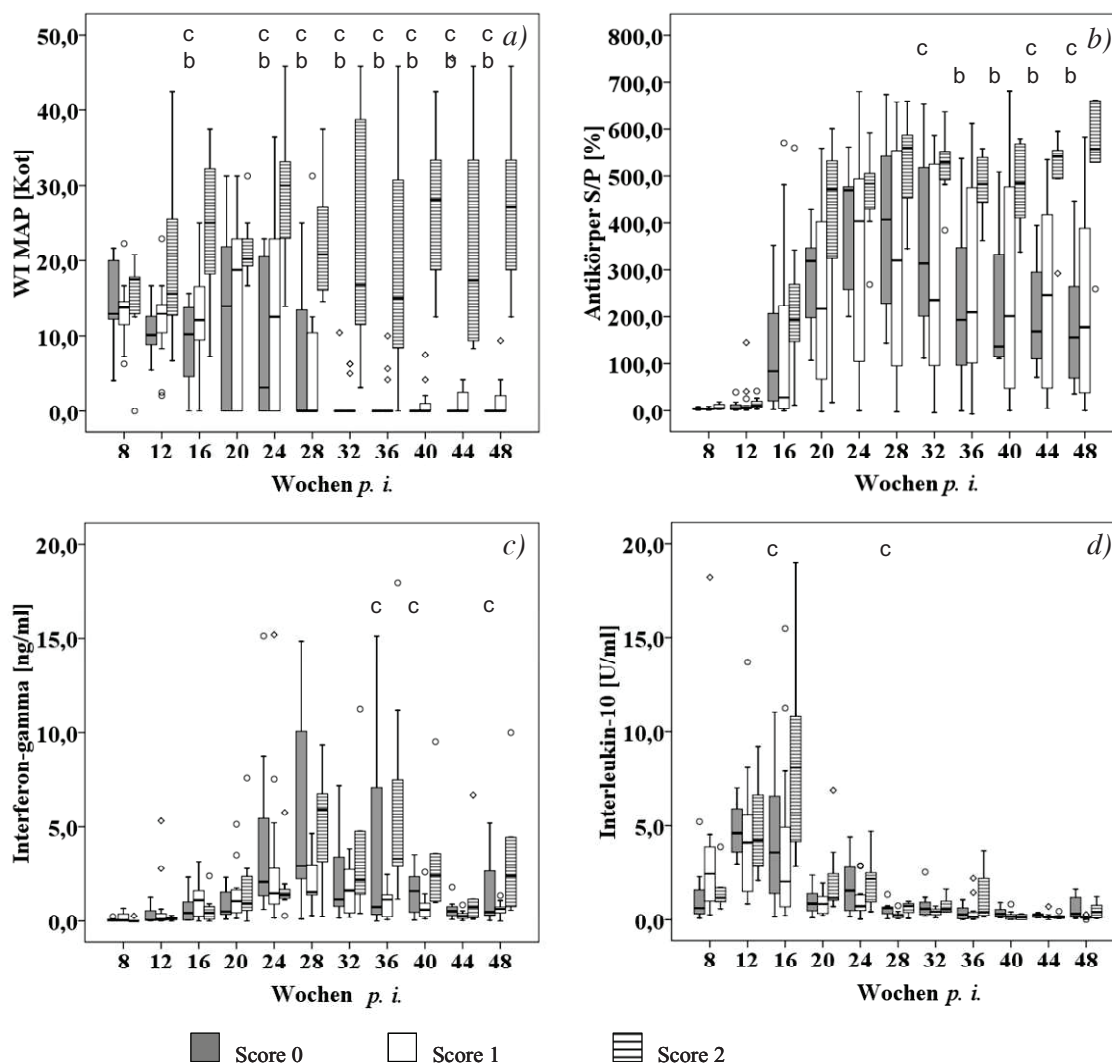


Abb. 5.26 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Ausdehnung und dem Schweregrad der Gewebeveränderungen am Darm (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit)

Ab der 20. Woche  $p. i.$  war MAP aus dem Kot dieser Ziege nicht mehr anzüchtbar (Abb. 5.27 a)). Antikörper wurden bei der Ziege mit dem Score 1 ab der 16. Woche  $p. i.$  festgestellt und damit später als in den anderen beiden Gruppen. Von diesem Zeitpunkt an fiel die Reaktion bis zum Versuchsende stetig ab. Die Antikörperkonzentration lag zwischen den mittleren Werten in den Gruppen S0 und S2. In den Gruppen S0 und S2 stieg die Reaktion zunächst deutlich an um dann ebenfalls bis zum Versuchsende kontinuierlich abzufallen. Der Zeitpunkt der maximalen Reaktion trat in Gruppe S2 jedoch deutlich später auf als in Gruppe S0. Insgesamt war die Antikörperreaktion in

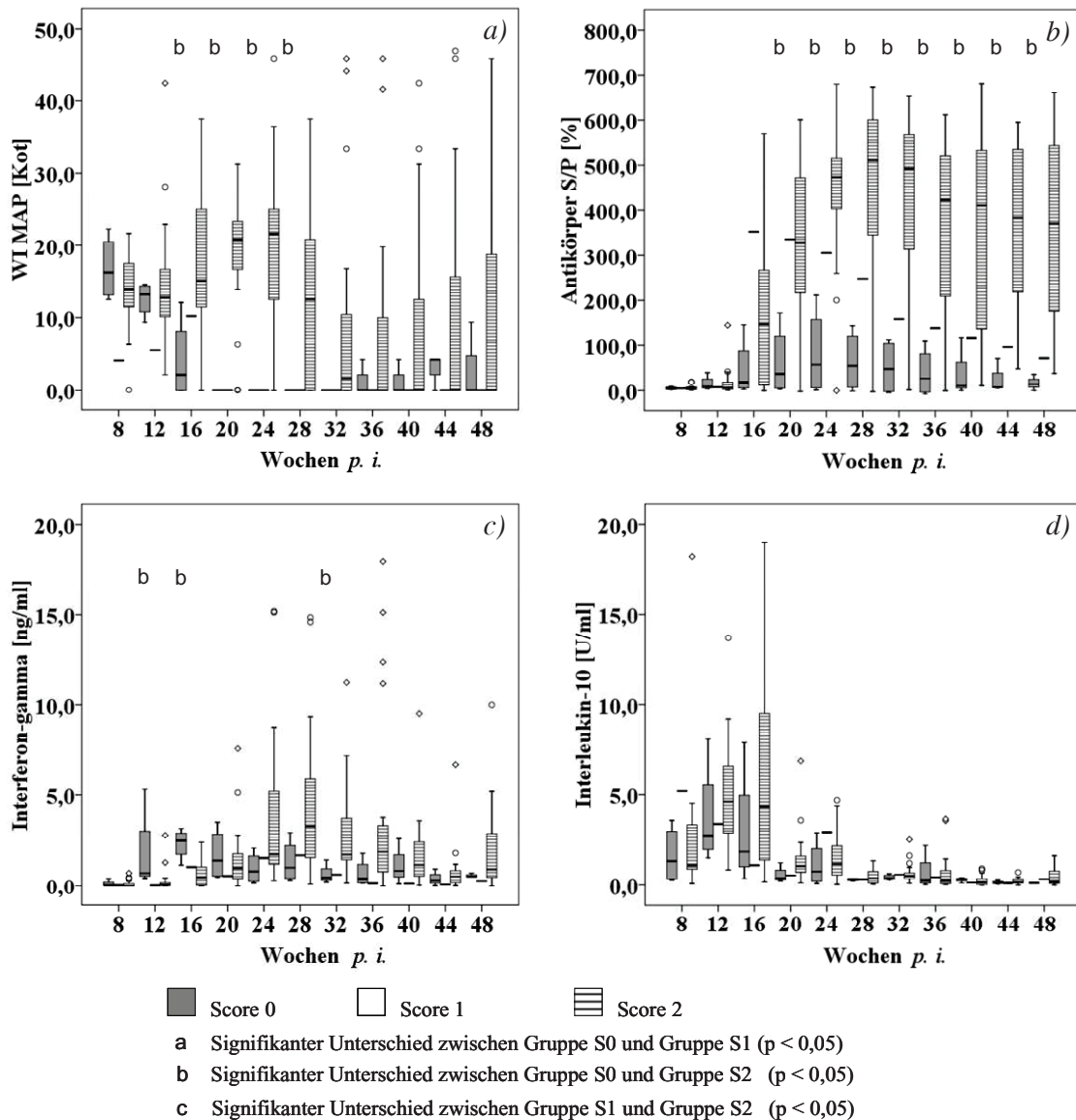


Abb. 5.27 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Ausdehnung und dem Schweregrad der Gewebeeränderungen in den Lymphknoten des Darmes (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezüchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit)

dieser Gruppe signifikant stärker, auch die Streuung innerhalb der Gruppen war größer als bei Tieren ohne Lymphknotenveränderungen (Abb. 5.27 b)).

Während die IFN- $\gamma$ -Sekretion von Tieren ohne Gewebeeränderungen an den Lymphknoten des Darmes frühzeitig anstieg und in der 16. Woche  $p. i.$  ihren Höhepunkt erreichte, trat dieser in der Gruppe S2 erst in der Mitte des Versuchszeitraumes auf. In der Gruppe S0 sanken die Werte anschließend und blieben

bis zum Versuchsende auf niedrigem Niveau. Auch bei den Ziegen mit starken Gewebeveränderungen an den Lymphknoten (S2) sanken die Werte in der zweiten Versuchshälfte ab, die Intensität der Zytokinsekretion war aber stärker ausgeprägt als in der Gruppe S0. Das Tier mit dem Score 1 folgte im Verlauf der Gruppe S2 (Abb. 5.27 c)).

Signifikante Unterschiede in der IL-10-Reaktion existierten zwischen den Gruppen S0 und S2 nicht. Auch im Verlauf waren keine wesentlichen Unterschiede nachweisbar (Abb. 5.27 d)). Das Tier mit dem Score 1 zeigte die stärkste IL-10-Reaktion zu Versuchsbeginn und damit vier bzw. acht Wochen früher als die anderen beiden Gruppen. Sie lag zu diesem Zeitpunkt deutlich über den Maxima der gemessenen IL-10-Konzentration der anderen beiden Gruppen.

#### **5.4.4 Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung des Mykobakteriennachweises am Darm**

Bis zur 36. Woche *p. i.* unterschied sich der Reaktionsverlauf zwischen den Gruppen S0 und S1 nur unwesentlich. Im Gegensatz zur Gruppe S1 schieden einige Tiere der Gruppe, bei der keine Mykobakterien im Darm nachweisbar waren, den Erreger auch nicht mit dem Kot aus. Ab der 28. Woche *p. i.* war MAP in der Gruppe S0 bis zum Versuchsende kaum oder gar nicht mehr anzüchtbar. Damit unterschied sie sich von der Gruppe S1, die ab der 36. Woche wieder einen Anstieg der Ausscheidung zeigte (Abb. 5.28 a)). Der WI von Tier Nummer sieben (S2) lag ab der zwölften Woche *p. i.* fast ausnahmslos oberhalb derer der Gruppen S0 und S1.

Zwischen der Antikörperreaktion der verschiedenen Gruppen war kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Die Reaktion der Gruppe S0 zeigte einen kurvenförmigen Verlauf mit dem Höhepunkt in der 32. Woche *p. i.* (Abb. 5.28 b)). Bis zu diesem Zeitpunkt verlief auch die Reaktion in den Gruppen S1 und S2 ähnlich. Danach jedoch folgte ein erneuter Anstieg in der gemessenen Antikörperkonzentration. Im Unterschied zur Gruppe S1 war die Streuung in der Gruppe ohne Mykobakteriennachweis deutlich stärker.

Signifikante Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion traten zwischen den Gruppen nicht auf. Auch der Verlauf war in allen Gruppen ähnlich kurvenförmig mit einem erneuten Anstieg zum Versuchsende. Eine Ausnahme bildet in der 36. Woche *p. i.* die Gruppe S1, in der die Reaktion zu diesem BZP besonders stark war. Auch die Streuung der Werte innerhalb der Gruppe war – verglichen mit den übrigen BZP - zu diesem Zeitpunkt außergewöhnlich groß (Abb. 5.28 c)).

Die IL-10-Reaktion von Zellen der drei Gruppen divergierte nicht so stark, dass es statistisch nachweisbar war (Abb. 5.28 d)). Alle Gruppen zeigten einen ähnlichen Verlauf mit einem zeitlich unterschiedlichen Reaktionshöhepunkt. In der 16. Woche

*p. i.* war die Zytokinsekretion bei dem Tier mit dem Score 2 im Gruppen- und Zeitpunktvergleich sehr hoch (Abb. 5.28 d)).

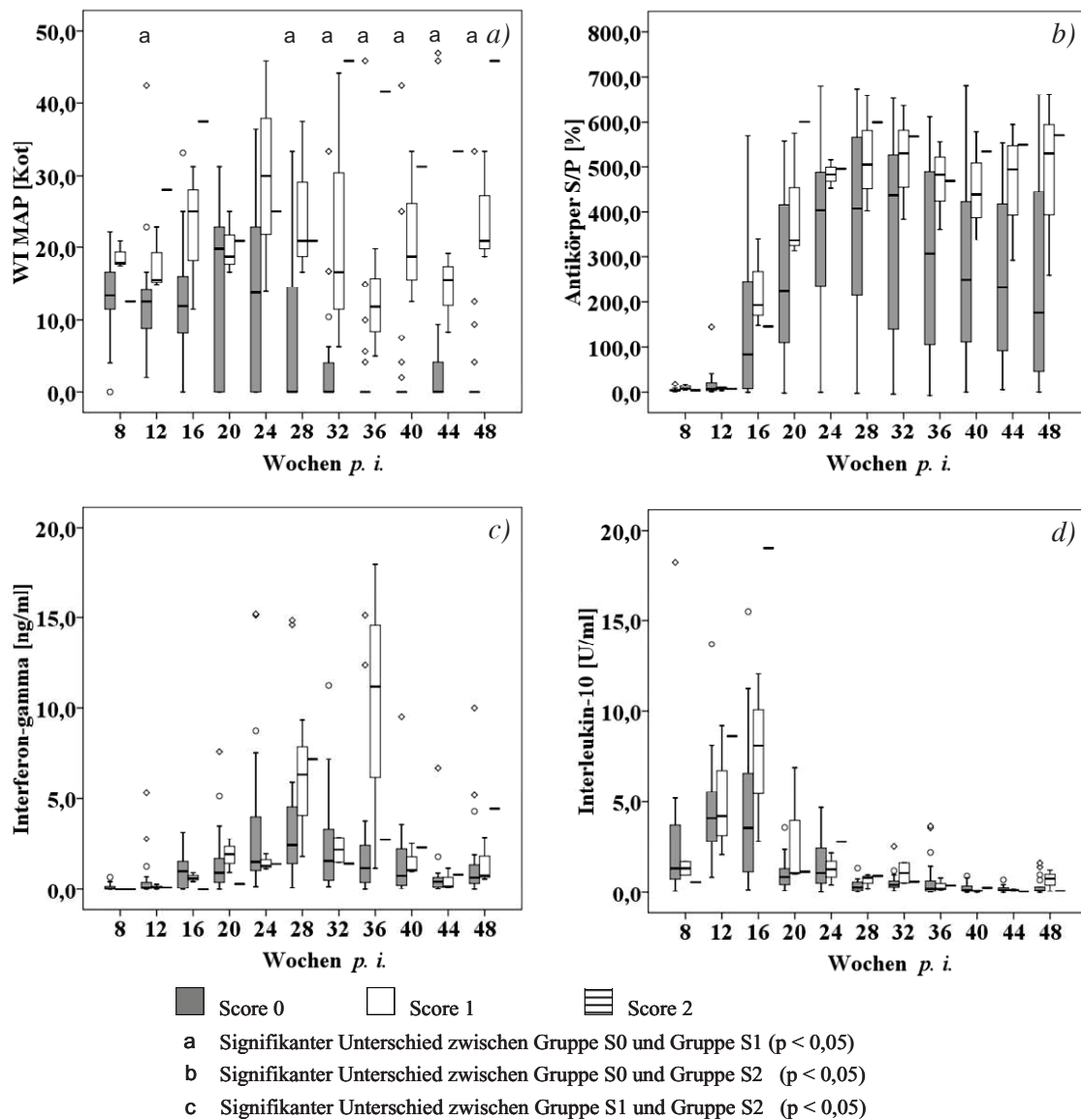


Abb. 5.28 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Verteilung des Mykobakteriennachweises und der erfassten semiquantitativen Menge des Erregers im Darm (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen: *p* = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem, *S* = Score, *WI* = Wachstumsindex von MAP (angezchtet aus Kotproben), *U* = Einheit (unit)



#### **5.4.5 Verlauf der IFN- $\gamma$ -, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot in Abhängigkeit von der Ausprägung des Mykobakteriennachweises in den Lymphknoten des Darmes**

Signifikante Unterschiede in der MAP-Ausscheidung zwischen den Gruppen S0 und S1 traten nur in der 16. Woche *p. i.* auf, in der Tiere der Gruppe S1 mehr Erreger ausschieden. Auch der Ausscheidungsverlauf war in beiden Gruppen ähnlich. Ab der 28. Woche *p. i.* gab es in der Gruppe S0 stets einige Tiere, die MAP nicht mehr in nachweisbarer Menge mit dem Kot ausschieden, in der Gruppe S1 war dies erst ab der 36. Woche *p. i.* nachweisbar. Die Ausscheidung von Tier Nummer sieben schwankte stark. Die maximale Erregermenge (WI = 45,83) wurde in der 32. und 48. Woche *p. i.* und damit deutlich später als in den Gruppen S0 und S1 ausgeschieden. Der WI von Ziege Nummer sieben lag zu den meisten Beprobungszeitpunkten, insbesondere in der zweiten Versuchshälfte deutlich, oberhalb der der Gruppen S1 und S0 (Abb. 5.29 a)).

Die Antikörperproduktion unterschied sich zwischen den Gruppen S0 und S1 nicht in der Verlaufsform, aber sowohl im Zeitpunkt des Höhepunktes der Reaktion, als auch in der Intensität. Insbesondere in der späteren Versuchshälfte produzierten Ziegen mit einer nachgewiesenen geringen Anzahl MAP in den Lymphknoten des Darmes signifikant mehr Antikörper als solche, bei denen ein Nachweis nicht gelungen war (S0) (Abb. 5.29 b)). Tier Nummer sieben (S2) bildete tendenziell ab der 16. Woche *p. i.* mehr Antikörper als Tiere der Gruppe S0. Im Unterschied zu den anderen beiden Gruppen stieg die gemessene Antikörperproduktion zum Versuchsende noch einmal an (Abb. 5.29 b)).

Die IFN- $\gamma$ -Reaktion war in allen drei Gruppen durch einen Anstieg bis zur Versuchsmitte mit anschließendem Abfall bis zur 44. Woche *p. i.* und einem erneutem geringgradigen Anstieg der mittleren Konzentration gekennzeichnet. In den Wochen 28 und 32 *p. i.* fällt eine besonders starke Reaktion in der Gruppe S1 auf. Wie ohnehin in der zweiten Versuchshälfte zu beobachten war, schwanken die Werte innerhalb der Gruppe hier besonders stark. Zu einzelnen BZP statistisch nachweisbar war die höhere Sekretion von IFN- $\gamma$  ab der 28. Woche *p. i.* (Abb. 5.29 c)).

Unterschiede in Verlauf und Intensität der IL-10-Reaktion zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar. Zwar traten zu zwei BZP signifikante Unterschiede auf, doch während 36 Wochen *p. i.* Zellen der Gruppe S1 weniger IL-10 sekretierten als die der Gruppe S0, war es 48 Wochen *p. i.* umgekehrt (Abb. 5.29 d)).

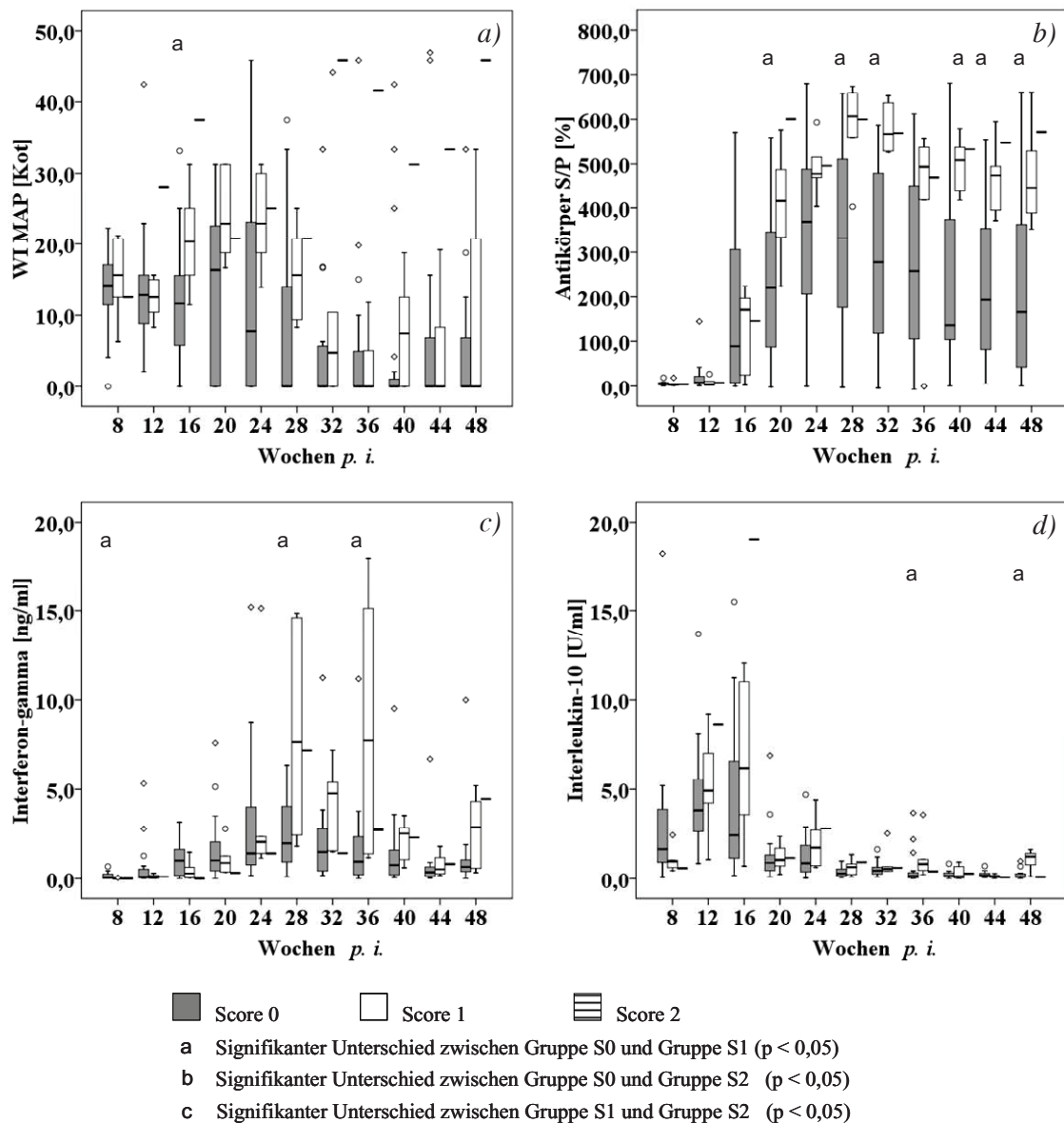


Abb. 5.29 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Verteilung des Mykobakteriennachweises und der erfassten semiquantitativen Menge des Erregers in den Lymphknoten des Darmes (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezuechtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit)

## 5.5 Auswertungen der Daten zu diagnostischen Fragestellungen

### 5.5.1 Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die Neutralisation von sekretiertem IL-10 in Überständen unstimulierter und jPPD-restimulierter PBMC

In den Wochen 20, 32 und 44  $p. i.$  fand keine Neutralisation von IL-10 mittels Antikörper statt, so dass in den Abbildungen die entsprechenden Werte fehlen.

Unstimulierte PBMC der Versuchs- und Kontrollgruppen sekretierten im gesamten Versuchsverlauf nur geringe Mengen IFN- $\gamma$ .

Nicht restimulierte Zellen der Gruppen K1 (früh) und K2 (spät) unterschieden sich unabhängig davon, ob sie ohne Antikörper inkubiert worden waren, oder ob ein Zusatz des IL-10-Neutralisationsantikörpers CC320 bzw. der IgG-Isotyp-Kontrolle erfolgte, nicht in der Zytokinsekretion.

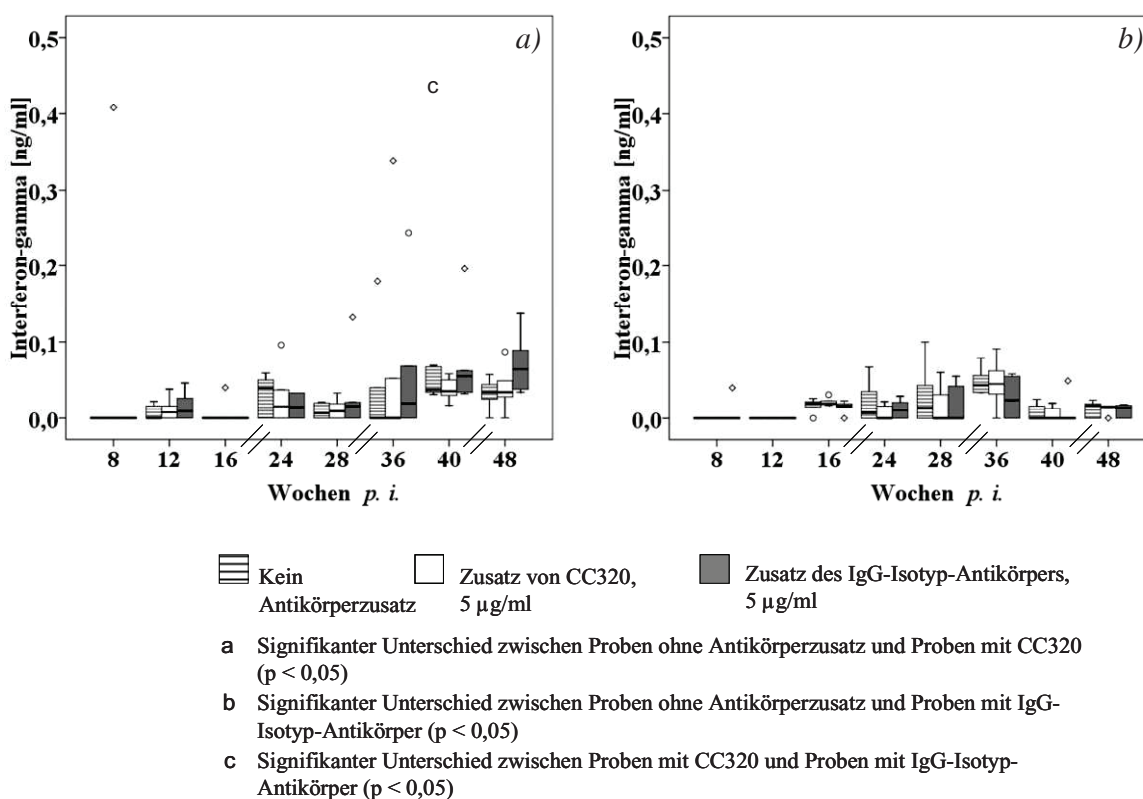


Abb. 5.30 Vergleich der IFN- $\gamma$ -Sekretion jPPD-restimulierter PBMC, denen ein IL-10-Neutralisationsantikörper (CC320) oder ein IgG-Isotyp-Kontrollantikörper zugesetzt worden war mit solchen, ohne Antikörperzusatz. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1 (3. Lebensstag) und b) K2 (42. Lebensstag). In den Wochen 20, 32 und 44 p. i. wurde keine IL-10-Neutralisation durchgeführt, die fehlenden Werte sind nicht dargestellt. Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem

In allen Versuchsgruppen bildeten unstimulierte PBMC ohne Antikörperzusatz tendenziell ab der 16. (V3, spät, geringe Dosis und V4, spät, hohe Dosis), 24. (V1, früh, geringe Dosis) oder 28. Woche p. i. (V2, früh, hohe Dosis) mehr IFN- $\gamma$  als solche, denen einer der beiden Antikörper zugesetzt worden war. Zwischen der 24. und 28. Woche p. i. stellten sich die Differenzen im Vergleich zur IgG-Isotyp-Kontrolle und zu CC320 teilweise signifikant dar (Daten nicht gezeigt). Im Mittel sekretierten PBMC von Zellen mit der IgG-Isotyp-Kontrolle weniger Zytokin als solche unter Zusatz von CC320. Dies stellte sich jedoch lediglich in den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V3 (spät, geringe Dosis) zu maximal zwei BZP als statistisch verifizierbar heraus (Daten nicht gezeigt).

Nach einer PBMC-Restimulation mit jPPD waren in beiden Kontrollgruppen überwiegend keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen ohne Antikörperzusatz und solchen mit CC320 bzw. der IgG-Isotyp-Kontrolle nachweisbar (Abb. 5.30).

Der Zusatz des CC320-Neutralisationsantikörpers führte in beiden früh inokulierten Versuchsgruppen im Vergleich zu jPPD-restimulierten PBMC ohne Antikörperzusatz und solchen mit IgG-Isotyp-Kontrolle zu einer stärkeren Freisetzung von IFN- $\gamma$ . In der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) war dies mit Ausnahme der 36. Woche *p. i.* ab dem zweiten BZP statistisch nachweisbar. In der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) wurden die Unterschiede nur in der ersten Versuchshälfte deutlich, da ab der 28. Woche *p. i.* die Streuung innerhalb der Gruppe deutlich stärker ausfiel. Zur überwiegenden Anzahl der BZP, zu denen sich Zellen ohne Antikörper und solche mit CC320 signifikant unterschieden, sekretierten in beiden Gruppen auch PBMC mit der IgG-Isotyp-Kontrolle signifikant weniger IFN- $\gamma$  als solche, denen CC320 zugegeben worden war. Zellen ohne Antikörperzusatz und solche mit IgG-Isotyp-Kontrolle unterschieden sich dagegen nicht signifikant (Abb. 5.31).

Bei beiden spät inokulierten Gruppen spiegelten sich die Ergebnisse der Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V2 (früh, hohe Dosis) tendenziell wieder, die Unterschiede waren jedoch seltener signifikant (Abb. 5.31). Besonders auffällig war dies in Gruppe V3 (spät, geringe Dosis). In Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) trat zum letzten BZP im Vergleich zu restimulierten PBMC ohne Antikörperzusatz eine signifikant niedrigere IFN- $\gamma$ -Antwort auf, wenn den PBMC die IgG-Isotyp-Kontrolle zugegeben worden war. Dies ließ sich unabhängig vom BZP in keiner anderen Gruppe nachvollziehen.

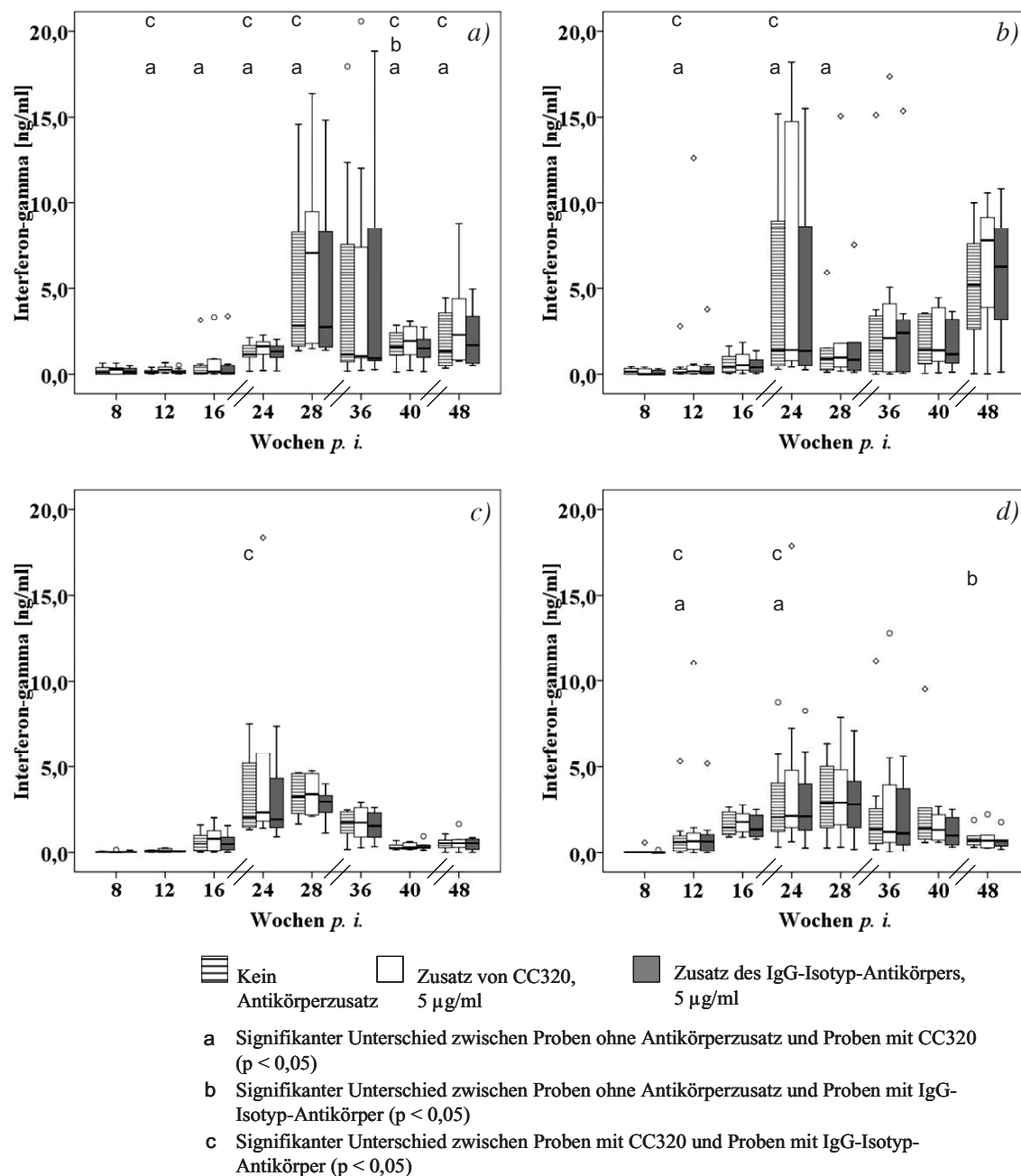


Abb. 5.31 Vergleich der IFN- $\gamma$ -Sekretion jPPD-restimulierter PBMC, denen ein IL-10-Neutralisationsantikörper (CC320) oder ein IgG-Isotyp-Kontrollantikörper zugesetzt worden war mit solchen, ohne Antikörperzusatz. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe VI (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). In den Wochen 20, 32 und 44 p. i. wurde keine IL-10-Neutralisation durchgeführt, die fehlenden Werte sind nicht dargestellt. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem

### 5.5.2 Unterscheidung inokulierter und nicht inokulierter Tiere anhand von Genexpressionsprofilen

Die Darstellung der Expression verschiedener Zytokingene von inokulierten und nicht inokulierten Thüringer Wald Ziegen im Farbprofil sollte eventuell vorhandene Expressionsmuster aufdecken, anhand derer infizierte Tiere von gesunden unterschieden werden können. Dabei wurden verschiedene Expressionsstufen festgelegt, die sich jeweils um eine Zehnerpotenz unterschieden (Abb. 5.32). Ob innerhalb einer Gruppe ein Gen durch jPPD-restimulierte PBMC im Vergleich zu unstimulierten Zellen herauf- (Stufe 2-4) oder herabreguliert (Stufe 1) wurde, entschied sich anhand der Lage des Medianes.

Deutliche Unterschiede im Farbprofil zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen in der Expression der mRNA ließen sich nur für IFN- $\gamma$  zeigen. Seine Expression verstärkte sich je nach Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollgruppen um bis zu drei Stufen.

IL-10 wurde sowohl in den Kontroll- als auch in den Versuchsgruppen auf den Stufen 1 bis 2 exprimiert. Ältere Tiere der Gruppen K2, V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) regulierten die Expression der mRNA zu allen Zeitpunkten herab. Die Expression von TGF $\beta$  war gegenüber den Kontrollgruppen in den Versuchsgruppen lediglich in der 28. Woche *p. i.* eindeutig stärker. Häufiger als in den Kontrollgruppen wurde die Expression der Boten (*messenger m*)RNA von IL-12p40 verstärkt. Die Erhöhung um eine Stufe war jedoch gering. Zellen aller Gruppen exprimierten TNF $\alpha$  auf den Stufen 1 oder 2. Zwar wurde die mRNA in den Versuchsgruppen häufiger herabreguliert als in den Kontrollgruppen, die Zeitpunkte unterschieden sich jedoch zwischen den Gruppen.

Eine Unterscheidung zwischen Versuchs- und Kontrolltieren konnte ausschließlich anhand der IFN- $\gamma$ -Reaktion erfolgen. Zog man die anderen untersuchten Zytokine gemeinsam zur Unterscheidung zwischen inokulierten Tieren und Kontrollen heran, stellte sich insgesamt kein einheitliches Zytokinprofil innerhalb der Versuchsgruppen dar, das eine Differenzierung erlaubte.

### 5.5.3 Effekte einer PBMC-Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ und IL-10

Die IFN- $\gamma$ -Sekretion war unabhängig vom zugegebenen rekombinanten MAP-Protein gering. In den Kontrollgruppen und der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) war zu einigen Zeitpunkten kein Zytokinnachweis möglich.

LacZ induzierte im gesamten Versuchszeitraum eine geringgradige und unspezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion. In allen Versuchsgruppen wurde zur überwiegenden Anzahl der BZP im Mittel eine höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration gemessen, wenn den PBMC LacZ anstelle eines rekombinanten Proteins zugesetzt worden war. Dies ließ sich in den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis), V2 (hohe Dosis) und der Gruppe K1 vereinzelt zu unterschiedlichen BZP statistisch nachweisen. Besonders auffällig waren

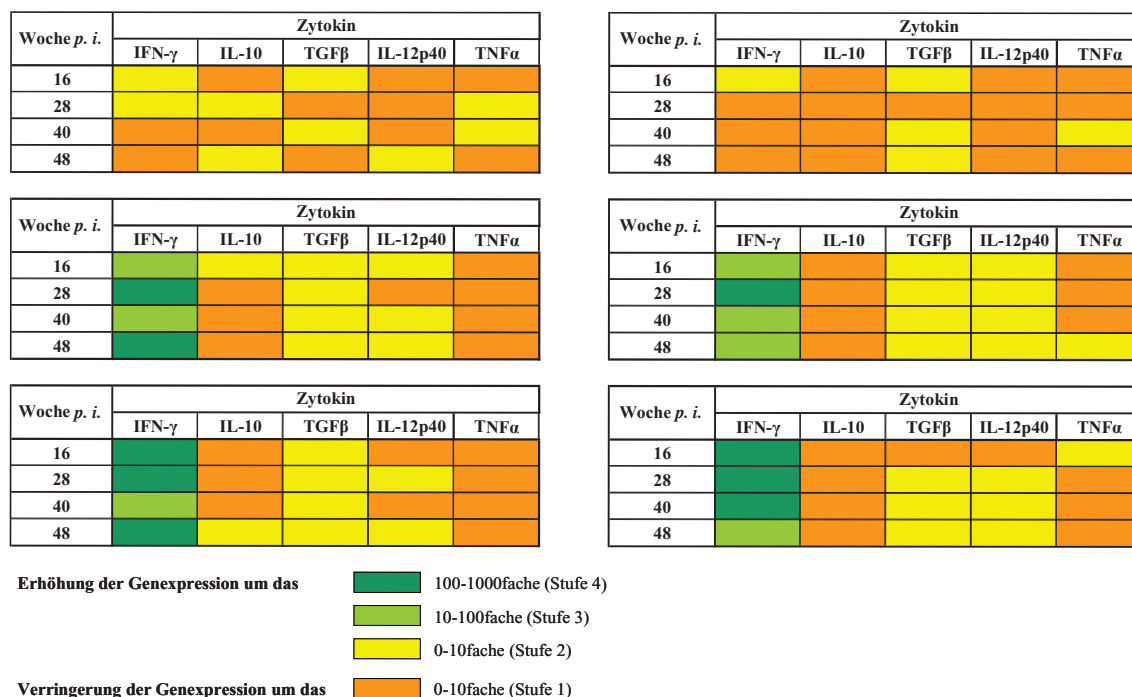


Abb. 5.32 Darstellung der Genexpression verschiedener Zytokine im Vergleich jPPD-restimulierter PBMC zu unstimulierten Zellen der Gruppen K1 und K2 (3. bzw. 42. Lebenstag, obere Reihe links bzw. rechts), der Gruppen V1 und V2 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  bzw.  $4 \times 10^9$  KbE MAP, mittlere Reihe links bzw. rechts) und der Gruppen V3 und V4 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  bzw.  $4 \times 10^9$  KbE MAP, untere Reihe links bzw. rechts) im Farbprofil. Erläuterungen: IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, IL = Interleukin, p. i. = post inoculationem, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha

die Unterschiede jedoch zum ersten untersuchten BZP. Der Unterschied war, verglichen mit MAP1204-restimulierten PBMC, in allen drei Gruppen signifikant. In den Gruppen K1 (früh) und V2 (früh, hohe Dosis) traf dies jeweils noch auf ein weiteres Protein zu (Abb. 5.33).

Zwischen den eingesetzten Proteinen ergaben sich unabhängig von Tiergruppe und BZP keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IFN- $\gamma$ -Sekretion. Lediglich in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) führte der Zusatz von MAP3481 zu den PBMC zu einer signifikant höheren IFN- $\gamma$ -Ausschüttung als eine Restimulation mit MAP1204 (Abb. 5.33, Kapitel 10.2.5, Tab. 10.31).

Signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Zeitpunkten traten nach Restimulation mit den einzelnen rekombinanten MAP-Proteinen nur vereinzelt auf (Daten nicht gezeigt).

Zellen, die mit jPPD restimuliert worden waren, produzierten in allen Versuchsgruppen mehr IFN- $\gamma$  als solche, denen eines der rekombinanten Proteine zugegeben worden war. In den Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) war der Unterschied zu allen drei BZP statistisch nachweisbar. In der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) war lediglich der Unterschied zu MAP3481 44 Wochen p. i. nicht signifikant. In Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) zeigte sich zu diesem Zeitpunkt unabhängig vom MAP-

Protein kein signifikanter Unterschied. Die Schwankungen innerhalb der Gruppe waren zu diesem BZP größer als zu den übrigen, da nur noch drei Tiere in der Gruppe verblieben waren. Zwar lag auch in beiden Kontrollgruppen der Median jPPD-restimulierter PBMC meist über dem von Zellen, denen ein rekombinantes Protein zugesetzt wurde, signifikant waren die Unterschiede aber nur in der Gruppe K1 (früh) 32 Wochen *p. i.* unabhängig davon, welches Protein betrachtet wurde (Abb. 5.34).

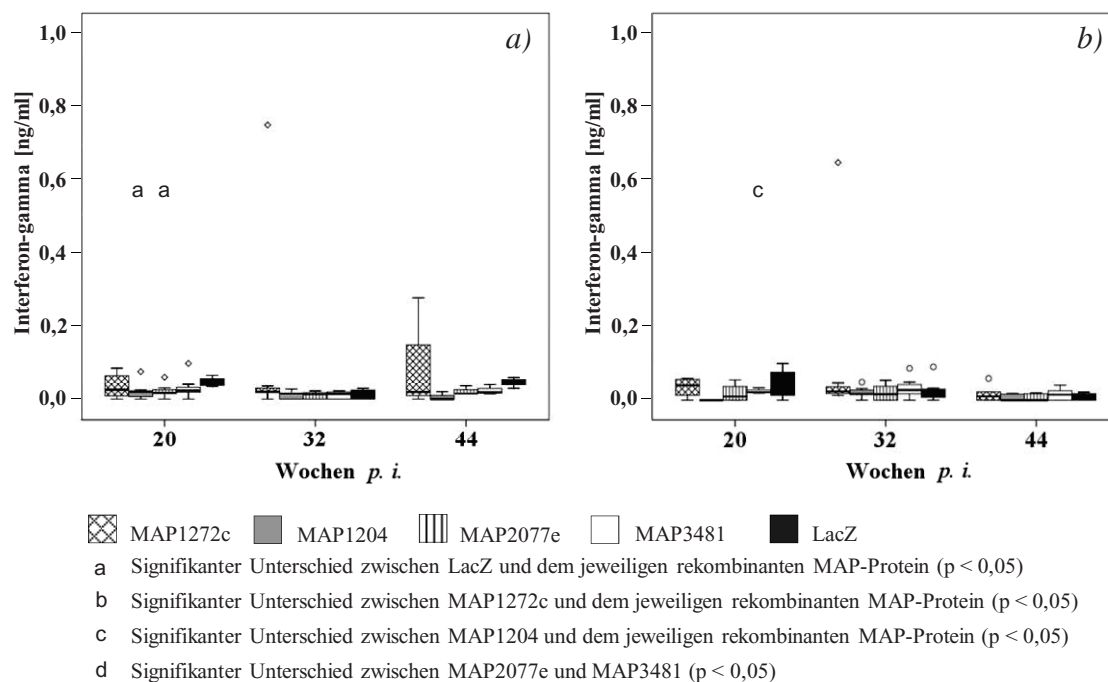


Abb. 5.33 Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC die mit jeweils verschiedenen rekombinanten MAP-Proteinen oder der unspezifischen Vektorkontrolle LacZ restimuliert worden waren. Exemplarisch ausgewählt wurden a) die Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und b) die Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau, *p. i.* = post inoculationem

Im Gruppenvergleich zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede. Zellen der Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V2 (früh, hohe Dosis) bildeten im Vergleich zur Gruppe K1 (früh) tendenziell mehr IFN- $\gamma$ , die Unterschiede waren jedoch nur für einzelne Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten statistisch nachweisbar. Vergleicht man die Zytokinsekretion der spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) mit der Gruppe K2 nach der Restimulation mit unterschiedlichen rekombinanten MAP-Proteinen ließen sich keine signifikanten Differenzen nachweisen. Allerdings lag der Median der Kontrollgruppen meist unterhalb von dem der Versuchsgruppen. Auch ein Einfluss von Inokulationszeitpunkt und Inokulationsdosis war für die getesteten Proteine nicht nachweisbar. Lediglich nach Restimulation mit MAP1204 ließ sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) bzw. V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) in der 20. Woche *p. i.* nachweisen (Tab. 10.31).

Nach Messung der IL-10-Menge stellte sich heraus, dass LacZ nicht zu einer unspezifischen IL-10-Sekretion führte. In der überwiegenden Anzahl der BZP lag die



IL-10-Konzentration in allen Gruppen nach einer Restimulation mit einem rekombinanten Protein über der nach Zugabe von LacZ. Signifikante Unterschiede traten in beiden früh inokulierten Gruppen 20 Wochen *p. i.* im Vergleich zu allen MAP-Proteinen, mit Ausnahme von MAP2077 in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis), auf. In der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen, in den Gruppen V4 (spät, hohe Dosis) und K2 (spät) nur nach 44 Wochen *p. i.* für eines (V4) bzw. drei (K2) MAP-Proteine (Abb. 5.35).

Es ließ sich nicht ableiten, dass eines der rekombinanten MAP-Proteine zuverlässig zu einer stärkeren oder schwächeren IL-10-Sekretion führte. Zwar traten zu einzelnen BZP in allen Gruppen Unterschiede zwischen den verwendeten Proteinen auf, sie waren jedoch zu unterschiedlichen BZP nachweisbar. Weiterhin war nicht nachvollziehbar, ob ein MAP-Protein im Vergleich zu einem anderen eine eindeutig stärkere oder schwächere Sekretion des Zytokins induzierte, da die gemessenen Werte zwischen den BZP und den Gruppen zu sehr schwankten. Eine Ausnahme stellte MAP2077e in den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) dar, das, verglichen mit den übrigen Proteinen, in der 32. Woche *p. i.* ausschließlich eine signifikant höhere Zytokinsekretion induzierte. In den Gruppen K1 (früh), V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) spiegelte sich dies als Tendenz wieder (Abb. 5.35, Kapitel 10.2.5, Tab. 10.32).

Zwischen den getesteten BZP kam es jeweils zu einem Abfall der IL-10-Konzentration in den Zellkulturüberständen. Diese in allen Gruppen vorhandene Tendenz war unabhängig vom verwendeten rekombinanten Protein zu beobachten. Mit Ausnahme der Gruppen K2 (spät) und V2 (früh, hohe Dosis) waren Unterschiede zwischen mindestens zwei getesteten BZP statistisch verifizierbar. Besonders auffällig ist, dass sich in der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis) unabhängig vom zugegebenen Protein alle BZP signifikant voneinander unterschieden (Kapitel 10.2.5, Tab. 10.32).

Eine Restimulation mit den verschiedenen rekombinanten MAP-Proteinen führte im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu einer verstärkten IL-10-Freisetzung. Eine Ausnahme stellte die 44. Woche *p. i.* in den Gruppen K2 (spät) und V4 (spät, hohe Dosis) dar, wo unstimulierte Zellen mehr IL-10 sekretierten. Dieser Effekt war unabhängig vom Protein und in allen Gruppen zu einer unterschiedlichen Anzahl von BZP statistisch verifizierbar. Besonders deutlich war dies in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) zu beobachten (Abb. 5.36).

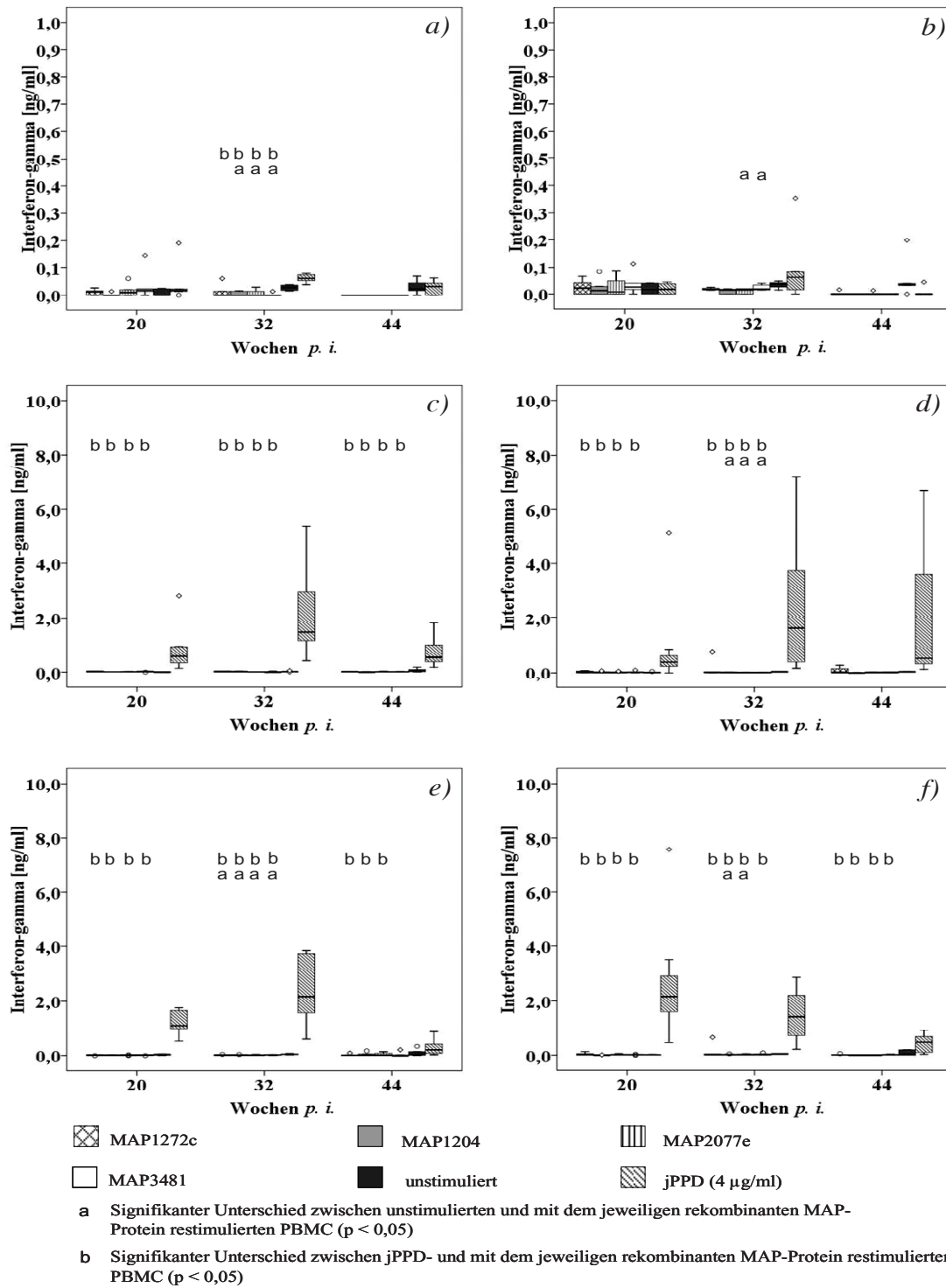


Abb. 5.34 Signifikante Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion von mit rekombinanten MAP-Proteinen restimulierten PBMC verglichen mit der von unstimulierten und jPPD-restimulierten PBMC. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag) c) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) e) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem

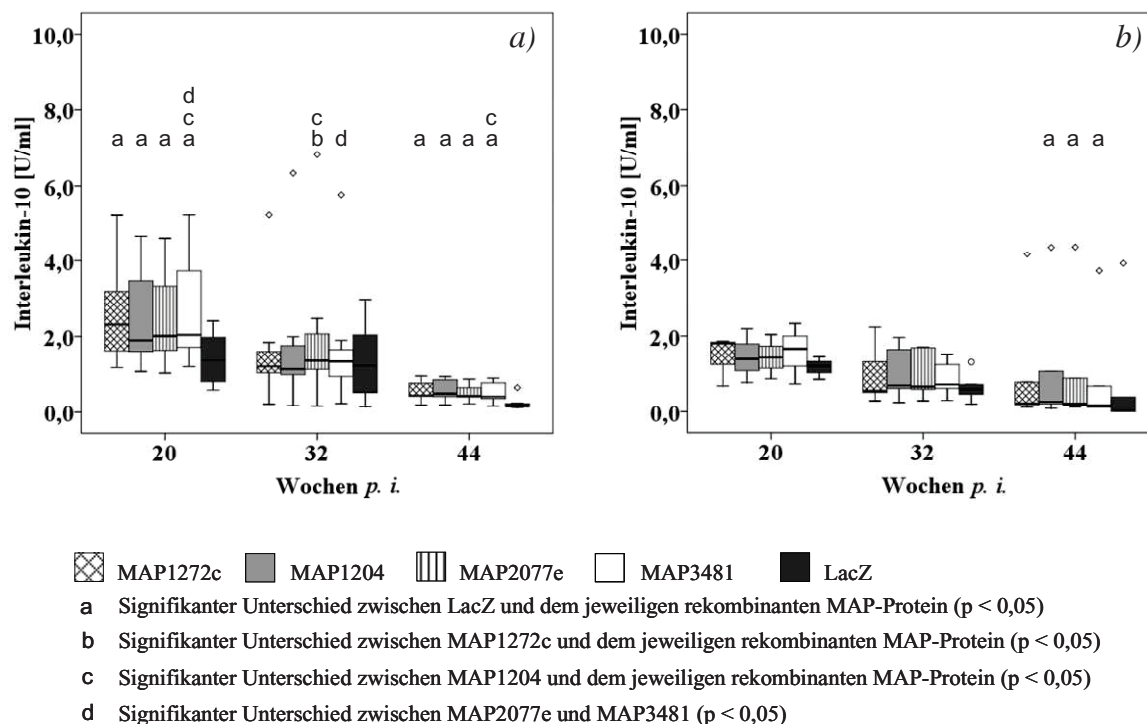
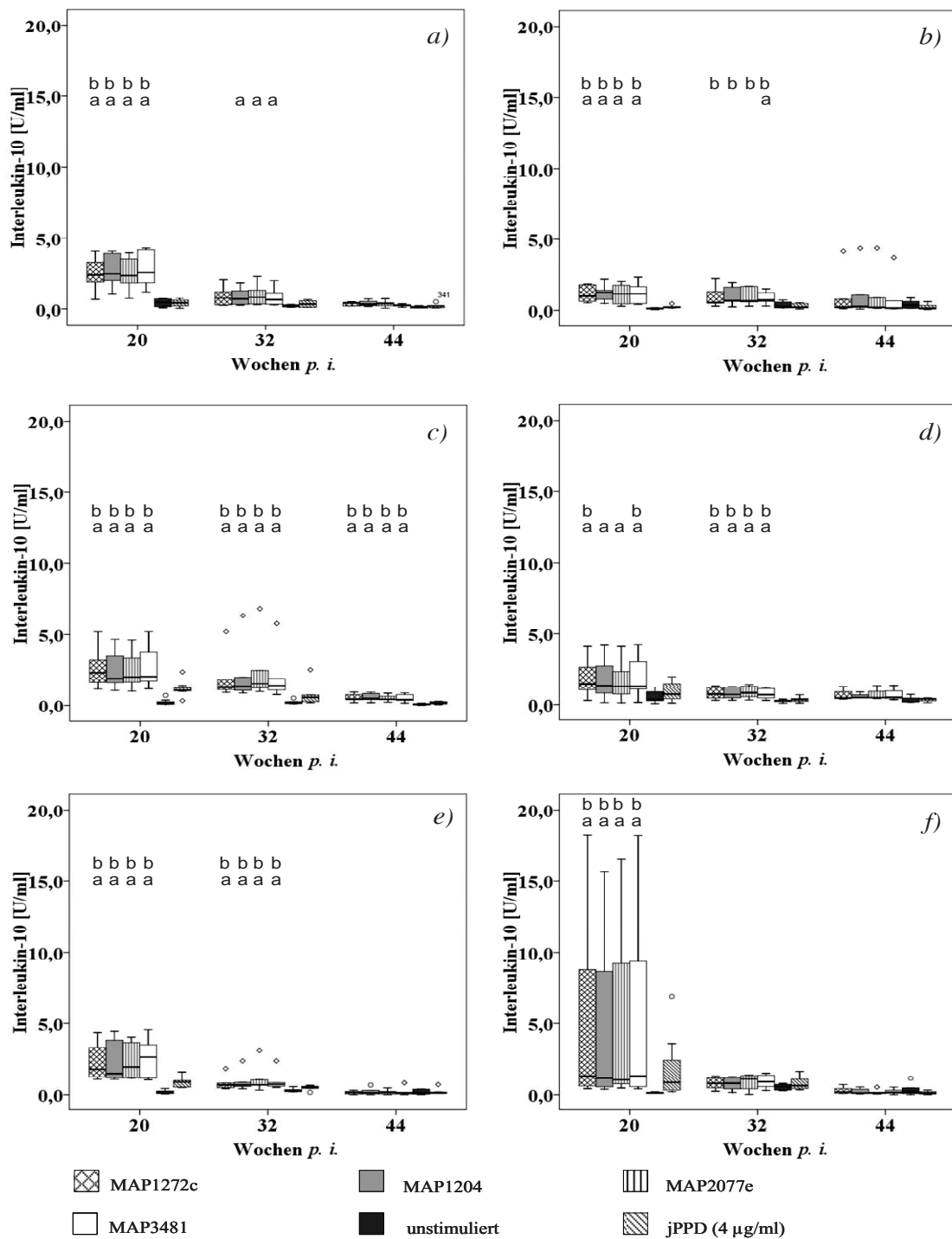


Abb. 5.35 Unterschiede in der IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC die mit jeweils verschiedenen rekombinanten MAP-Proteinen oder der unspezifischen Vektorkontrolle LacZ restimuliert worden waren. Exemplarisch ausgewählt wurden a) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KBE MAP) und b) die Gruppe K2 (42. Lebenstag). Dargestellt sind signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Proteinen und LacZ sowie zwischen den einzelnen Proteinen. Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem

Nach einer Restimulation von PBMC mit rekombinanten MAP-Proteinen zeigten diese unabhängig von Infektionsstatus, Versuchsgruppe und Protein mit vereinzelt Ausnahmen in der 44. Woche  $p. i.$  eine stärkere IL-10-Reaktion als jPPD-restimulierte Zellen. Insbesondere zu den ersten beiden untersuchten BZP waren die Unterschiede signifikant; in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) zu allen BZP (Abb. 5.36).

Zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen bestanden größtenteils keine signifikanten Unterschiede in der IL-10-Sekretion. Während im Vergleich der früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) mit der Gruppe K1 (früh) tendenziell mit zunehmender Versuchsdauer Tiere der Versuchsgruppen unabhängig vom eingesetzten Protein mehr IL-10 sekretierten war dies zwischen den Gruppen K2 (spät), V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) nicht nachvollziehbar.

Ein Einfluss der Inokulationsdosis und des Zeitpunktes der Inokulation auf die Sekretion von IL-10 war nicht eindeutig nachvollziehbar. Vergleicht man die Gruppen V1 (früh, geringe Dosis) und V3 (spät, geringe Dosis) zeigt sich nach Restimulation mit den MAP-Proteinen, dass Tiere der Gruppe V1 tendenziell mehr IL-10 bildeten, was sich für alle verwendeten MAP-Proteine in der 44. Woche  $p. i.$  statistisch nachweisen ließ. Zwischen den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) waren keine Unterschiede nachweisbar (Tab. 10.32).



a Signifikanter Unterschied zwischen unstimulierten und mit dem jeweiligen rekombinanten MAP-Protein restimulierten PBMC ( $p < 0,05$ )

b Signifikanter Unterschied zwischen jPPD- und mit dem jeweiligen rekombinanten MAP-Protein restimulierten PBMC ( $p < 0,05$ )

Abb. 5.36 Signifikante Unterschiede in der IL-10-Sekretion von mit rekombinanten MAP-Proteinen restimulierten PBMC verglichen mit der von unstimulierten und jPPD-restimulierten PBMC. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag), c) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) e) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate,  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem, U = Einheit (unit)

## 6 Diskussion

### 6.1 Eignung des Tiermodells

In der vorliegenden Studie wurde ein Langzeitinfektionsmodell zur Erforschung der Paratuberkulose etabliert, das internationalen Standards entspricht. Die gewählten Inokulationsschemata waren reproduzierbar und lösten die Infektion bei den Versuchstieren sicher aus. Das Modell soll zuverlässige Erkenntnisse zu pathogenetischen und diagnostischen Fragestellungen liefern und Feldbedingungen möglichst imitieren. Als Zielspezies wurde die Wiederkäuerart Ziege gewählt.

Die Vor- und Nachteile von Wiederkäuermodellen gegenüber Studien an Labortieren wurden im Abschnitt „Literatur“ (Kapitel 2.2) ausführlich dargestellt. Vorteile von Ziegen- gegenüber Rindermodellen ergeben sich durch das leichtere Handling der Tiere und reduzierte Kosten aufgrund des geringeren Futter- und Platzbedarfs. Bei gleichen räumlichen und finanziellen Rahmenbedingungen ist es je nach Zielstellung der Studie z. B. möglich, mehr Tiere zu halten, den Beobachtungszeitraum zu verlängern oder den Umfang der Untersuchungen zu vergrößern. In caprinen Studien kann eine kürzere Versuchsdauer gewählt werden, da klinische Symptome in der Regel früher auftreten als beim Rind (Stehman 1996). So stehen gewonnene Erkenntnisse schneller als Grundlage für die Beantwortung weiterer Fragestellungen zur Verfügung. Rind und Ziege sind Zielspezies von MAP. Unterschiede zwischen den Bakterienstämmen sind aber an der Ziege besser zu evaluieren. So waren Rinder weniger empfänglich für Typ-I-Stämme (Moloney und Whittington 2008), während die Infektion von Ziegen zuverlässig mit allen MAP-Typen gelang (de Juan et al. 2005). Trotz tierartlicher Unterschiede in der Inkubationszeit und der Ausprägung der Läsionen am Darm (Carrigan und Seaman 1990; Shulaw et al. 1993) sind die Ergebnisse aus Studien an kleinen Wiederkäuern bedingt auf das Rind übertragbar. So ähneln sich die Erkrankungsstadien und die klinischen Symptome. Zwar trat bei kleinen Wiederkäuern deutlich seltener Diarrhöe in der klinischen Erkrankungsphase auf (Stehmann et al. 1996), aber Gewichtsverlust bei erhaltenem Appetit, Hypoproteinämie und Ödeme kamen bei allen Tierarten vor. Die Infektionswege und die Mechanismen der Erregeraufnahme im Darm gleichen sich ebenso (Momotani et al. 1988; Sigurdardottir et al., 2001; Ponnusamy et al. 2013), wie die Bildung von Antikörpern und eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion bei infizierten Rindern, Schafen und Ziegen (Huda und Jensen 2003; Lybeck et al. 2011; Gwozdz et al. 2000a). Dies weist auf pathogenetisch ähnliche Mechanismen, die verantwortlich für die Ausprägung der Erkrankung sind, hin. Da die Ursachen für die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Tierarten nicht vollständig klar sind, müssen gewonnene Erkenntnisse an anderen Wiederkäuerspezies überprüft werden.

Diese Studie stellt ein Langzeitmodell dar, in dem der Infektionsnachweis mittels pathohistologischer Untersuchung nicht im Verlauf, sondern am Ende des Versuchs erfolgte. Der Studienaufbau erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Infektionsnachweises aufgrund der langen Inkubationszeit der Paratuberkulose, stellt jedoch nur die Folgen einer Infektion dar. Der Ablauf und die zugrunde liegenden Mechanismen der Infektionsetablierung können aus den während des Versuches erhobenen Daten nur retrospektiv geschlussfolgert, nicht aber kausal zugeordnet werden. Hier bieten Kurzzeitmodelle oder Verlaufsuntersuchungen Vorteile. Bei der Etablierung eines Modells muss jedoch die Manifestation der Infektion im Tier vordergründiges Ziel sein. In Folgestudien, in denen wie bei Munjal et al. (2005) oder Sigurðadóttir et al. (1999) während eines längeren Versuchszeitraumes zu festgelegten Zeitpunkten ein Teil der Versuchstiere getötet und pathologisch untersucht wird, können hier erhobene Ergebnisse in einen zeitlichen Zusammenhang gebracht werden.

Experimentelle Infektionsmodelle wurden in der Paratuberkuloseforschung häufig verwendet (Hagan 1938; Brotherston et al. 1961; Thorel et al. 1992; O'Brien et al. 2006), die Erstellung von Standards für solche Modelle erfolgte jedoch erst spät (Hines et al. 2007a). In Tab. 6.1 wird deutlich, dass das hier entwickelte Modell die Mehrzahl der Anforderungen an ein international vergleichbares Tiermodell erfüllt. Gründe für Abweichungen von den vorgegebenen Kriterien werden im Folgenden erläutert:

Die Verwendung eines MAP-Isolats aus der im Modell verwendeten Zielspezies soll nach Hines et al. (2007a) die Verwendung „exotischer“ Stämme vermeiden und so die Annäherung an Feldbedingungen fördern. Hier wurde dagegen ein Isolat vom Typ II aus einem nachweislich klinisch an Paratuberkulose erkrankten Rind verwendet. Es ist trotzdem zur Etablierung eines Infektionsmodells geeignet, da es durch seine hohe genetische Übereinstimmung mit dem Stamm K10 (Möbius, unveröffentlicht) die Forderung der möglichst engen Verwandtschaft mit diesem international verwendeten Referenzstamm von Hines et al. (2007a) erfüllt. Es ist davon auszugehen, dass sich die Infektionsetablierung und die Immunreaktion gegen beide Stämme nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Da bei 26 der 27 inokulierten Versuchstiere eine Infektion erfolgte, bestätigt unsere Studie andere Ergebnisse, in denen ebenfalls eine Infektion von Ziegen durch Stämme vom Typ II auslösbar war (Steward et al. 2006).

Anders als nach den internationalen Standards gefordert, wurde die Inokulation im hier untersuchten Modell an mehr als zwei und zudem nicht direkt aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dies spiegelt unserer Meinung nach die Bedingungen im Feld besser wieder, da Jungtiere in betroffenen Herden aufgrund der Umweltkontamination mit Kot einer andauernden Erregerexposition ausgesetzt sind und MAP beständig aufnehmen.

Tab. 6.1 Erfüllung der Modellkriterien nach Hines et al. (2007a) bei der Etablierung des Langzeitinfektionsmodells an der Thüringer Wald Ziege

Kriterium	Forderung	Erfüllung	Bemerkung
<b>Verwendete Rasse</b>	keine Resistenz lokale Züchtung	ja ja	keine Resistenz bei dieser Rasse bekannt
<b>Modelltyp</b>	Lang- oder Kurzzeitmodell		Langzeitmodell
<b>Zielstellung</b>	angegeben	ja	Pathogenesestudien Verbesserung der Diagnostik Testung von Impfstoffen und Therapeutika
<b>Inokulations- stamm</b>	gut charakterisiert wenig passagiert Virulenz bekannt Genom ähnlich K10 Rückstellaliquots um Wiederholbarkeit zu sichern klinisches Ziegenisolat	ja ja ja ja ja nein	Genom sequenziert 3 Passagen Isolat aus klinisch erkranktem Rind enge Übereinstimmung mit K10 Referenzstammsammlung FLI
<b>Präparation des Inokulums</b>	standardisierbar	ja	über BFM, Präparation über Master Stock
<b>Keimzahl- bestimmung</b>	über BFM und Koloniezählung retrospektiv	ja	beides
<b>Aufbewahrung Inokulum</b>	sofortige Verwendung	nein	Kühlung bei 4,0 °C für maximal 9 Wochen
<b>Verabreichungsweg</b>	oral	ja	über MAT
<b>Dosis</b>	$1 \times 10^9$ KbE MAP bzw. insg. 200 mg BFM an 2 aufeinander folgenden Tagen	nein	$1,62$ bis $4,16 \times 10^8$ KbE/Tag/Tier, Gesamtdosis $1,62$ bis $4,16 \times 10^9$ /Tier und doppelte Dosis, nicht an 2 aufeinander folgenden Tagen
<b>Inokulationsschema</b>	mehrere Gaben um natürliche Infektion zu simulieren	ja	10 x im Abstand von 2-3 Tagen
<b>Alter</b>	standardisiert weniger als 4 Monate	ja ja	2 Altersgruppen, beide < 4 Monate
<b>Herkunfts- bestand</b>	Paratuberkulose unverdächtig alle adulten Tiere mit ELISA und Kotkultur getestet nicht geimpft geschlossene Herde	ja nein ja nein	einmalige Kotuntersuchung und „Geschichte“ negativ kommerziell wirtschaftender Bestand
<b>Passive Ausscheidung</b>	Kultur nach 1-3 Tagen <i>p. i.</i> , ab 14 Tage <i>p. i.</i> als nicht passiv anzusehen		wöchentliche Kotkultur bis Inokulationsabschluss
<b>Tierauswahl</b>	gleiche Rasse gleiches Alter gleiches Geschlecht gleiches Gewicht  gleiche Größe Ausschluss von Geschwistereffekten	ja nein ja  n. u. ja	2 Altersgruppen  pro Gruppe Durchschnittsgewicht gleich, Einzelgewichte 2,8 – 6,0 kg  Verwendung von 6 Böcken im Herkunftsbestand, Geschwister in verschiedene Gruppen

Fortsetzung Tab. 6.2 Erfüllung der Modellkriterien nach Hines et al. (2007a) bei der Etablierung des Tiermodells an der Thüringer Wald Ziege.

Kriterium	Forderung	Erfüllung	Bemerkung
<b>Tierpflege</b>	für alle Gruppen gleich	ja	einheitliches Regime, gleiche Fütterung, Pflegerwechsel zwischen den Gruppen
<b>Qualitätskontrolle</b>	Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen bei verwendeten diagnostischen Tests	ja	
<b>Versuchsende</b>	Pathologie mit Scoring Histologie mit Scoring Klinische Überwachung Bakteriologie quantitativ Gewebe PCR  Humorale Immunantwort Zelluläre Immunantwort	ja ja ja  nein  ja  ja  ja	Semiquantitativ, Wachstumsindex  Zur Verifizierung der Keimart IS900 und IS1245  Protein- und Genexpressionsebene
<b>Probenbehandlung</b>	Kontrollen Rückstellproben Testvariabilitäten und –Grenzen bekannt?	ja ja ja	
<b>Gruppengröße (Statistik)</b>	Min. 3 Organproben zur Kultur Gruppengröße statistisch ausreichend um Unterschiede sicher zu detektieren	ja  nein	21 Proben aus 16 Lokalisationen  Sechs bis sieben Tiere pro Gruppe
<b>Ausscheidungs-nachweis</b>	monatlich	ja	

Erläuterungen: BFM = Bakterienfeuchtmasse, ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay, FLI = Friedrich-Loeffler-Institut, insg. = insgesamt, IS = Insertionssegment, KbE = Koloniebildende Einheiten, MAP = *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis*, MAT = Milchaustauscher, Min. = Minimum, n. u. = nicht untersucht, PCR = Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction), p. i. = post inoculationem

Die in dieser Studie gewählten Einzeldosen zwischen  $1,62$  und  $4,16 \times 10^8$  KbE pro Tag und die häufige Inokulation führten in einigen Gruppen zu einer höheren Gesamtdosis als empfohlen und in anderen Modellen verwendet (Tab. 6.2). Die Grundlage für die Etablierung des Modells ist eine nachweis- und reproduzierbare Infektion möglichst vieler Versuchstiere. Angaben aus der Literatur ließen darauf schließen, dass die hier gewählte Inokulationsdosis zu einer sicheren Infektion führt (Tab. 6.2). In einer weiteren Studie wurde nach viermaliger Gabe von  $1-2 \times 10^{10}$  KbE eines bovinen Isolats in wöchentlichem Abstand bei allen Ziegen eine Ausscheidung mit dem Kot nachgewiesen, bei zwei Tieren wurde der Erreger aus Organproben kultiviert (Steward et al. 2006).



Tab. 6.2. Übersicht über die verwendeten Inokulationsdosen in ausgewählten Tiermodellen für die Paratuberkulose. Die Inokulation in den aufgeführten Modellen erfolgte jeweils oral.

Studie	Tierart	Gesamt- inokulationsdosis (KbE)	Inokulations- schema	Infektionsrate (Gewebekultur)
Hines et al., 2007b	Ziege	$6,0 \times 10^9$	Aufteilung auf 4 Gaben, Abstand 48 h	n. a.
Reddacliff und Whittington, 2003	Schaf	$2,6 \times 10^1$ $2,6 \times 10^3$ $2,6 \times 10^7$	Aufteilung auf 3 oder 10 Gaben, Abstand 7 d	0/12 0/12 6/6
Gwozdz und Thomson, 2002	Schaf	$3,4 \times 10^9$ $4,4 \times 10^8$	einmalig	1/10 4/9
O'Brien et al., 2006	Rotwild	$1,0 \times 10^9$ $1,0 \times 10^7$ $1,0 \times 10^3$	Aufteilung auf 4 Gaben, Abstand 24 h	40/64
Waters et al., 2003	Rind	$1,6 \times 10^7$	4 Gaben, Abstand 7 d	3/3
Stabel et al., 2003	Bison Rind	$1,2 \times 10^9$	5 Gaben, 3x Abstand 24 h, dann 7 d und 14 d	5/6 Rind 6/6 Bison

Erläuterungen: d = Tag, h = Stunde, KbE = Koloniebildende Einheiten, n. a. = nicht angegeben

Die Verdopplung der MAP-Menge in den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) diente dem Studium der Intensität der Immunreaktion in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis.

Die Empfehlung, das Inokulum sofort nach der Herstellung zu verwenden, war aufgrund labortechnischer Abläufe nicht einzuhalten. Um einen Verlust vitaler Erreger zu vermeiden und so die Menge des Inokulats stabil zu halten, wurde MAP nach einem Kühlungsschritt zur Erholung für 12-24 h bei 37 °C kultiviert. Die Inkubationszeit war geringer als die Generationszeit des Erregers von 1,3 bis 4,4 Tagen (Lambrecht et al. 1988; Kim et al. 2002), so dass eine Passagierung ausgeschlossen ist. Die retrospektive Keimzählung bestätigte die Vitalität der Erreger und die Inokulation mit etwa gleichen Erregermengen (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Kriterium für ein standardisiertes Tiermodell ist die Einheitlichkeit der Versuchstiere hinsichtlich ihrer Herkunft aus sicher Paratuberkulose-negativen, geschlossenen Herden, des Geschlechts, des Gewichts und des Alters. Beim Herkunftsbetrieb handelte es sich um einen offenen, kommerziell wirtschaftenden Biobetrieb, der fast ausschließlich Eigenremontierung betreibt. Zwar war die Freiheit von MAP in diesem Bestand nicht mit letzter Sicherheit nachweisbar, die Wahrscheinlichkeit war jedoch sehr hoch. So beschränkt sich zum einen der Zukauf von

Tieren - eine Haupteintragsquelle für MAP - auf die Böcke. Diese dürfen nach europäischem Recht nur aus ökologisch geführten Betrieben stammen (VO (EG)834/2007, Art. 14, Abs. 1a) Satz i)). Da die Anzahl ökologisch gehaltener Ziegen mit ca. 9 % in Deutschland begrenzt ist (Hesse et al. 2002), reduziert sich das Risiko einer Einschleppung in den Bestand. Zum anderen sind keine klinischen Erkrankungsfälle bekannt; eine einmalige Kotuntersuchung aller adulten Tiere vor Studienbeginn verlief negativ. Außerdem war das durchschnittliche Nutzungsalter der weiblichen Tiere höher als die Inkubationszeit der Erkrankung bei kleinen Wiederkäuern (Dr. U. Moog, Tiergesundheitsdienst Thüringen, persönliche Mitteilung; Stehman, 1996). Da eine Ausscheidung von MAP auch intermittierend erfolgt (Kurade et al. 2004), hätten wiederholte Kotuntersuchungen und ein Herdensing screening mittels Antikörper-ELISA die Paratuberkulosefreiheit des Bestandes untermauert. Für die Freiheit des Bestandes spricht aber auch, dass bei keinem der Lämmer vor der Inokulation eine MAP-Ausscheidung mit dem Kot oder eine Antikörperreaktion nachweisbar waren. Bei keinem der Kontrolltiere war zum Sektionszeitpunkt eine Infektion feststellbar. Während des gesamten Versuchs trat keine fäkale MAP-Ausscheidung, keine Antikörper- und IFN- $\gamma$ -Reaktion bei den Kontrollziegen auf. Auch in zwei Folgestudien mit Ziegen aus diesem Betrieb war dies so (Köhler, persönliche Mitteilung).

Durch die hohe Eigenremontierung im Herkunftsbestand standen nur männliche Lämmer für den Versuch zur Verfügung. Eine Beeinflussung der untersuchten Parameter durch eine geringe genetische Variabilität ist durch die Verwendung von sechs Deckböcken auszuschließen (Kapitel 10.1.1, Tab. 10.1). Die gute tiergesundheitsliche Charakterisierung des Herkunftsbestandes und die umfassende Untersuchung der Lämmer vor Versuchsbeginn stellten einen Vorteil dar, da entsprechende Einflüsse auf die Immunreaktion berücksichtigt werden konnten. Viele Modellstudien geben keine Untersuchungen auf andere Erkrankungen als Paratuberkulose an (Mackintosh et al. 2008; Juste et al. 1994; Koo et al. 2004; Stabel et al. 2011; Thorel et al. 1992; Waters et al. 2003; Wu et al. 2007). Selten finden sich Hinweise auf eine klinische Untersuchung (Khare et al. 2009; Uzonna et al. 2003), präventive Behandlungen gegen Parasiten oder Impfungen (Kurade et al. 2004; Hines et al. 2007b; Reddacliff und Whittington 2003; Stabel et al. 2003). In einer Studie wurde eine Kotuntersuchung auf „andere Pathogene“ als MAP erwähnt (Kathaperumal et al. 2009).

Um das Alter der Tiere nicht zu großen Schwankungen auszusetzen, wurden nur Lämmer in die Untersuchung einbezogen, die innerhalb eines definierten Zeitraumes geboren worden waren. Die erforderliche Stichprobengröße war nur erreichbar, wenn auch Mehrlinge in die Studie aufgenommen wurden. Um Geschwistereffekte zu vermeiden, wurden diese auf unterschiedliche Gruppen verteilt. Um aus einer unterschiedlichen Körperkondition resultierende Unterschiede auszugleichen, erfolgte die Verteilung so, dass sich die Durchschnittsgewichte der Gruppen glichen. Dieses

Vorgehen erfüllt zwar die Forderung von Hines et al. (2007a) nach einer homogenen Studienpopulation, ermöglicht aber keine komplette Randomisierung. Die Vermeidung von Effekten, die auf eine gleiche genetische Ausstattung oder Unterschiede in Körpergröße und –gewicht zurückzuführen sind, ist essentiell, um eine Fehlinterpretation von erhobenen Daten zu vermeiden. Zwar wurde trotz dieser Einschränkungen versucht, die Gruppenaufteilung zufällig zu gestalten, dies kann im Hinblick auf die Kriterien der evidenzbasierten Tiermedizin (Arlt und Heuwieser 2005) aber nicht als ausreichend gelten. Auch eine Verblindung der Untersucher war aufgrund der Schutzmaßnahmen zur Vermeidung der Infektionsverschleppung in die Kontrollgruppen nicht möglich. Eine Verblindung des Laborpersonals sollte in Folgestudien erfolgen.

Jeder Gruppe wurden sechs bis sieben Ziegen zugeteilt. Die geringe Tierzahl kann Unterschiede zwischen den Tiergruppen überdecken, zumal sich in den Ergebnissen eine große individuelle Variabilität der Reaktionen auf MAP widerspiegelte, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Coussens et al. 2004; Smeed et al. 2007; Begg et al. 2011). Eine größere Tierzahl erhöht die statistische Sicherheit der Ergebnisse, hätte aber aus Tierschutzgründen ein größeres Platzangebot erfordert. Kosten und Aufwand sind bei Großtier- und Langzeitmodellen deutlich höher als in Kurzzeit- und Labortiermodellen (Begg und Whittington 2007; Hines et al. 2007a), so dass die Zahl inokulierter Tiere häufig begrenzt wird. Die Vergleichbarkeit mit anderen Wiederkäuermodellen ist jedoch gewährleistet, da die Anzahl von 27 Versuchstieren mit jeweils sechs bis sieben Ziegen pro Versuchsgruppe dem Durchschnitt entspricht. Die in zwei Reviews betrachteten 31 bovinen Modelle umfassten zwei bis 40, die 29 ovinen Untersuchungen zwei bis 51 Tiere. Eine Ausnahme stellt die Studie von Larsen et al. (1975) dar, in der 175 Rinder inokuliert wurden. Die bisher durchgeführten Ziegenmodelle verwendeten zwischen vier und zehn Tiere (Van Kruiningen et al. 1986; Sigurðadóttir et al. 1999; Sigurðadóttir et al. 2001; Storset et al. 2001; Valheim et al. 2002; Munjal et al. 2005; Steward et al. 2006; Hines et al. 2007b). Eine Studie untersuchte 24 Tiere (Harding 1957), in einem weiteren Modell wurden insgesamt 26 Ziegen inokuliert, in jeder Versuchsgruppe befanden sich aber nur sechs bis sieben Tiere (Krüger et al. 2014).

Eine Infektion gilt entsprechend der Henle-Kochschen Postulate als sicher, wenn der Erreger in gesunden Tieren nicht nachweisbar und stets mit der Erkrankung assoziiert ist, sich in Reinkultur anzüchten lässt und bei gesunden Tieren eine Erkrankung auslöst. Demnach müssten als Kriterium für eine Infektion die Anzucht von MAP aus Gewebeproben, bei gleichzeitigem Vorhandensein histologischer Läsionen angesehen werden. Bei 23 Versuchstieren war nach diesen Kriterien eine Infektion erfolgt. Die entsprechende Infektionsrate betrug 85,2 %. Da der Entstehung der Paratuberkulose-typischen histologischen Läsionen eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit MAP vorausgegangen sein muss, wird in dieser Studie auch das Vorhandensein histologischer Läsionen ohne kulturellen MAP-Nachweis aus Gewebe als Infektion

angesehen. Unter dieser Betrachtungsweise waren 26 der 27 Versuchsziegen infiziert. Die Infektionsrate von 96,3 % war hoch. Ein direkter Vergleich mit anderen caprinen Modellen ist nur begrenzt möglich, da sie sich nicht nur in der Menge der Inokulationsdosis und der Häufigkeit der Inokulation sondern auch in der Versuchsdauer unterschieden (Munjal et al. 2005; Sigurðadóttir et al. 1999; Storset et al. 2001; Valheim et al. 2002). Die Angaben für die aufgeführten Ziegenmodelle schwanken zwischen 25,0 % (Sigurðadóttir et al. 1999) und 85,7 % der Tiere (Storset et al. 2001; Valheim et al. 2002). In einer Folgestudie zur vorliegenden Arbeit mit Ziegen gleicher Herkunft und gleichen Alters wurde nach Inokulation mit  $2,6 \times 10^8$  Kbe von MAP bei 24 der 26 Tiere (92,3 %) eine Infektion nachgewiesen (Krüger et al. 2014). Das entspricht der vorliegenden Infektionsrate. Der verwendete MAP-Stamm und das Inokulationsschema unterschieden sich nicht. Diese Ergebnisse bestätigen die Reproduzierbarkeit des Modells. Es bildet einen guten Ausgangspunkt um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese, die Diagnostik, Therapie und Prophylaxe der Paratuberkulose zu gewinnen.

Ein weiterer Vorteil unseres Modells ist das Erreichen einer relativ hohen Infektionsrate bei vergleichsweise kurzer Versuchsdauer. In den Modellen von Munjal et al. (2005) und Sigurðadóttir et al. (1999), die weniger als ein Jahr dauerten, waren nur 20,0 % bzw. 25,0 % der Tiere infiziert. Die Gabe einer höheren Gesamtdosis als in dieser Studie verwendet wurde und ein ähnliches Inokulationsschema bei gleicher Versuchsdauer führte in der Studie von Munjal et al. (2005) nur bei 20 % der Tiere zum Nachweis histologischer Läsionen bei gleichzeitig positiver Gewebekultur. Da jedoch bereits nach 60 Tagen die ersten Sektionen erfolgten, war die Dauer zur Etablierung einer Infektion bei einigen Tieren deutlich kürzer. Damit sank die Wahrscheinlichkeit des Infektionsnachweises, verglichen mit den Ziegen, die nach einem Jahr getötet wurden. Dies bedingt die geringere Infektionsrate. Bei anderen, entsprechend aufgebauten Modellen lagen die Infektionsraten zwischen 25,0 % und 100,0 % (Van Kruiningen et al. 1996; Harding 1957; Sigurðadóttir et al. 1999). In länger dauernden Modellen, in denen eine Sektion erst zum Versuchsende erfolgte, waren es 85,71 % (Storset et al. 2001; Valheim et al. 2002). Es wird deutlich, dass die Sektion aller Versuchstiere am Studienende bei der Etablierung von Tiermodellen vorzuziehen ist, da die Infektionsrate nur so hinreichend sicher bestimmbar ist.

Bei den Ziegen Nummer acht, zehn, 20 und 39 wurden keine Erreger aus den Gewebeproben angezüchtet. Die Gründe sind unterschiedlich. Mehrere Studien empfehlen insbesondere bei makroskopisch unverdächtigen Organen eine hohe Anzahl von Organproben zu untersuchen, um die Se der Kultur zu erhöhen (Sweeney et al. 2006a; Elze 2009). Trotz der in dieser Studie großen Anzahl entnommener Proben, kann MAP an anderen Stellen von Darm und Lymphknoten vorhanden und übersehen worden sein. Relativ zur Länge einzelner Darmabschnitte und der Lymphknotengröße konnten nur kleine Ausschnitte untersucht werden. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von MAP oder histologischen Läsionen in den Lymphknoten bei gleicher

Probenmenge aufgrund des höheren Gewebeanteils am Gesamtorgan höher. So wurden bei 23 Versuchsziegen Läsionen in den Lymphknoten, aber nur bei 20 Tieren im Darm nachgewiesen. Ähnlich verhielt es sich mit dem kulturellen MAP-Nachweis. Weiterhin beeinträchtigen Dekontaminationsschritte die Wachstumsintensität und damit die Se der kulturellen Anzüchtung (Collins 1996; Johansen et al. 2006; Gierke 2009). Bei den Tieren acht, zehn und 20 war MAP nicht aus Gewebeproben anzuzüchten; eine Infektion war trotzdem über vorhandene Läsionen in den untersuchten Lymphknoten und die fäkale Ausscheidung von MAP in der ersten Versuchshälfte nachzuweisen. Auch immunhistologisch waren bei den Tieren acht und 20 Mykobakterien feststellbar. Allerdings ist die für die Etablierung einer Infektion entscheidende Erregervitalität mit dieser Methode nicht darstellbar. Es ist auch möglich, dass eine zu geringe MAP-Anzahl in den Proben zu falsch-negativen Ergebnissen führte. Ob Ziegen in der Lage sind, die Etablierung einer Infektion zu verhindern oder eine bestehende Infektion zu überwinden, soll an anderer Stelle diskutiert werden (Kapitel 6.2).

Die Übertragung der Erkenntnisse aus diesem Tiermodell auf Feldbedingungen ist weder uneingeschränkt möglich, noch zulässig, da es als Laborstudie unter standardisierten Bedingungen stattfand, die sich Feldbedingungen annähern, diese aber nicht exakt widerspiegeln. Die Ergebnisse müssen daher unter konventionellen Haltungsbedingungen überprüft werden. Eine Annäherung an diese Bedingungen erfolgt in dieser Studie u. a. durch die Wahl des natürlichen Inokulationsweges oral über den selbstständig aufgenommenen MAT. Das kotkontaminierte Euter des Muttertieres wird als eine wichtige Infektionsquelle angesehen (Sweeney 1996), die direkte MAP-Ausscheidung mit der Milch ist nachgewiesen und führt zur Übertragung des Erregers auf das Jungtier (Streeter et al. 1995). Die Definition einer einheitlichen aufzunehmenden Erregermenge entsprach dagegen nicht Feldbedingungen, wo der Grad der Kontamination des Euters mit Kot unterschiedlich ist. Die Haltung der Ziegenlämmer in Gruppen auf Stroh entsprach natürlichen Bedingungen, wie auch die Fütterung mit Heu und Kraftfutter.

Die Haltung in einem geschlossenen Stallsystem verhinderte die Auseinandersetzung mit Umwelt- und anderen bestandstypischen Infektionserregern, die unter Feldbedingungen vorkommen und einen Einfluss auf das Immunsystem haben. Wie solche Erreger die Reaktion auf MAP beeinflussen, ist unbekannt. Jedoch wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Makrophagen nach Restimulation mit IFN- $\gamma$  und inaktiven *Staphylococcus aureus* zu einer deutlichen Steigerung der MHC-II-Expression auf Makrophagen führte, während eine Infektion mit MAP eine Verringerung der Rezeptorexpression bewirkte (Weiss et al. 2001). Der Kontakt zu anderen Mykobakterien beeinflusst die Immunreaktion gegenüber Paratuberkulose aufgrund ihrer hohen genetischen Verwandtschaft (Osterstock et al. 2007). So unterschied sich die Reaktion von Makrophagen *in vitro* gegenüber *M. avium* spp. *avium* von der nach Zusatz von MAP (Weiss et al. 2001). Welche Auswirkungen diese Unterschiede auf die Reaktion gegenüber MAP bei gleichzeitiger Infektion mit beiden

Spezies haben, muss noch gezeigt werden. Der Einfluss anderer Mykobakterienspezies ist in unserer Studie jedoch nahezu auszuschließen, da diese zu keinem Zeitpunkt isoliert wurden. Für eine spezifische Reaktion spricht auch die stärkere IFN- $\gamma$ -Reaktion gegenüber jPPD im Vergleich zu der nach Restimulation mit aPPD. Zwar spiegelte dies nicht die natürlichen Feldbedingungen wider, eine Begleitinfektion mit anderen Erregern würde die Interpretation der Befunde, die zur Feststellung einer Infektion mit MAP nötig sind, jedoch erschweren. Eine sichere Modelletablierung wäre unmöglich. Daher ist es konsequent, den Kontakt zu anderen Erregern zu vermeiden. In Folgestudien sollten die Einflüsse von Coinfektionen auf die Immunreaktion einbezogen werden.

Die Ziegenlämmer wurden in der vorliegenden Untersuchung intensiv betreut. Unter Feldbedingungen ist dies unterschiedlich. Es wird vermutet, dass das Betriebsmanagement die Folgen der Erkrankung beeinflusst. In der Untersuchung von Donat et al. (2014a) unterschied sich die Milchmenge zwischen MAP-positiven und negativen Milchkühen signifikant. Um Milchmengenunterschiede auszuschließen, die durch unterschiedliche Laktationsstadien und die Anzahl der Laktationen bedingt sind, wurden zu jeder MAP-positiven Kuh negative Vergleichstiere ausgewählt, die das gleiche Laktationsstadium und eine entsprechende Laktationsanzahl aufwiesen. Das Ausmaß der Milchmengendifferenz variierte zwischen den Betrieben stark, was auf Unterschiede im Management zurückgeführt wurde. Anders als in der vorliegenden Studie kann die Gruppenzusammensetzung unter Feldbedingungen häufig nicht so exakt homogenisiert werden, die Verfolgbarkeit der Tiere im Versuchsverlauf ist z. T. aufgrund von Abgängen nicht möglich. Der Einfluss einzelner äußerer Faktoren auf die Erkrankung ist in konventionellen Haltungen schwer zu untersuchen, während unter Modellbedingungen bestimmte Parameter gezielt in die Untersuchung einbezogen werden können. Die geringe Tierzahl in unserem Versuch erschwert die Übertragbarkeit auf Feldbedingungen, da nur eine geringe Variabilität der Gesamtpopulation abgebildet wurde. Unter Feldbedingungen sind dagegen verschiedene Populationen vorhanden.

Die Gewinnung zuverlässiger Erkenntnisse hängt nicht zuletzt mit der Zuverlässigkeit der gewählten Untersuchungsmethoden zusammen.

In dieser Studie wurde die Etablierung eines hauseigenen Systems zur Bestimmung von IFN- $\gamma$  und IL-10 gewählt. Es war von entscheidender Bedeutung, dass die gewählten Antikörper an das Ziegeninterferon banden. Für die Ziege passende Antikörper und Protokolle wurden aus der Literatur entnommen und adaptiert (Janagama et al. 2006; Weiss et al. 2008; Lybeck et al. 2009). In der Literatur werden verschiedene ELISA-Systeme zum IFN- $\gamma$ -Nachweis verwendet, die errechneten Se und Sp sind sehr unterschiedlich (Kapitel 2.1.7.2.2.2). In dieser Arbeit war die Angabe von Se und Sp aufgrund fehlender Grenzwerte für eine positive Reaktion nicht möglich, da die Aussage „positiv“ oder „negativ“ im Vergleich zu einem Goldstandard wie der kulturellen Isolation von MAP aus Gewebeproben ohne Grenzwert nicht getroffen

werden kann. Da das Ziel dieser Studie die Beobachtung des Verlaufs der IFN- $\gamma$ - bzw. IL-10-Reaktion über den Versuchszeitraum und die Beurteilung des Intensitätsunterschiedes der Reaktionen zwischen verschiedenen Inokulationsschemata war, wurde auf die Definition von Grenzwerten verzichtet. Die Reproduzierbarkeit der Tests wurde mit Hilfe verschiedener Variabilitätsberechnungen ermittelt, was dem Vorgehen des FLI in der Zulassungsprüfung für neue diagnostische Tests entspricht. Ein kommerzieller IFN- $\gamma$ -Test für die Tuberkulose, der häufig für die Paratuberkulosedagnostik adaptiert wurde (Steward et al. 2006) und auch bei der Ziege verwendet wird (Lybeck et al. 2009; Steward et al. 2006; Hines et al. 2007b), wies bei dieser Prüfung einen Variationskoeffizienten zwischen einzelnen Chargen von 30,18 %, eine *intra-assay* Varianz von 8,95 % und eine *intra-plate* Varianz von 4,74 % auf (Köhler, persönliche Information). Für den hier verwendeten *in-house* IFN- $\gamma$ -Assay wurde ein Variationskoeffizient von 9,06 % zwischen den einzelnen Beschichtungschargen errechnet. Die *intra-assay* und die *intra-plate* Varianz gleichen mit 8,95 % bzw. 6,94 % in etwa denen des kommerziellen Systems. Damit ist der hier verwendete Test deutlich besser reproduzierbar. Die Variabilität zwischen den Messungen war mit einem *cv* von 9,13 % homogen. Dies führt zu einem konstanten Fehler im Versuchsverlauf, der für die Beurteilung von Kinetik und Intensitätsunterschieden zu vernachlässigen ist.

Der IL-10-ELISA weist mit 23,33 % *intra-assay* Varianz und 26,40 % *intra-plate* Varianz eine schlechtere Reproduzierbarkeit auf. Diese Schwankung ist nicht auf Unterschiede in der Durchführung des Tests zurückzuführen. Der Variationskoeffizient zwischen den einzelnen Untersuchungstagen betrug 9,7 %. Die große Schwankungsbreite beruht evtl. auf retrospektiv nicht überprüfbaren Unterschieden in der aufgetragenen Antikörperkonzentration bei der Beschichtung der Platten. Eine unzureichende Durchmischung der Antikörperlösung nach dem Auftauen kann trotz gründlichen Schüttelns des Probengefäßes auf dem Vortexer nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Platten wurden außerdem auf Vorrat beschichtet und unterschiedlich lange bei -20 °C eingefroren. Eine Fehlerquelle stellt die unbekannte Stabilität der Antikörper auf der Platte in Abhängigkeit von der Dauer des Einfrierens dar. Auch die Stabilität der Positivkontrolle in gefrorenem Zustand ist nicht bekannt. Zwar wurde für jeden Plattenansatz ein neues Probengefäß aufgetaut, einige Gefäße waren jedoch deutlich länger eingefroren als andere. Da die Positivkontrolle in einem Ansatz selbst hergestellt wurde, ist es möglich, dass dessen unzureichende Durchmischung zu einer ungleichen Zytokinkonzentration in den Einzelportionen führte.

Keiner der kommerziell in Deutschland erhältlichen Antikörper-ELISAs für die Paratuberkulose weist eine 100 %ige Se oder Sp auf. Für den hier gewählten Test werden in der Literatur Se zwischen 31,1 % und 74,5 % und Sp von 69,2 % und 99,4 % beim Rind angegeben (Fry et al. 2008; Köhler et al. 2008; Donat et al. 2012). Dies liegt zum einen an der Wahl des Grenzwertes. So zeigten Köhler et al. (2008), dass dessen

Festlegung durch den Hersteller mit 99,3 % zu deutlich höherer Sp und geringerer Se (58,2 %) führte als die Berechnung nach der TG-ROC-Analyse (69,2 % bzw. 74,5 %). Auch die Referenzmethode unterscheidet sich zwischen den Studien. Während Köhler et al (2008) die Isolation von MAP aus Gewebeproben zugrunde legten und eine Se von 58,2 % angaben, wurde die deutlich geringere Se von Donat et al. (2012) und Fry et al. (2008) relativ zur Kotkultur berechnet. Die Tests unterschieden sich im Vergleich kaum (Fry et al. 2008; Donat et al. 2014b).

Die kulturelle Anzüchtung, insbesondere aus Geweben, gilt als spezifischste Methode MAP nachzuweisen (Huda und Jensen 2003; Gierke 2009) und wird häufig als Referenzmethode für den Infektionsnachweis angegeben. Allerdings variiert die Kulturmethode. In dieser Studie wurde die Standardmethode des deutschen Referenzlabors verwendet. Die Se der Methode wird durch die Dreifachbestimmung erhöht. Ihr Ablauf ist in LAAs standardisiert und wird von erfahrenem Personal durchgeführt und ausgewertet. Das FLI unterliegt strengen, regelmäßig überprüften Standards des Qualitätssicherungs-(QS)-Systems, was die Zuverlässigkeit der Durchführung gewährleistet. Beim Nachweis säurefester Stäbchen unter dem Mikroskop wurde statt der gebräuchlicheren Ziehl-Neelsen-Färbung eine modifizierte Form, die sogenannte Kinyoun-Färbung verwendet. Sie wurde vorgezogen, da der Kontrast zwischen Gewebezellen und Mykobakterien deutlicher ist als bei der Ziehl-Neelsen-Färbung und so die Se des kulturellen Nachweises von MAP erhöht. Da es sich außerdem um eine Kaltfärbung handelt, ist keine Hitzefixierung der Präparate notwendig. Die Entstehung von gesundheitsschädlichen Dämpfen wird so vermieden.

Auch die Verifizierung von MAP und der Ausschluss anderer Mykobakterienspezies mittels PCR, wie sie hier durchgeführt wurde, trägt zu einer Erhöhung der Se der Kultur bei (Eamens et al. 2007). Der errechnete WI erschwert jedoch den Vergleich, da er keine Anwendung in der internationalen Literatur findet. Die Definition einer schwachen und starken Ausscheidung ist nicht standardisiert. Häufig wird die Ausscheidungsrate semiquantitativ angegeben, der entsprechende Score ist unterschiedlich. Dem hier verwendeten Score liegt eine institutseigene, semiquantitative Bestimmung der Ausscheidungsintensität zugrunde; anders als in anderen Studien werden aber die Anzahl der positiven Röhrchen und die Zeit bis zum Auftreten erster positiver Befunde berücksichtigt. Sie beeinflussen die Se der MAP-Kultur (Gierke 2009), lassen indirekt Rückschlüsse auf die Ausscheidungsintensität zu und stellen somit wichtige Informationen dar. Damit geht der WI über die bisher verwendete Beurteilung hinaus. Er ermöglicht die Quantifizierung der Wachstumsintensität und damit eine bessere statistische Auswertbarkeit der Daten.

Die Probenentnahme für die histopathologische Untersuchung war mit 36 Proben sehr umfangreich und erhöht so deren Se. In neun Untersuchungen mit unterschiedlicher Fragestellung wurden für die histologische Untersuchung zwischen zwei und mehr als 48 Gewebeproben entnommen (González et al. 2005; Valheim et al. 2002; Kurade et al.



2004; Mackintosh et al. 2008; McDonald et al. 1999; Hines et al 2007b; Kathaperumal et al. 2009; Reddacliff und Whittington 2003; Singh et al 2007; Waters et al.2003; Stabel et al. 2003). Nur in zwei Studien wurden etwa die gleiche Anzahl oder mehr Gewebeprobe entnommen (Stabel et al. 2003; Kurade et al. 2004). Damit ist die hier gewählte Probenauswahl überdurchschnittlich groß. Die Art der gefundenen Veränderungen machte einen, für diesen Versuch individuellen Auswertungsschlüssel notwendig, der geeignet war, die Stärke der Veränderungen mit den erhobenen Daten zur Immunreaktion zu korrelieren. Die Bewertung der histologischen Läsionen unterschied sich nicht von der in der Literatur angegebenen. Wie bei Gonzáles et al. (2005), Pérez et al. (1996) und Corpa et al. (2000) wurde zunächst die Verteilung in den Darmabschnitten und Lymphknoten und den Darmgewebeschichten, der Umfang der Läsionen, die Anzahl gefundener Mykobakterien und die vorherrschende Zellpopulation gewichtet (Meyer 2011). In einem zweiten Schritt wurden die entsprechenden numerischen Scores jedoch zu je einem für die Veränderungen am Darm und einem für die Lymphknoten zusammengefasst, wobei das Vorhandensein von Mykobakterien in beiden Lokalisationen in einem Extrascore berücksichtigt wurde. Lediglich in einer Studie war dies ähnlich (Hines et al 2007b). Allerdings wurden die mikroskopischen mit den makroskopischen Befunden korreliert. Die Zusammenfassung zum vorliegenden Scoresystem ermöglicht eine einfache Befundklassifizierung nach Schweregrad und so die statistische Korrelation mit der Immunreaktion. Allerdings gehen durch die Vereinfachung Informationen verloren. Die genaue Auswertung der pathohistologischen Daten erfolgte durch Meyer (2011). In der vorliegenden Arbeit standen die Zusammenhänge zwischen der Immunreaktion und der Ausprägung der Läsionen im Vordergrund, so dass der Detailverlust in Kauf genommen wurde. Der verwendete Antikörper zum immunhistologischen MAP-Nachweis erwies sich in anderen Untersuchungen als unspezifisch, weshalb hier von Mykobakteriennachweis gesprochen wird. Ein anderer capriner, MAP-spezifischer Antikörper stand nicht zur Verfügung.

Die *in-house* real-time PCR wurde innerhalb des FLI nach internationalen Standards etabliert. Passende Primer wurden der Literatur entnommen, verschiedene house-keeping Gene getestet und die Reproduzierbarkeit ausführlich geprüft (Appelt, unveröffentlicht).

## **6.2 Immunologische und pathogenetische Reaktionsmechanismen**

### **6.2.1 Grundlegende Überlegungen zur Interpretation der Ergebnisse der Zytokinbestimmung auf Protein- und Genexpressionsebene**

Um die Zytokinsekretion interpretieren zu können, muss die Basissekretion unstimulierter PBMC von Kontroll- und Versuchstieren bekannt sein. Es ist nachgewiesen, dass unstimulierte PBMC nicht infizierter Ziegen geringgradig IFN- $\gamma$

sekretieren (Lybeck et al. 2009). Wie in anderen Studien an Schafen und Ziegen (Storset et al. 2001; Hasvold et al. 2002; Wattegedera et al. 2010) unterschied sich die IFN- $\gamma$ -Sekretion unstimulierter PBMC von Kontroll- und Versuchsgruppen in unserer Untersuchung nicht. Die in den Zellkulturüberständen gemessenen Zytokinkonzentrationen waren sehr gering, was den Ergebnissen von Lybeck et al. (2009) entsprach. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion der Kontrolltiere überstieg angegebene Werte aus der Literatur von maximal 0,3 ng/ml bzw. 0,36 ng/ml nicht (Storset et al. 2001; Hasvold et al. 2002; Kapitel 10.2.1, Tab. 10.16). Aber auch unstimulierte PBMC der Versuchstiere sekretierten stets weniger IFN- $\gamma$ , so dass in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurde, dass der Infektionsstatus keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion unstimulierter, capriner PBMC hat. Dies war zuvor bei Rindern und Damwild gezeigt worden (Stabel et al. 2007; Delgado et al. 2012).

Zahlen- bzw. Grenzwerte zur Basissekretion von IL-10 existieren nicht. Die in Überständen einmalig entnommener, unstimulierter PBMC von über drei Jahre alten Schafen gemessene Menge IL-10 wird als gering angegeben (Wattegedera et al. 2010). Auch die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine geringgradige Sekretion nicht restimulierter PBMC. Versuchs- und Kontrolltiere unterschieden sich nur zu einzelnen, von Gruppe zu Gruppe verschiedenen BZP, so dass von zufälligen Effekten ausgegangen wird. Es ließen sich allerdings Schwankungen im Versuchsverlauf feststellen. So trat das Maximum der IL-10-Sekretion - unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit - in einem Alter von ca. 20 bis 22 Wochen auf. Anschließend sank sie und blieb minimal. Diese altersbedingten Schwankungen können mit einer Veränderung der Zytokinsekretion durch die physiologische Reifung des Immunsystems zusammenhängen. Die Hauptproduzenten von IL-10 gesunder adulter Ziegen sind CD14<sup>+</sup>-MHCII<sup>+</sup> Makrophagen (Lybeck et al. 2009). Aber auch DC, B-Zellen und verschiedene Arten von T-Zellen können IL-10 sekretieren (Couper et al. 2008), das als Mediator einer Th2-Antwort gilt (Kapitel 2.1.4.1, Tab. 2.1). Bei Mäusen und Kindern wurde nachgewiesen, dass ihr Immunsystem - verglichen mit adulten Individuen - zunächst eher eine Th2-Antwort ausbildet (Adkins et al. 2004; Rose et al. 2007; Marodi 2002). PBMC humaner Neonaten zeigten im Vergleich zu denen von Erwachsenen eine reduzierte IL-10-Sekretion, die innerhalb der ersten 18 Lebensmonate jedoch deutlich anstieg (Vosters et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse ergab eine Studie an murinen Neonaten (Lacroix-Lamandé et al. 2009). Auch im Vergleich von gesunden Lämmern und adulten Ziegen existieren Hinweise auf eine solche physiologische Veränderung und damit verbundene Reifung des Immunsystems. So stieg in den ersten Lebenswochen die Anzahl CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Darmgewebe gesunder Ziegen und auch ihre Zusammensetzung veränderte sich (Navarro et al. 1997). Es konnte auch gezeigt werden, dass sich verändernde Anteile verschiedener Immunzellen im Lymphknoten eine unterschiedliche Zytokinsekretion von Neonaten und adulten Ziegen bewirkte (Tourais-Esteves et al. 2008). Zwar spiegelte sich die Änderung der Zellzusammensetzung nicht in einer veränderten

IL-10-Sekretion wider, die Kulturüberstände wurden jedoch schon nach vier Stunden Inkubation untersucht. Das Maximum der IL-10-Konzentration wurde in unserem Versuch nach 72 h gemessen – eine verlängerte Inkubationsdauer hätte womöglich andere Ergebnisse erzeugt. Stabel und Robbe-Austerman (2011) geben Hinweise auf altersabhängige Unterschiede in der IL-10-Basissekretion von Rindern. Wurden die Kälber mit einem MAP-Isolat aus Darmgewebe einer klinisch an Paratuberkulose erkrankten Kuh inokuliert, zeigten PBMC bis 90 Tage *p. i.* eine starke IL-10-Sekretion, anschließend sank sie deutlich. Das Alter der inokulierten Kälber lag bei ca. 13 Wochen. Damit ähnelte der Reaktionsverlauf dem in dieser Untersuchung. Allerdings standen für die Beurteilung, ob es sich um einen altersbedingten Effekt handelt bei Stabel und Robbe-Austerman (2011) lediglich zwei Messwerte von Kontrolltieren nach einem Monat und nach zwölf Monaten zur Verfügung. Da der zweite Messwert deutlich unter dem ersten lag, kann ein solcher vermutet werden.

Untersuchungen zu dem Zeitraum, in dem bei gesunden Ziegen in der vorliegenden Studie das Maximum der Zytokinsekretion auftrat, existieren in der internationalen Literatur bisher nicht, so dass die hier aufgetretene altersbedingte Änderung der Zellzusammensetzung und IL-10-Produktion nach 20 bis 22 Wochen noch bestätigt werden muss. Die von Meyer (2011) erhobenen hämatologischen Daten der hier untersuchten Versuchstiere zeigen aber, dass gruppenunabhängig im genannten Zeitraum das Maximum der Gesamtleukozytenzahl und der höchste Lymphozytenanteil auftraten, während der Anteil Monozyten im Versuchsverlauf schwankte (Meyer persönliche Mitteilung, Daten nicht gezeigt). Anschließend sank der Anteil der Lymphozyten im Blut ab. Lymphozytensubpopulationen wurden nicht untersucht. Daher ist unklar, ob sich der Anteil IL-10-produzierender Zellen veränderte. Die im weiteren Versuchsverlauf geringe IL-10-Basissekretion wäre so erklärbar. Mit Paratuberkulose infiziertes Damwild zeigte deutliche Unterschiede in der Zellzusammensetzung von PBMC in Abhängigkeit vom Alter. Der Anteil von CD4+ und CD8+ Zellen stieg, während die Anzahl von Monozyten und  $\gamma\delta$ -T-Zellen sank (Robinson et al. 2010). Die Autoren führen diesen Effekt auf die Reifung des Immunsystems zurück, allerdings fehlte eine negative Kontrollgruppe. Zwar führt letzterer Aspekt dazu, dass ein Einfluss der Infektion nicht ausgeschlossen werden kann, sollte sich dies in Folgestudien jedoch bestätigen, sanken damit mit zunehmendem Alter die Hauptproduzenten von IL-10 ab. Es könnte dann erwartet werden, dass die Menge IL-10 mit zunehmender Versuchsdauer sinkt. Dies würde unsere Daten bestätigen. Tourais-Esteves et al. (2008) wiesen eine deutlich stärkere Zytokinsekretion bei gesunden, adulten, deutlich älteren Ziegen nach; weitere Verlaufsuntersuchungen existieren im Schrifttum nicht. Es ist damit unbekannt, ab welchem Alter die Fähigkeit zur IL-10-Sekretion wieder zunimmt. Bei Kälbern wird vermutet, dass die Entwicklung des Immunsystems nach zwölf Monaten noch nicht abgeschlossen ist, da sie in diesem Alter deutlich weniger IL-10 sezernierten als im Alter von einem Monat (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Verglichen mit den Ergebnissen aus Studien an Mäusen und

Menschen ist auch denkbar, dass eine sinkende Basissekretion gesunder Individuen mit zunehmendem Alter eine Wiederkäuer-spezifische Erscheinung ist.

Die basale Genexpression beider Zytokine von unstimulierten PBMC gesunder Schafe ist ebenfalls geringer als die spezifisch und unspezifisch restimulierter Zellen (Wattegedera et al. 2010). Die basale IL-10-Expression lag unter der von IFN- $\gamma$ . Unstimulierte PBMC von natürlich infizierten Kühen exprimierten in Abhängigkeit vom Infektionsstadium mehr IFN- $\gamma$  als Kontrolltiere. Die IL-10-Expression unstimulierter Zellen von Kontrollkühen und infizierten Tieren unterschied sich dagegen nicht (Coussens et al. 2004). Diese Erkenntnisse sind bei der Beurteilung der Daten der vorliegenden Studie zu berücksichtigen, da die Expression jPPD-restimulierter Zellen als Vielfaches derer unstimulierter PBMC angegeben wird.

Eine weitere Voraussetzung für eine fundierte Dateninterpretation ist die Bestätigung der Fähigkeit der PBMC gegenüber Restimulantien Zytokine sekretieren oder die entsprechenden Gene exprimieren zu können. Um diese Fähigkeit zu überprüfen, wurden in dieser Studie PBMC mit ConA und SEB als Positivkontrollen restimuliert. Bei beiden handelt es sich um Restimulantien, die auf unspezifischem Weg eine Aktivierung von Immunzellen bewirken und so die Expression und Sekretion von Zytokinen initiieren (Kapitel 2.1.7.2.2.2). Beide Substanzen eigneten sich als Positivkontrolle zur Überprüfung der Fähigkeit von PBMC IL-10 und IFN- $\gamma$  zu sekretieren.

Durch Zusatz beider Substanzen bildeten sowohl PBMC von Kontroll- als auch von Versuchstieren mehr IFN- $\gamma$  als unstimulierte Immunzellen, was insbesondere in der Gruppe K2 (spät) deutlich wurde. Die Ergebnisse bestätigen andere Untersuchungen, die ConA als Positivkontrolle einsetzten (Stabel et al. 2007; Wattegedera et al. 2010; Stabel und Robbe-Austerman 2011; Jungersen et al. 2002; Stabel et al. 2011).

Der Reaktionsverlauf im Versuchszeitraum nach ConA-Zugabe unterschied sich von dem einer anderen Untersuchung an Kälbern, wo das Reaktionsmaximum innerhalb der ersten vier Versuchswochen auftrat und die IFN- $\gamma$ -Sekretion anschließend kontinuierlich absank (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Zum einen kann es sich bei diesen Verlaufsunterschieden um tierartspezifische Effekte handeln, zum anderen können individuelle Sekretionsschwankungen und die Gruppenzusammensetzung die Differenzen erklären. Die von Stabel und Robbe-Austerman (2011) untersuchte Anzahl von vier Kälbern war geringer als die der vorliegenden Studie. Im Gegensatz zu den Kontrollziegen in der vorliegenden Untersuchung zeigten sich im ersten Versuchsdrittel höhere Standardabweichungen als im restlichen Versuchsablauf. Individuelle Unterschiede in der Sekretionsfähigkeit von IFN- $\gamma$  sind auch bei Schafen (Wattegedera et al. 2010) und Rindern bekannt (Jungersen et al. 2002).

PBMC der Versuchstiere sekretierten nach ConA-Restimulation signifikant mehr IFN- $\gamma$  als solche der Kontrollziegen. Eine Abhängigkeit im Hinblick auf die Inokulationsdosis oder den Inokulationszeitpunkt wurde nicht festgestellt. Es ist bei Rindern

nachgewiesen, dass Zellen nach einem erfolgten Antigenkontakt deutlich reaktiver sind als solche von Kontrolltieren (Stabel und Robbe-Austerman 2011; Stabel et al. 2007; Shin et al 2005; Stabel et al. 2011). Der Reaktionsverlauf der IFN- $\gamma$ -Sekretion von inokulierten Kälbern gleicht dem der vorliegenden Studie in den früh inokulierten Gruppen (V1, V2) und V3 (spät, geringe Dosis) mit einem Maximum nach ca. 25 Wochen (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Allerdings war eine deutlich stärkere IFN- $\gamma$ -Reaktion im Vergleich zu Kontrolltieren erst 180 Tage *p. i.* nachweisbar. Erklärbar ist dies durch die geringere verwendete Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  ConA, die eine weniger starke Restimulation bewirkte. Zurückzuführen ist die höhere Reaktivität von PBMC infizierter Tiere wahrscheinlich auf das Vorhandensein von infektionsspezifischen T-Gedächtnis-Zellen, die leichter aktivierbar sind. Sie werden nach einer Impfung und auch nach einer natürlichen Infektion gebildet. Der Nachweis, dass gegen Paratuberkulose geimpfte Rinder mehr IFN- $\gamma$  bilden als nicht geimpfte, wurde erbracht (Stabel et al. 2011). Umgekehrt führte eine subkutane Sensibilisierung gesunder Rinder mit jPPD zu einer geringeren Sekretion von IFN- $\gamma$  nach ConA-Restimulation, verglichen mit subklinisch infizierten Rindern (Stabel et al. 2007). Da die Erregerstrukturen dem Immunsystem noch nicht bekannt waren, erfolgte der Aufbau einer Immunreaktion langsamer. Erst nach 14 Tagen stieg die IFN- $\gamma$ -Reaktion. Der entsprechende Anstieg an CD45<sup>+</sup> T-Gedächtnis-Zellen bestätigt, dass das Immunsystem auf die Sensibilisierung reagierte. Auch andere Studien wiesen solche Gedächtniszellen beim Rind nach (Allen et al. 2009; Park et al. 2011). Die vorliegenden Ergebnisse legen ihr Vorhandensein bei Ziegen nahe. ConA ist in der Lage, eine antigenspezifische Restimulation der PBMC „vorzutauschen“, so dass vermutet werden kann, dass dieselben Aktivierungswege wie von MAP-Antigenen genutzt werden.

Die Sekretionsfähigkeit für IL-10 durch Restimulation mit ConA ist weniger gut untersucht als die für IFN- $\gamma$ . ConA rief jedoch eine IL-10-Produktion von PBMC gesunder Schafe hervor (Wattegedera et al. 2010). Diese unterschied sich aber individuell. Eine weitere Studie bestätigte die Induktion einer IL-10-Sekretion bei gesunden und infizierten Rindern nach Zugabe von ConA (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Auch in der vorliegenden Studie bewirkte die Restimulation mit ConA, verglichen mit unstimulierten Zellen, eine deutliche Steigerung der IL-10-Sekretion unabhängig vom Infektionsstatus. Große individuelle Unterschiede wurden in der ersten Versuchshälfte anhand der großen Spannweiten innerhalb der Gruppen deutlich und bestätigten die Ergebnisse von Wattegedera et al. (2010). Tendenziell sekretierten Zellen der Gruppe K1 (früh) in der zweiten Versuchshälfte jedoch mehr Zytokin als solche der früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis). Da zu diesem Zeitpunkt von den Versuchstieren deutlich mehr IFN- $\gamma$  produziert wurde als von Kontrolltieren, kann spekuliert werden, dass die starke IFN- $\gamma$ -Reaktion die Sekretion von IL-10 hemmte. Auch eine altersbedingte Änderung der Zellzusammensetzung und eine damit sinkende Fähigkeit zur IL-10-Sekretion

könnten dazu geführt haben, dass individuelle Unterschiede in der Sekretionsfähigkeit für IL-10 maskiert wurden.

Die Effekte nach einer Restimulation von PBMC mit SEB zur Sekretion von IL-10 und IFN- $\gamma$  entsprachen im Wesentlichen denen von ConA. Der langsamere Anstieg der IFN- $\gamma$ -Sekretion in Zellkulturüberständen von drei der vier Versuchsgruppen, denen in den ersten 16 Wochen *p. i.* SEB statt ConA zugegeben worden war, ist zu vernachlässigen. Jungersen et al. (2002) fanden eine stärkere Zytokinsekretion nach SEB- als nach ConA-Zugabe, setzten aber geringere Konzentrationen beider Restimulantien ein. SEB wird nur vereinzelt als Positivkontrolle für die IFN- $\gamma$ -Sekretion verwendet. Thomsen et al. (2011) verwendeten SEB, machten jedoch keine Angaben zur Eignung. Aus den in der Studie angegebenen Daten lässt sich jedoch eine gute IFN- $\gamma$ -Induktion ableiten. Die IL-10-Sekretion nach SEB-Zugabe zu PBMC ist nicht evaluiert. Im Vergleich zu ConA sekretierten PBMC tendenziell mehr IL-10, wenn ihnen SEB zugesetzt worden war. Beide Positivkontrollen simulieren über unterschiedliche Mechanismen eine antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen unter Einbeziehung von MHC-II-Molekülen auf Monozyten. Die genauen Mechanismen der Zellaktivierung durch beide Substanzen sind ungeklärt. SEB scheint jedoch v. a. CD4+ und CD8+ Zellen zu aktivieren (Miller 1983). Damit werden potentiell IL-10 produzierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht erfasst. ConA aktiviert als polyklonales Stimulans dagegen alle Zellen mit T-Zell-Rezeptor, also sowohl  $\alpha\beta$ - als auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Es wäre demnach eigentlich zu erwarten, dass nach ConA-Restimulation mehr IL-10 als nach SEB-Restimulation gebildet wird. Dies ist nicht der Fall und kann auf die geringere IFN- $\gamma$ -Sekretion nach SEB-Zugabe zu den PBMC zurückzuführen sein. Eine weniger starke Hemmung von Monozyten in ihrer IL-10-Produktion ist denkbar. Aufschluss über die zugrunde liegenden Zusammenhänge kann nur die Differenzierung der unterschiedlichen Zellpopulationen und ihrer Anteile an den gesamten PBMC z. B. mittels Durchflusszytometrie geben.

Zur Überprüfung der Genexpressionsfähigkeit von PBMC nach SEB-Zugabe existieren keine Vergleichsdaten. Es konnte gezeigt werden, dass es auf seine Eignung als Positivkontrolle für jedes einzelne Zytokin getestet werden muss. Eine zuverlässige Expressionssteigerung war lediglich für die mRNA von IFN- $\gamma$  und TGF $\beta$  nachweisbar. Eine einheitliche, gruppenunabhängige Expressionsreduktion bewirkte SEB bei TNF $\alpha$ . Die gewünschte Induktion der Genexpression trat nicht auf. Die Gene von IL-10 und IL-12p40 wurden durch SEB weder einheitlich induziert, noch gehemmt. SEB eignet sich daher nur für zwei der fünf untersuchten Zytokingene als Positivkontrolle.

### **6.2.2 Auswahl einer geeigneten Konzentration jPPD und aPPD**

Für jeweils zwei verschiedene Konzentrationen jPPD und aPPD zeigten sich nur zu wenigen BZP signifikante Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion. Zu den entsprechenden BZP bildeten mit der höheren Konzentration restimierte Zellen mehr IFN- $\gamma$ . Zu den

übrigen BZP, zu denen keine signifikanten Differenzen nachweisbar waren, zeigte sich dieser Effekt jedoch tendenziell. Dies ist die erste Veröffentlichung, die die Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Zugabe von zwei verschiedenen PPD-Konzentrationen an PBMC evaluierte. Eine Konzentrationsabhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Produktion von den Stimulantien wurde nachgewiesen. Ein Einfluss von Inokulationsdosis oder Inokulationszeitpunkt ist ausgeschlossen. Unsere Daten bestätigen andere Studien, die jPPD (Jungersen et al. 2002) oder aPPD (Rothel et al. 1992) verwendeten. Die Vergleichsstudien zeigten, dass es sich bei der Konzentrationsabhängigkeit nicht um eine lineare Steigerung handelt, sondern mit steigender Menge zugegebenem PPD ein Sättigungseffekt eintrat. Dies erklärt sich durch die begrenzte Anzahl an Monozyten pro Probe, die so nur eine begrenzte Menge an Antigen an die Lymphozyten präsentieren können. Die in dieser Studie nachgewiesenen Unterschiede in der Zytokinproduktion in Abhängigkeit von der eingesetzten PPD-Konzentration zeigen, dass der Sättigungseffekt nicht erreicht worden war. Die Ergebnisse decken sich mit denen von Jungersen et al. (2002), die die maximale IFN- $\gamma$ -Sekretion bei Konzentrationen zwischen 40-80  $\mu$ l/ml nachwiesen. Allerdings verwendeten sie und Rothel et al. (1992) jeweils Vollblut. Eine Evaluation des IFN- $\gamma$ -Assays unter Verwendung verschiedener PPD-Konzentrationen an PBMC ist bisher nicht veröffentlicht.

Tendenziell wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-10-Sekretion nach Restimulation mit jPPD und aPPD nachgewiesen, wobei die Zugabe der höheren Konzentration aPPD nicht zu einer so starken Steigerung der IL-10-Sekretion führte wie die der höheren Menge jPPD. Bei PPDs handelt es sich um ein Antigengemisch unbekannter Zusammensetzung (Goiffié et al. 2012). Ob darin auch Bestandteile enthalten sind, die eine unspezifische IL-10-Sekretion bei Monozyten selbst oder bei anderen IL-10 produzierenden Zellen, die diese Bestandteile präsentiert bekommen, bewirken, ist unbekannt. Es erscheint aber möglich. Es wurde gezeigt, dass Monozyten und Makrophagen von gesunden Rindern oder Zelllinien aus der Zellkultur, die nicht mit anderen Zellarten inkubiert worden waren, nach einer Phagozytose von MAP mehr IL-10 sekretierten (Borrmann et al. 2011; Weiss et al. 2002; Weiss et al. 2005). Die gesteigerte IL-10-Produktion war keine Reaktion auf IFN- $\gamma$  und unabhängig von der T-Zell-Aktivierung. Damit hatte der Infektionsstatus der Tiere keinen Einfluss auf die IL-10-Sekretion, denn unabhängig davon wird bei Kontakt mit einem körperfremden Antigen das unspezifische Immunsystem aktiviert. Es ist davon auszugehen, dass bei der Gewinnung von jPPD aus der Flüssigkultur von MAP auch abgestorbene MAP und seine Zerfallsprodukte nicht aus dem Gemisch herausgetrennt werden. Solche Produkte können unspezifisch als Antigene fungieren, die von Makrophagen aufgenommen werden und die IL-10-Induktion bewirken. Souza et al. (2013) zeigten, dass die IL-10-Produktion auch durch das Kohlenhydrat Man-LAM - einem Zellwandbestandteil von MAP - gesteigert wird. Zwar sind PPDs Proteingemische, dennoch ist denkbar, dass

bestimmte Eiweißstrukturen ähnlich unspezifisch als Antigene wirken und IL-10 induzieren. Damit erklärt sich die Sekretion von IL-10 auch durch Kontrolltiere.

Die festgestellten Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen des jeweiligen PPD waren nicht so deutlich, dass sie die weitere Ergebnisauswertung beeinflussten. Eine Maskierung der Unterschiede zwischen den Gruppen oder innerhalb der Gruppen durch die niedrigere Konzentration PPD ist nicht zu erwarten. In der Literatur wurden häufig 10 µg/ml jPPD verwendet (Stabel et al. 2007; Lybeck et al. 2009; Mikkelsen et al. 2009; Huda et al. 2003; Hasvold et al. 2002; Thomsen et al. 2011), auch höhere Konzentrationen wurden eingesetzt (O'Brien et al. 2006; Steward et al. 2004; Robinson et al. 2008; Reddacliff et al. 2006; Begg et al. 2005; Gillan et al. 2010). Die von uns verwendete Menge war deutlich geringer, es wurde jedoch gezeigt, dass bereits Konzentrationen unterhalb von 1 µg/ml eine IFN- $\gamma$ -Sekretion bewirkten (McDonald et al. 1999). Auch in der vorliegenden Studie war dies eindeutig der Fall, so dass trotz verminderter Vergleichbarkeit mit der internationalen Literatur von einer ausreichenden Konzentration ausgegangen wird.

### 6.2.3 Spezifität der Reaktion

Es wurde eine MAP-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen. Kontrolltiere und unstimulierte Zellen inokulierter Tiere bildeten signifikant weniger IFN- $\gamma$  als jPPD-restimulierte PBMC infizierter Ziegen. Die Restimulation mit aPPD führte zu einer schwächeren IFN- $\gamma$ -Sekretion in den Versuchsgruppen als eine Zugabe von jPPD. In einer anderen Studie überstieg die IFN- $\gamma$ -Reaktion gegenüber aPPD die nach jPPD-Restimulation (Jungersen et al. 2002). Es wurden Rinder unterschiedlichen Alters aus einer kommerziellen Herde untersucht, ein Kontakt zu atypischen Mykobakterien ist daher wahrscheinlich (McDonald et al. 1999) und erklärt die Differenzen zu unseren Ergebnissen. Bei geimpften Tieren aus kommerziellen Herden glichen sich die Reaktionen auf beide PPDs (Thomsen et al. 2011). Ein aktivierender Effekt des verwendeten Adjuvants auf die Immunreaktion muss jedoch berücksichtigt werden. Auch in einem Infektionsmodell an Schafen glichen sich die Reaktionen auf aPPD und jPPD (Steward et al. 2004). Aviäres PPD wurde jedoch in einer deutlich höheren Konzentration als jPPD eingesetzt, ein direkter Vergleich ist daher kaum möglich. Andere Studien bestätigen unsere Ergebnisse (Robbe-Austerman et al. 2006b; Robinson et al. 2008). Chargenunterschiede in den PPDs sind bekannt und führen zu unterschiedlichen Antigengehalten im Gemisch. Eine unterschiedlich starke Aktivierung der Immunantwort könnte die Folge sein und ist zu berücksichtigen. Falls die verwendete Charge weniger Antigene enthielt, ist auch eine geringere Reaktion zu erwarten. In der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) traten am Ende des Versuchs keine signifikanten Unterschiede mehr auf, obwohl der Median jPPD-restimulierter PBMC jeweils über dem aPPD-restimulierten Zellen lag. In dieser Gruppe befanden sich zu den genannten Zeitpunkten nur noch drei Tiere, ihre Reaktion auf die Restimulation war sehr individuell, was die großen Spannweiten zeigen.



Die Unterschiede in der IL-10-Reaktion zwischen jPPD und aPPD-restimulierten PBMC waren nicht eindeutig. Da mehrfach nachgewiesen werden konnte, dass die Hauptproduktion von IL-10 durch Monozyten bzw. Makrophagen gewährleistet wird (Lybeck et al. 2009; Nagata et al. 2010) und diese unspezifisch ist (Kapitel 6.2.1), kann keine Spezifität erwartet werden. Die Reaktion macht es wahrscheinlich, dass auch in dieser Studie Monozyten für die IL-10-Produktion verantwortlich sind.

Betrachtet man die Transkription verschiedener Zytokingene unter diesem Aspekt, wird klar, dass unterschiedliche Restimulantien jeweils individuelle Reaktionsmuster bei den verschiedenen Zytokingenen widerspiegeln, die jedoch im Infektionsverlauf nicht immer einheitlich waren. Während sich für IFN- $\gamma$  tendenziell bestätigte, dass aPPD eine geringere Reaktion auslöst, ergaben sich für die anderen Zytokine keine eindeutigen Unterschiede. PBMC bestehen aus verschiedenen Zellarten, die jeweils unterschiedlich auf einzelne Zytokine in unterschiedlicher Konzentration und Kombination reagieren (Balkwill und Burke 1989). Die Genexpression wurde hier in einem Zellgemisch untersucht. Die Untersuchung der Expression der einzelnen Zellarten hätte evtl. zu genaueren Informationen geführt. In der Literatur werden hinsichtlich der Genexpression von PBMC sehr unterschiedliche Ergebnisse beschrieben. Unstrittig ist nur, dass eine Infektion die Expression verschiedener Zytokingene verändert (Kapitel 2.1.4.3 und 2.1.4.4) und zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Expression führt. Es ist außerdem bekannt, dass sich die Expression zwischen Infektionsstadien und der beprobten Lokalisation unterscheidet (Kapitel 2.1.4.3 und 2.1.4.4). Die hier dargestellten Ergebnisse sind daher nur eine Momentaufnahme und für die Aufklärung vom Zusammenwirken der Zellen nur bedingt aussagekräftig.

#### **6.2.4 Abhängigkeit der Immunreaktion, der MAP-Ausscheidung, der klinischen Symptome und der pathologischen Befunde vom Alter der Tiere und der Inokulationsdosis**

Dies ist die erste Studie, die innerhalb der ersten Lebensmonate von Ziegen umfassend untersuchte, ob Abhängigkeiten zwischen der Ausprägung pathologischer und histologischer Läsionen, der Erregerausscheidung, der humoralen und zellulären Immunantwort von der Inokulationsdosis und dem Inokulationsalter existieren. Bisherige Studien an Kälbern, Schafen und Wild untersuchten jeweils die Abhängigkeit verschiedener einzelner Aspekte zwischen unterschiedlichen Altersgruppen, die sich jeweils um mehrere Monate bis Jahre unterschieden (Macintosh et al. 2010; Robinson et al. 2010; McGregor et al. 2012; O'Brien et al. 2006; Brotherston et al. 1961; Reddacliff und Whittington 2003; Delgado et al. 2012).

Ein Einfluss der hier verwendeten Inokulationsdosen auf die Ausprägung der pathologischen und histologischen Veränderungen, die MAP-Ausscheidung mit dem Kot, die Sekretion und Expression verschiedener Zytokine durch PBMC und auf die Antikörperproduktion bestand nicht.

In einem experimentellen Modell an Damwild (O'Brien et al. 2006) und entsprechenden Untersuchungen an Schafen (Brotherston et al. 1961; Reddacliff und Whittington 2003) wurde eine eindeutige Steigerung der Infektionsrate mit steigender Inokulationsdosis nachgewiesen. In der vorliegenden Studie ließen sich dagegen zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Infektionsrate beobachten. Lediglich bei einem inokulierten Lamm war keine Infektion nachweisbar. Allerdings unterschieden sich die eingesetzten Dosen in den genannten Vergleichsstudien jeweils um mindestens eine log-Stufe. In unserer Untersuchung wurden dagegen Inokulationsdosen eingesetzt, die sich lediglich um den Faktor zwei unterschieden. Es wurde erstmals gezeigt, dass dieser geringe Unterschied nicht ausreicht, um die bei anderen Tierarten auftretenden Unterschiede in der Infektionsrate darzustellen. Dazu beigetragen haben kann auch die Höhe der gewählten Gesamtdosen, die bekanntermaßen zuverlässig zu einer Infektion einer großen Anzahl von Tieren führen. Dies kann eine Maskierung von Unterschieden bewirken (Kapitel 2.2).

Zwischen der Antikörperreaktion und der IFN- $\gamma$ -Reaktion von Ziegen, die mit unterschiedlichen MAP-Dosen inokuliert worden waren, ließen sich keine Unterschiede nachweisen. Neben den bereits erläuterten Gründen liegt dies an der geringen Tierzahl pro Gruppe und den großen Schwankungen der Reaktionsintensität innerhalb der Gruppen. Der Einfluss einer geringen Tierzahl auf die Untersuchungsergebnisse ist bereits im Abschnitt „Eignung des Tiermodells“ der Diskussion beschrieben worden (Kapitel 6.1). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der IFN- $\gamma$ -Reaktion der vorliegenden Untersuchung wurde bei Kälbern, die zwei unterschiedliche Inokulationsdosen erhalten hatten, eine frühere und stärkere IFN- $\gamma$ -Sekretion bei Tieren festgestellt, die mit einer höheren Dosis inokuliert worden waren (Mortier et al. 2014a). Auch Damwild reagierte ähnlich (O'Brien et al. 2006). Mit einer höheren Dosis inokulierte Kälber, Schafe oder Damwild produzierten außerdem häufiger und z. T. mehr Antikörper als solche, die eine niedrigere Dosis bekommen hatten (Mortier et al. 2014b; O'Brien et al. 2006; Delgado et al. 2012). Auch Schafe, die mit einem ovinen Stamm inokuliert worden waren, zeigten tendenziell eine stärkere Intensität der IFN- $\gamma$ -Bildung, wenn sie eine höhere Dosis MAP erhalten hatten. Ausschließlich bei solchen Schafen gelang auch ein Antikörpernachweis (Reddacliff und Whittington 2003). In allen Vergleichsstudien unterschieden sich die verwendeten Inokulationsdosen deutlich stärker als in unserer Untersuchung. Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion und der Antikörperproduktion sind also nur zu erwarten, wenn sich die verwendeten Inokulationsdosen um mehr als den Faktor zwei unterscheiden.

Empfänglichkeitsunterschiede für die Paratuberkulose hinsichtlich des Inokulations- bzw. Infektionsalters sind im Schrifttum besser dokumentiert als Einflüsse der Inokulationsdosis. In einer Metaanalyse zeigte sich, dass Kälber unter sechs Monaten ein deutlich höheres Infektionsrisiko besaßen als solche zwischen sechs und zwölf Monaten. Zwölf Monate alte Kälber waren nochmals weniger infektionsgefährdet (Windsor und Whittington 2010). Hinsichtlich der pathologischen und

pathohistologischen Befunde und des immunhistologischen Mykobakteriennachweises führte eine Inokulation ab dem dritten LT in der vorliegenden Studie ebenfalls zu deutlicheren Veränderungen als eine ab dem 42. LT. So traten in den Organen außerhalb des Magen-Darmtraktes hauptsächlich in den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) Paratuberkulose-typische Veränderungen auf. In diesen Gruppen waren auch die Läsionen an Darm und Lymphknoten am schwersten, Mykobakterien waren am häufigsten immunhistologisch nachweisbar (Meyer 2011). Zwar bestätigen auch andere Autoren diese Abhängigkeit, keine der Studien untersuchte jedoch die Effekte bei so jungen Versuchstieren und bei so eng beieinander liegenden Inokulationszeitpunkten. In einer Untersuchung wurden Kälber zwischen zwei Wochen und zwölf Monaten inokuliert, wobei sich die Inokulationszeitpunkte um jeweils drei Monate unterschieden. Jüngere Kälber wiesen schwerere histologische Läsionen auf als ältere. Außerdem wurde MAP in einer größeren Anzahl untersuchter Gewebeproben nachgewiesen, wenn die Tiere jünger waren (Mortier et al. 2014c). Auch bei Schafen traten histologische Veränderungen in Gewebeproben mit zunehmendem Alter häufiger auf; ihre Schwere nahm zu. Jüngere Tiere schieden den Erreger außerdem häufiger aus (McGregor et al. 2012). Die untersuchten Schafe kamen im Alter von ca. sechs, 30 und 60 Monaten erstmalig mit MAP in Kontakt. Die vorliegende Untersuchung und die von Meyer (2011) sind die ersten Studien, in denen gezeigt wurde, dass bereits geringe zeitliche Unterschiede in der Inokulation bei Ziegenlämmern im Alter von bis zu zwei Monaten zu Empfänglichkeitsunterschieden hinsichtlich der pathohistologischen Veränderungen führen. Es wurde bestätigt, dass eine frühere Inokulation zu einer schwereren Ausprägung der Läsionen führt.

Die abnehmende Empfänglichkeit gegenüber der Infektion wird mit der Involution der IPP und der in diesem Zusammenhang abnehmenden Anzahl M-Zellen erklärt (Kapitel 2.1.3.2; Robinson et al. 2010). Die Involution beginnt beim Schaf ab dem dritten und dauert bis zum 18. Lebensmonat an (Valheim et al. 2002; Reynolds und Morris 1983). Der Zusammenhang zwischen Alter, steigender Darmlänge und der Zunahme der von PP freien Abschnitte bis zur Rückbildung wurde ebenfalls beschrieben (Carlens 1928). Da die beiden hier gewählten Inokulationszeitpunkte im Zeitraum vor der Involution lagen, waren Differenzen in der Empfänglichkeit eigentlich nicht zu erwarten. Diese Theorie wird jedoch von den Ergebnissen der anderen zitierten Untersuchungen, die die Inokulation von Jährlingen oder adulten Tieren einschließen, gestützt. Die frühe Inokulation und Ausscheidung von MAP mit dem Kot bedingten eine lange Expositionszeit gegenüber dem Erreger in einem Alter, in dem die IPP noch vorhanden war. Reinfektionen innerhalb der Versuchsdauer, die zu einer stärkeren Erregerlast führten, sind daher wahrscheinlicher als bei älteren Tieren. Die altersbedingte Induktion von IL-10 könnte außerdem zu einer Hemmung der Th1-Antwort in den frühen Infektionsphasen geführt und so die effektive Abtötung von MAP verhindert haben.

Drei Ziegen entwickelten während des Versuchszeitraumes klinische Symptome, die typisch für Paratuberkulose gewesen sein könnten. Zwei Ziegen waren früh mit

unterschiedlichen Dosen inokuliert worden, eine Ziege zum späten Zeitpunkt mit der hohen MAP-Dosis. Ein eindeutiger Einfluss der Inokulationsdosis oder des Inokulationszeitpunktes ließ sich nicht erkennen. Allerdings schieden drei weitere Tiere ausschließlich aus der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) aufgrund einer unspezifischen ZNS-Symptomatik aus, die auf einen Thiaminmangel zurückzuführen war. Das Vitamin ist essentieller Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes. Dieser spielt in den Mitochondrien der Zellen eine entscheidende Rolle für die Energiebereitstellung aus Glucose. Infolge eines Thiaminmangels kommt es zur Hemmung der Enzymwirkung. Ein Energiemangel in den Zellen, der ihre Funktion beeinträchtigt, ist die Folge. Die entstehende Ketoazidose beeinflusste nachweislich die Sekretion von IFN- $\gamma$  (Lardner 2001). Ein Thiaminmangel im Futter war ausgeschlossen, da Kontrolltiere nicht erkrankten. Ob bei Versuchstieren eine eingeschränkte Synthese im Pansen stattfand, bleibt unklar. Eine verminderte Resorption im Dünndarm durch entstandene Läsionen schließt Meyer (2011) aufgrund der geringgradigen pathologischen Befunde aus. Die Ursache für den Mangel könnte also ein erhöhter Verbrauch des Vitamins sein. Ob eine gesteigerte Reaktion des Immunsystems für diesen Verbrauch verantwortlich ist, muss verifiziert werden. Die erhobenen Daten weisen jedoch darauf hin, dass eine frühe Inokulation mit einer hohen Dosis von MAP zu einer höheren körperlichen Belastung der Tiere durch die Infektion führt. Auf einen solchen Zusammenhang wiesen auch die erhöhten Herzfrequenzen der früh inokulierten Tiere hin (Kapitel 5.1.1).

Signifikante Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion und der Antikörperbildung hinsichtlich des Inokulationszeitpunktes wurden dagegen in unserer Untersuchung nicht festgestellt. Auch hier führen die großen individuellen Schwankungen der Reaktion der Tiere innerhalb der Gruppen dazu, dass Unterschiede maskiert werden. Adulte Schafe zwischen zwei und elf Jahren bildeten früher und mehr IFN- $\gamma$  als drei Monate alte Lämmer. Die Reaktion der älteren Tiere stieg jedoch langsamer an als die der jüngeren. Auch die Antikörperreaktion war bei adulten Schafen deutlich stärker ausgeprägt (Delgado et al. 2012). Eine andere Studie konnte dagegen keine Unterschiede in der Antikörperproduktion oder IFN- $\gamma$ -Sekretion in Abhängigkeit vom Inokulationsalter nachweisen (Mortier et al. 2014a, b). Die verschiedenen Inokulationszeitpunkte lagen in beiden Untersuchungen jeweils drei Monate auseinander. Die Kälber bei Mortier et al. 2014a, b) waren mit maximal zwölf Monaten zum Zeitpunkt der Inokulation zwar jünger als die adulten Tiere bei Delgado et al. (2012), aber auch in einer weiteren Studie an sechs bis 60 Monate alten Schafen waren keine Unterschiede in der Antikörperproduktion nachweisbar (McGregor et al. 2012). Die genaue Inokulationsdosis in dieser Studie wurde allerdings nicht angegeben. Delgado et al. (2012) verwendeten geringere Dosen als Mortier et al. (2014b). Es kann daher abschließend keine eindeutige Aussage getroffen werden, ab welchem Alter und unter welchen Bedingungen sich die Immunreaktion verändert.

Der altersbedingte Effekt der IL-10-Sekretion stellte sich unabhängig von der Inokulation dar. Unterschiede hinsichtlich Inokulationsdosis und Inokulationszeitpunkt

existierten nicht. Auch die Genexpression wurde durch die unterschiedlichen Inokulationsschemata nicht beeinflusst.

## 6.2.5 Beurteilung und Interpretation des Infektionsverlaufs

### 6.2.5.1 IFN- $\gamma$

Die Inokulation mit MAP induzierte nach Restimulation von PBMC bei 26 Versuchstieren eine frühe und starke IFN- $\gamma$ -Sekretion im gesamten Versuchsverlauf. Die Kinetik der Reaktion war kurvenförmig mit einem Reaktionsmaximum 28 Wochen *p. i.* Die Intensität der IFN- $\gamma$ -Sekretion war durch große individuelle Unterschiede gekennzeichnet, was insbesondere nach einer frühen Inokulation in der ersten Versuchshälfte durch große Spannweiten deutlich wurde.

Die frühe IFN- $\gamma$ -Bildung ist typisch für Tiere, die eine hohe Inokulationsdosis erhalten hatten. Andere Infektionsmodelle an unterschiedlichen Tierarten bestätigen die frühe IFN- $\gamma$ -Induktion in unserer Untersuchung (Stabel und Robbe Austerman 2011; Begg et al. 2005; Begg et al. 2011; Steward et al. 2004, 2006, 2007). In diesen Modellen wurden Inokulationsdosen von minimal  $1,0 \times 10^9$  MAP verwendet. Erstmals nachweisbare Zytokinreaktionen traten in einem Zeitraum zwischen zwei Wochen und vier Monaten *p. i.* auf. Ein Anstieg nach Inokulation von Rotwild mit geringeren Dosen war weniger stark und trat deutlich später auf (O'Brien et al. 2006). In einem ovinen Modell, in dem die Tiere mit einer Dosis von  $4,4 \times 10^8$  MAP inokuliert wurden, war eine IFN- $\gamma$ -Sekretion erst nach 4,5 Monaten nachweisbar (Gwozdz et al. 2000a).

Stämme vom Typ-I bewirkten eine deutlich schwächere IFN- $\gamma$ -Reaktion (O'Brien et al. 2006; Steward et al. 2004, 2006, 2007). Auch Laborstämme waren gegenüber klinischen Isolaten oder direkt mit intestinale Gewebe erkrankter Tiere verabreichten MAP-Isolaten weniger immunogen (O'Brien et al. 2006; Steward et al. 2004, 2006, 2007; Begg et al. 2010). Der starke Anstieg der IFN- $\gamma$ -Reaktion ist daher u. a. auf den verwendeten, wenig passagierten Laborstamm vom MAP-Typ-II zurückzuführen.

Der eingipflige kurvenförmige Verlauf der IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde von anderen Autoren ebenfalls beobachtet (Begg et al. 2011; O'Brien et al. 2006; Begg et al. 2010; Delgado et al. 2012). Allerdings variierte der Zeitpunkt des Reaktionsmaximums genauso wie der des Absinkens der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Blut. Das Absinken der IFN- $\gamma$ -Reaktion, zeigt, dass der hier beobachtete Verlauf die natürliche Reaktionskinetik imitierte. Bei länger andauernden Versuchen wurden auch zwei- oder mehrgipflige Verläufe beobachtet (O'Brien et al. 2006; Steward et al. 2006; Begg et al. 2010). In unserer Untersuchung ist nicht auszuschließen, dass bei längerer Versuchsdauer eine wieder ansteigende Zytokinreaktion zu beobachten gewesen wäre. Ein Hinweis ist der Anstieg der Reaktion ab der 44. Woche *p. i.* in allen Versuchsgruppen. Da sich MAP langsam im Darm ausbreitet, treten verschiedene Infektionsstadien parallel auf. Die lokale Immunreaktion unterscheidet sich je nach vorliegender Situation. Je nachdem, ob eine

Th1- oder Th2-Antwort in regionalen Lymphknoten und Darmgewebe vorherrscht, wird diese im Blut widerspiegelt (Burells et al. 1998; Munjal et al. 2005), so dass sich schwankende Reaktionen im Jungtialter ebenso erklären lassen wie die hohe individuelle Schwankungsbreite der Reaktionen in der vorliegenden Studie. Auch in anderen Studien wurden sehr unterschiedliche Einzeltierreaktionen nachgewiesen. Begg et al. (2011) zeigten, dass im Gruppenmittel ein ähnlicher Reaktionsverlauf wie in der vorliegenden Untersuchung auftrat. Sie wiesen jedoch auch nach, dass bei unterschiedlichen Individuen verschiedene Reaktionstypen auftraten. Diese Typen spiegelten die häufig in der internationalen Literatur beobachteten mittleren Reaktionsverläufe in der jeweils untersuchten Testpopulation wider. Eine stetig ansteigende IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde ebenso beobachtet (Begg et al. 2010) wie die hier nachgewiesene Kinetik der IFN- $\gamma$ -Reaktion (Begg et al. 2010; Gwozdz et al. 2000a; Delgado et al. 2012; O'Brien et al. 2006). Eine zunächst steigende IFN- $\gamma$ -Reaktion mit anschließend relativ konstantem Verlauf wie von Begg et al. (2011) gezeigt, wurde auch in anderen Untersuchungen an Schafen, Ziegen und Rindern bestätigt (Stabel und Robbe-Austerman 2011; Storset 2001; Delgado et al. 2012). Je nachdem welcher Reaktionstyp in der untersuchten Population überwiegt, spiegelt er sich im Gruppenmittel wider. Bei der Betrachtung von Einzeltieren zeigten sich unterschiedliche Reaktionen oder Abweichungen vom mittleren Reaktionsmuster (Nagata et al. 2010; Storset et al. 2001; Steward et al. 2006, 2004).

Bei natürlich infizierten Tieren waren erste positive Reaktionen bereits im Alter von wenigen Monaten nachweisbar, sie schwankten jedoch (Huda et al. 2003; Lybeck et al. 2011). Eine konstante IFN- $\gamma$ -Reaktion, die eine permanente Auseinandersetzung mit MAP anzeigt, trat bei Rindern und Ziegen erst mit ca. elf Monaten auf. Die intermittierenden Reaktionen spiegeln außerdem die Möglichkeit der Reinfektion mit MAP durch eine andauernde Erregerexposition wider. Dies kann ebenfalls eine Ursache für schwankende Reaktionen in experimentellen Modellen sein, die eine geringe Inokulationsdosis verwendeten (Begg et al. 2010). Geht man davon aus, dass natürlich exponierte Tiere kontinuierlich kleinere Erregermengen aufnehmen und die Auseinandersetzung mit dem Immunsystem zu einer gewissen Kontrolle der Erregervermehrung führt, ist eine schwankende IFN- $\gamma$ -Sekretion in frühem Lebensalter zu erwarten.

Die Transkription von IFN- $\gamma$  wurde im gesamten Versuchsverlauf stark induziert und spiegelte die Sekretion des Zytokins im Verlauf wider. Die stärkste Expression wurde 16 oder 28 Wochen *p. i.* mit anschließendem Abfall der Expressionsstärke in den Gruppen V2 (früh, hohe Dosis), V3 (spät, geringe Dosis) und V4 (spät, hohe Dosis) nachgewiesen. In der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) wurde dieser Effekt durch die großen individuellen Unterschiede maskiert.

### 6.2.5.2 IL-10

Bei Ziegen, die ab dem dritten oder 42. LT mit zwei verschiedenen Inokulationsdosen MAP inokuliert worden waren, wurde bis zur 28. Woche *p. i.* eine altersbedingte Induktion von IL-10 nachgewiesen. Anschließend blieb die Zytokinsekretion bis zum Versuchsende auf einem niedrigen Niveau. Dieser Reaktionsverlauf ist auf eine Hemmung der IL-10-Sekretion durch die früh einsetzende IFN- $\gamma$ -Reaktion zurückzuführen.

Die Kinetik der IL-10-Reaktion in unserer Studie wurde auch bei Rindern, die mit einer deutlich höheren Gesamtdosis inokuliert worden waren, nachgewiesen. Sie sank zwischen dem ersten und vierten Monat *p. i.*, während die IFN- $\gamma$ -Sekretion ab dem dritten Monat stark stieg (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Es ist davon auszugehen, dass eine hohe Inokulationsdosis für die frühe Induktion der proinflammatorischen zellulären Immunantwort verantwortlich ist. Nach Impfungen wurde eine ähnlich schnelle und starke IFN- $\gamma$ -Reaktion wie in der vorliegenden Studie induziert, die zur besseren Kontrolle einer nachfolgenden Infektion mit Paratuberkulose führte (Gwozdz et al. 2000a; Begg und Griffin 2005; Kathaperumal et al. 2009). Ein gleichzeitiger, deutlicher Abfall der IL-10-Sekretion, der im Verlauf dem in unserer Untersuchung gleich, wurde bei Kälbern gezeigt (Stabel et al. 2011). Nach der Impfung wird MAP möglicherweise schneller über die Lymphgefäße in die regionalen Lymphknoten transportiert und dort von DC an T-Lymphozyten präsentiert. Die zugegebenen Adjuvantien verstärken diesen Effekt. Wie Monozyten sind DC von MAP infizierbar, es findet jedoch keine Expressionsverminderung von MHC-Molekülen statt (Kapitel 2.1.4.2), so dass von einer effektiveren Antigenpräsentation auszugehen ist. Durch die Modifizierung der Impfstämme ist evtl. die Reifung dieser Zellen weniger stark beeinträchtigt als nach einer MAP-Infektion, so dass sie schneller in die Lymphknoten migrieren.

Makrophagen selbst werden im Gegensatz zum Kontakt mit LPS-haltigen Erregern durch MAP nicht direkt aktiviert (Hostetter et al. 2002). Sie sind die Hauptproduzenten von IL-10 in Paratuberkulose-infizierten Tieren (Lybeck et al. 2009). Die Induktion des Zytokins erfolgt bereits wenige Stunden nach der Infektion (Borrmann et al. 2011; Weiss et al. 2002). Die Sekretion wird jedoch durch die Aktivierung der Makrophagen gehemmt, die Abtötung von MAP wird effizienter (Hostetter et al. 2002; Weiss et al. 2005). Nach einer oralen Inokulation mit MAP scheint eine größere Erregermenge für die frühe Aktivierung der IFN- $\gamma$ -Antwort notwendig zu sein. IFN- $\gamma$  hemmt die IL-10-Sekretion (Hu et al. 2006). Entscheidend ist daher dessen frühe Induktion um noch nicht infizierte Makrophagen zu aktivieren.

Eine Studie, in der natürlich und experimentell infizierte Schafe eine höhere und ab dem vierten Monat *p. i.* kontinuierlich steigende IL-10-Sekretion im Vergleich zu Kontrollen zeigten, widerspricht nur scheinbar dieser These (de Silva et al. 2011). Da Zellen der natürlich infizierten Schafe im Vergleich zu experimentell infizierten eine tendenziell

stärkere IL-10-Sekretion zeigten, unterstützen die Ergebnisse unsere Hypothese, da unter Feldbedingungen die von den Tieren aufgenommene Erregermenge wahrscheinlich geringer ist. Die Inokulationsdosis der experimentell inokulierten Schafe war ebenfalls deutlich geringer als die in der vorliegenden Studie. Außerdem wurde ein mehrfach passagierter Typ-I-Stamm verwendet. Laborstämme rufen eine weniger starke Immunreaktion hervor als Isolate von klinisch erkrankten Tieren (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Typ-I-Stämme bewirken im Vergleich zu Typ-II-Stämmen außerdem eine schwächere IFN- $\gamma$ -Reaktion bei Rindern, Schafen und Ziegen (Steward et al 2004, 2006, 2007), so dass eine weniger starke Hemmung der IL-10-Reaktion erfolgt.

In einem experimentellen Modell an bovinen Neonaten, die dreimal mit  $5,2 \times 10^{10}$  MAP inokuliert worden waren, wurde nach Restimulation von Vollblut mit einem rekombinanten MAP-Protein ab der zweiten Woche *p. i.* eine andauernde IL-10-Sekretion bei gleichzeitiger Induktion von IFN- $\gamma$  nachgewiesen (Nagata et al. 2010, 2005). Dies widerspricht dieser und einer weiteren Studie (Stabel und Robbe-Austerman 2011). Da es sich bei IL-10 um ein antiinflammatorisches Zytokin handelt, ist denkbar, dass es ab einer bestimmten Erregerbelastung verstärkt gebildet wird, um eine überschießende proinflammatorische IFN- $\gamma$ -Reaktion zu vermeiden. Verschiedene Autoren machen IFN- $\gamma$  für die Entstehung von histologischen Läsionen verantwortlich (Robinson et al. 2008; O'Brien et al. 2006). Ob das verwendete Restimulationsantigen eine spezifischere IL-10-Reaktion bewirkt als jPPD, muss untersucht werden.

Die Transkription der IL-10-Gene spiegelt den Verlauf der Proteinsekretion in etwa wider. In der 16. Woche *p. i.* zum Maximum der Proteinsekretion war eine Induktion der entsprechenden Gene festzustellen. In der 28. Woche *p. i.* war dann in beiden früh inokulierten Gruppen das Maximum der Expressionshemmung nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war die Sekretion stark abgefallen (Kapitel 5.1.6.8 und 5.1.7.1.2). In den spät inokulierten Gruppen war dies 16 Wochen *p. i.* feststellbar, auch hier war zu diesem Zeitpunkt die maximale Expressionshemmung der IL-10-Gene messbar.

### 6.2.5.3 Antikörperreaktion

Antikörper wurden im Widerspruch zum postulierten „klassischen“ Modell der Immunreaktion gegenüber MAP in unserem Tiermodell sehr früh induziert (Coussens 2004, Kapitel 2.1.4.4). Die Kinetik der Reaktion glich der der IFN- $\gamma$ -Reaktion. Unterschiede zu den Kontrolltieren waren mit 16 Wochen *p. i.* im Vergleich etwas später nachweisbar. In allen Versuchsgruppen unterlag die Intensität der Antikörperinduktion großen individuellen Schwankungen. Drei Tiere zeigten im Versuchsverlauf keine nachweisbare Antikörperreaktion.

Bei Rindern aus natürlich infizierten Herden wurde mehrfach gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer positiven Antikörperreaktion mit zunehmender Beobachtungsdauer stieg (Eamens et al. 2000; Nielsen und Ersböll 2006; Thomsen et al. 2012; Huda et al. 2004). Auch bei im Alter von wenigen Tagen inokulierten Kälbern



wurde die Serokonversion erst ab dem siebten Lebensmonat nachgewiesen (Yokomizo et al. 1991). Ähnliche Studienergebnisse existieren für natürlich und experimentell infizierte Ziegen (Mercier et al. 2009; Munjal et al. 2005; Lybeck et al. 2011; Sigurðadóttir et al. 1999). Im Gegensatz dazu wiesen Schafe und Wildwiederkäuer eine Serokonversion bereits zwischen sieben und 20 Wochen *p. i.* auf (Gwozdz et al. 2000a; Storset et al. 2001; Robinson et al. 2008; Delgado et al. 2012; O'Brien et al. 2006; Macintosh et al. 2008; Kurade et al. 2004). Bei den dargestellten Unterschieden handelte es sich nicht ausschließlich um einen tierartspezifischen Effekt. Wie für die IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde nachgewiesen, dass die Serokonversion früher erfolgt, wenn eine höhere Inokulationsdosis verwendet wird (Mortier et al. 2014b; O'Brien et al. 2006). Eine parallel einsetzende Antikörper- und IFN- $\gamma$ -Reaktion spiegelte die Immunreaktion nach Impfungen gegen MAP wider (Kathaperumal et al. 2009; Griffin et al. 2009; Corpa et al. 2000; Begg und griffin 2005; Gwozdz et al. 2000a). Die Parallelität beruht auf der schnellen Induktion von IFN- $\gamma$ .

In den entsprechenden Studien an Schafen und Wild wurde unter Verwendung hoher Infektionsdosen eine frühe IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen. Antikörper werden zum einen indirekt über die Aktivierung von B-Zellen über CD40 durch Th-Zellen induziert. Dieser Weg erfordert zunächst eine adäquate T-Zellaktivierung. Zum anderen werden B-Zellen von IFN- $\gamma$  als costimulierender Faktor schneller zur Antigenerkennung und daraus folgend zur Antikörperproduktion angeregt. Die nur leicht verzögert auftretende Antikörperreaktion, die ähnliche Kinetik des Reaktionsverlaufs und die Korrelation zwischen beiden Parametern sprechen in der vorliegenden Untersuchung für diesen Weg. Die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung setzt außerdem Proteine als Antigene voraus. Die Zellwand von MAP besteht jedoch aus vielen Lipiden und Glykolipiden wie z. B. LAM, gegen das Antikörper gebildet werden (Kapitel 2.1.2). Eine T-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung ist auch daher wahrscheinlicher. Bei natürlich infizierten Tieren ist von einer geringeren Infektionsdosis auszugehen und damit von einer weniger starken Induktion der zellulären Immunantwort. So zeigten Kontakttiere, die mit infizierten Ziegen zusammen gehalten wurden, im Gegensatz zu experimentell infizierten keine Serokonversion (Munjal et al. 2005). Bei hoher Herdenprävalenz ist die Wahrscheinlichkeit für starke Ausscheider größer, so dass auch von einzelnen Individuen größere Erregermengen aufgenommen werden und zu früheren Antikörperreaktionen führen. Dies erklärt, warum in einigen Studien an natürlich infizierten Rindern und Ziegen zwar der Großteil der Tiere erst in höherem Alter serokonvertierte, jedoch positive Reaktionen bei jüngeren Tieren auftraten (Mercier et al. 2009). In diesem Zusammenhang müssen falsch-positive Reaktionen durch die ungenügende Sp der ELISA-Systeme berücksichtigt werden (Donat et al. 2014b). So wurde während der gesamten Versuchsdauer bei einem Kontrolltier eine fragliche Reaktion im ELISA nachgewiesen, die als solche zu interpretieren ist (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Grund für eine späte Antikörperproduktion ist möglicherweise ein geringer Anteil Antikörper-produzierender B-Zellen an der Gesamtzahl B-Zellen. Es wird diskutiert, dass B-Zellen nach einer MAP-Infektion nicht nur für die Antikörperproduktion sondern auch für die Antigenpräsentation an CD4<sup>+</sup> und Th2-Zellen verantwortlich sind. Die These stützt sich auf eine Studie, in der der Anteil B-Zellen in PBMC und der Anteil aktivierter B-Zellen an ihrer Gesamtpopulation bei mit einer hohen Dosis infizierten Kälbern zwischen dem dritten und sechsten Lebensmonat auf ein Maximum anstieg und anschließend bis zum Studienende nach zwölf Monaten abfiel. Dies war jedoch nicht mit einer steigenden Antikörperproduktion assoziiert (Stabel et al. 2011). Antikörper-produzierende Zellen und B-Gedächtniszellen stiegen anteilmäßig erst zum Ende der Studie. In einer weiteren Studie hatten die Autoren zeigen können, dass es eine Abhängigkeit der B-Zell-Reaktion vom Erkrankungsstadium gab. Aktivierte B-Zellen produzieren wahrscheinlich weniger Antikörper (Amu et al. 2006). Wie sich der Anteil aktivierter B-Zellen bei Ziegen in fortgeschrittenen Infektionsstadien verändert, ist unbekannt. Ein Absinken dieser zugunsten Antikörper-produzierender Zellen ist denkbar.

Der Abfall der Reaktion zum Versuchsende ist zum einen durch die weniger starke B-Zell-Aktivierung aufgrund der sinkenden IFN- $\gamma$ -Konzentration erklärbar. Aber auch eine geringere Aktivierbarkeit der B-Zellen ist möglich. So wurde bei klinisch erkrankten Rindern gezeigt, dass B-Zellen nach einer spezifischen Restimulation mit MAP-Antigen nicht proliferierten, während eine Reaktion auf ConA möglich war (Stabel et al. 2009).

Die leichte zeitliche Verzögerung der humoralen gegenüber der zellulären Immunantwort erscheint schlüssig. Die Induktion erfolgt zunächst lokal im Gewebe von Darm und Lymphknoten in Form von IgM-Antikörpern. Die zugelassenen Testsysteme erfassen jedoch die später auftretenden IgG-Antikörper. Eine Bindung von Antikörpern an freie MAP im Gewebe und die anschließende Aufnahme durch Makrophagen verhindern außerdem möglicherweise ihren Transport und damit den Nachweis im Blut. Um die Nachweisgrenze der ELISA-Systeme zu überschreiten, müssen genügend Plasmazellen vorhanden sein, die eine ausreichende Menge Antikörper produzieren.

Bei drei Tieren aus unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden trotz verifizierter Infektion keine Antikörper nachgewiesen. Ziege Nummer 13 schied MAP diskontinuierlich im Kot aus. Bei allen drei Tieren war MAP kulturell aus Organproben anzüchtbar. Es traten mindestens geringgradige histologische Veränderungen in Darm und Lymphknoten des Darms auf. Ob der Erregerdruck zu gering war, um eine nachweisbare Antikörperreaktion im Blut hervorzurufen und die humorale Immunantwort bei diesen Tieren nur auf lokaler Ebene stattfand, bleibt offen. Da die Ausscheidung bei den drei Ziegen nur kurz oder diskontinuierlich erfolgte, kann von einer geringen Erregerfreisetzung in das umliegende Gewebe ausgegangen werden. Wenn wenig freie Bakterien im Gewebe vorhanden sind, findet nur eine geringgradige

B-Zell-Stimulation statt. Es wird auch diskutiert, ob erbliche Faktoren die Fähigkeit zur Antikörperproduktion beeinflussen (Korou et al. 2010). Eine signifikante Heritabilität für die Bildung von Antikörpern wurde nachgewiesen (Mortensen et al. 2004). Die hier stets negativ getesteten Ziegen stammten nicht vom selben Vatertier ab, was gegen eine Resistenz spricht. Sie kann jedoch ebenso wenig ausgeschlossen werden wie die Möglichkeit einer späteren Serokonversion mit fortschreitender Krankheitsdauer.

#### 6.2.5.4 Ausscheidung von MAP mit dem Kot

Die Ausscheidung von MAP war bei den inokulierten Ziegen individuell sehr verschieden. Innerhalb der ersten vier Wochen nach Inokulationsbeginn erfolgte sie passiv. Ihre Intensität war in diesem Zeitraum am stärksten. Die Empfehlungen für Tiermodelle gehen davon aus, dass eine aktive Ausscheidung erst nach den ersten 14 Tagen nach Abschluss der Inokulation beginnt (Hines et al. 2007a). Dies deckt sich in etwa mit den Ergebnissen unserer Studie. Die passive Ausscheidung war einschließlich der vierten Woche nach Inokulationsbeginn nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war die Inokulation eine Woche abgeschlossen. Auch andere Studien an Schafen und Rindern berichten von passiver Ausscheidung innerhalb von drei bis sieben Tagen *p. i.* (Wu et al. 2007; Reddacliff und Whittington 2003). Juste et al. (1994) detektierten während eines 220 Tage dauernden Versuchs lediglich innerhalb der ersten zehn Tage *p. i.* MAP im Kot von Schafen, die im Alter von einem Monat mit  $1,3 \times 10^6$  MAP inokuliert worden waren. Es ist ebenfalls von einer passiven Ausscheidung auszugehen. Die Ausscheidung von MAP mit dem Kot wäre auch als Folge einer aktiven Infektion mit dem Bakterium möglich. MAP infiziert bereits wenige Stunden *p. i.* Makrophagen und hat zu diesem Zeitpunkt die Darmbarriere bereits überwunden. Ein sicherer Infektionsnachweis über die kulturelle Anzucht von MAP aus Gewebeproben der infizierten Tiere erfolgte nicht und ist in diesen Infektionsstadien nur schwer möglich. So wird der Erregernachweis im Kot als passiv interpretiert. Aufgrund der langen Generationszeit des Erregers ist davon auszugehen, dass in den ersten Tagen *p. i.* keine massive Vermehrung stattfindet. Daher ist es unwahrscheinlich, dass MAP in dieser kurzen Zeit in großen Mengen wieder in den Darm gelangt. Dagegen sprechen auch die in dieser Untersuchung nachgewiesene hohe Ausscheidungsintensität und ihr Absinken zum gleichen BZP nach der Inokulation. Dass einige Tiere der spät inokulierten Gruppen mehr MAP ausschieden als Ziegen der früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis), ist durch eine längere Verweildauer im bereits weiter entwickelten Pansen der älteren Tiere und einen langsameren Weitertransport im bereits längeren Darm erklärbar. Eine parallele passive und aktive Ausscheidung durch die beginnende Infektionsetablierung sind ebenfalls möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine große Menge der eingegebenen Erreger die Darmwand nicht überwindet. Möglicherweise sind bei anhaltender Peristaltik für MAP im Darminhalt die Kontaktdauer in den M-Zell-haltigen Bereichen der Darmwand nicht lang genug oder die Aufnahmekapazität der Zellen erschöpft. Die bereits in der achten

Woche *p. i.* beginnende aktive Ausscheidung bestätigt außerdem, dass nach der Erregeraufnahme eine schnelle Infektionsetablierung erfolgt, so dass in diesem Stadium nicht von einer protektiven Immunantwort des Wirtstieres auszugehen ist. Eine Ausnahme bildeten die Tiere Nummer 16 und 39, bei denen ein Erregernachweis ab spätestens der zwölften Woche *p. i.* nicht mehr gelang. Ob die Infektion überwunden oder nur kontrolliert wurde, bleibt offen.

In der überwiegenden Anzahl von Modellstudien wurde eine Ausscheidung deutlich später festgestellt (Begg et al. 2005; Waters et al. 2003; Storset et al. 2001; Kurade et al. 2004; Munjal et al. 2005). Auch in von Paratuberkulose betroffenen, kommerziellen Ziegen- und Rinderherden schied ein Großteil der Tiere MAP nicht vor dem neunten bzw. elften Lebensmonat aus (Lybeck et al. 2011; Kalis et al. 1999; Huda et al. 2003). Vereinzelt ließ sich MAP jedoch auch wenige Wochen *p. i.* im Kot von natürlich und experimentell infizierten Rindern, Schafen und Ziegen nachweisen (Steward et al. 2004; Mc Donald et al. 1999; Hines et al. 2007b). Natürlich infizierte Ziegen schieden MAP auch im Alter unter einem Jahr aus (Mercier et al. 2009).

Die Intensität und der Zeitpunkt erster MAP-Nachweise im Kot werden u. a. durch die Art des Inokulats bestimmt. Wurde den Tieren infiziertes Gewebe statt einer bakteriellen Reinkultur verabreicht, war die Ausscheidung früher nachweisbar (Steward et al. 2007). Experimentell mit Darmschleimhaut infizierte Kälber waren ab einem Alter zwischen einem und 24 Monaten positiv in der Kotkultur, aber nur eines dieser Tiere war unter sechs Monaten alt (Mc Donald et al. 1999). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind darauf zurück zu führen, dass die Erregermenge in der Darmschleimhaut nicht standardisiert und die Lebensfähigkeit von MAP unbekannt sind. Die Studie von Steward et al. (2004) bildet eine Ausnahme, da hier retrospektiv die Keimzahl mittels Kultur des eingesetzten Gewebes bestimmt wurde. Im Gegensatz zu klinischen Isolaten scheinen mehrfach passagierte Laborstämme zu einer späteren Ausscheidung zu führen. Die frühe Ausscheidung der inokulierten Thüringer Wald Ziegen ist z. T. auf den Einsatz des bovinen, wenig passagierten Isolats zurückzuführen. Ob bovine Isolate bei der Ziege zu einer früheren Ausscheidung führen als caprine kann diskutiert werden. Mehrere Studien zeigten, dass die Ausscheidung nicht zu einem frühen Zeitpunkt einsetzte, wenn Isolate der Tierart verwendet wurden, die als Modelltier diente (Begg et al. 2005; Kurade et al. 2004; Delgado et al. 2012; Storset et al. 2001; Munjal et al. 2005). Möglicherweise ist das Immunsystem an solche Isolate besser angepasst. Die Art des Stammes hat im Gegensatz zur IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion keinen Einfluss auf die Ausscheidung. Zwar zeigten Steward et al. (2007), dass Ziegen und Rinder, die mit einem ovinen Stamm inokuliert wurden - verglichen mit Tieren die ein bovines Isolat erhalten hatten - MAP später oder gar nicht ausschieden, die Tiere, die mit dem ovinen Stamm inokuliert wurden, waren jedoch vier Monate älter und wurden früher euthanasiert, so dass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Ein Einfluss des Inokulationsalters ist zu vermuten. Die Ausscheidung trat im Gegensatz zu adulten Tieren bei Lämmern früher auf (Delgado et al. 2012). Mit einer Dosis von  $6,0 \times 10^9$  MAP eines caprinen Isolats infizierte Ziegen schieden den Erreger bereits ab der achten Woche *p. i.* aus, was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Wie in der vorliegenden Studie waren die Tiere zu Beginn der Inokulation zwischen einer und vier Wochen alt (Hines et al. 2007b). In den meisten übrigen caprinen Modellstudien fand die Inokulation dagegen erst ab der fünften Lebenswoche statt (Storset et al. 2001; Munjal et al. 2009; Kurade et al. 2004). Dabei hatte die Häufigkeit der Inokulation im Studienvergleich keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des Auftretens der Ausscheidung von MAP. In einer weiteren ovinen Untersuchung wurden die Tiere zwar bereits im Alter von vier Wochen inokuliert, die Ausscheidung war aber nur bei wenigen Tieren zum Versuchsende nach 220 Tagen nachweisbar (Delgado et al. 2012). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde eine deutlich geringere Inokulationsdosis verwendet. Eine positive Abhängigkeit des Zeitpunktes, zu dem MAP erstmals aus dem Kot anzüchtbar ist, von der Inokulationsdosis wurde in experimentellen Modellstudien nachgewiesen (Delgado et al. 2012). Die hohe Inokulationsdosis, die in unserer Studie verwendet wurde, kann ebenfalls für die frühe aktive Ausscheidung von MAP mit dem Kot ab der achten Woche *p. i.* verantwortlich gemacht werden. In kommerziellen Herden zeigt sich dies indirekt durch die Abhängigkeit von der Herdenprävalenz. Der höhere Infektionsdruck führte zu einer früheren Ausscheidung von MAP (Weber et al. 2010). Es ist denkbar, dass daraus folgend auch eine höhere Ausscheidungsintensität auftritt, die zum Überschreiten der minimalen Nachweisgrenze der Kulturmethode führt. Die Ausscheidungsrate hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Nachweisfähigkeit des Erregers (Kalis et al. 1999).

Innerhalb der Gruppen unterschied sich die Ausscheidungsintensität im gesamten Beobachtungszeitraum aber von Tier zu Tier. In der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) und den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) war dies insbesondere in der ersten Versuchshälfte durch große Spannweiten sichtbar. Anschließend sank die mittlere Ausscheidung. Besonders gering war der Anteil ausscheidender Tiere in der Gruppe V3 (spät, geringe Dosis). Die frühe Inokulation mit der geringeren Dosis (Gruppe V1) bewirkte, dass die Ziegen in der ersten Versuchshälfte mehr MAP ausschieden als in der zweiten, wo die Schwankungsbreite besonders groß war. Diese ist darauf zurückzuführen, dass einige Tiere den Erreger nicht, andere aber in großen Mengen ausschieden. Die Schwankungen in der ersten Versuchshälfte in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) und den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) deuten auf Unterschiede in der Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit MAP hin, die später eine geringere Freisetzung von MAP im Kot bewirkten. Unabhängig von der Versuchsgruppe trat die maximale Ausscheidungsintensität in der Mitte des Versuchszeitraumes auf. Dies widerspricht einer Vielzahl anderer Studien, in denen die Ausscheidung später einsetzte (siehe oben) bzw. bei frühem Beginn kontinuierlich zunahm (Hines et al. 2007b).

Es wurden drei Ausscheidungsprofile nachgewiesen:

1. Eine kontinuierliche Ausscheidung. Dies betraf Lämmer, bei denen MAP zu allen untersuchten BZP im Kot nachweisbar war und wurde insbesondere nach einer frühen Inokulation mit der niedrigeren Dosis (Gruppe V1) nachgewiesen. Dagegen schieden Tiere, die mit der geringeren Dosis nach 42 LT inokuliert worden waren, den Erreger in keinem Fall kontinuierlich aus (Gruppe V3).
2. Eine intermittierende Ausscheidung, die häufig in der Gruppe V4 (spät, hohe Dosis) auftrat.
3. Eine sistierende Ausscheidung. Dieses Profil wurde u. a. bei den Tieren beobachtet, die den Versuch vorzeitig verließen. Auffällig war bei Ziegen mit diesem Ausscheidungsprofil, dass MAP lediglich in der ersten Versuchshälfte im Kot nachweisbar war.

Die intermittierende Ausscheidung wurde bei Schafen, Ziegen und Rindern nachgewiesen (Munjal et al. 2007; Waters et al. 2003; Storset et al. 2001; Kurade et al. 2004). Steward et al. (2004) wiesen ebenfalls eine intermittierende, eine sistierende und eine kontinuierliche Ausscheidung von MAP im Kot einzelner Schafe nach. Eine Ausscheidung setzt voraus, dass der Erreger im Darm frei vorliegt. Da sich unterschiedliche Stadien der Paratuberkulose parallel entlang des Darmes entwickeln, kann eine Freisetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen und daher eine intermittierende Ausscheidung bewirken. Durch die untere analytische Nachweisgrenze der Kotkultur ist es in Einzelfällen trotz negativer Befunde möglich, dass eine schwache Ausscheidung erfolgte.

#### **6.2.6 Zusammenhänge zwischen Parametern der Immunantwort, der Ausscheidung von MAP mit dem Kot und pathohistologischen Veränderungen im Darmgewebe und in den intestinalen Lymphknoten**

Die frühe Antikörperproduktion und MAP-Ausscheidung mit dem Kot stimmten nicht mit dem in der Literatur postulierten „klassischen“ Modell über den Ablauf der Immunreaktion gegenüber MAP überein (Kapitel 2.1.4.4, Abb. 2.1). Nach diesem Modell reagieren infizierte Tiere in frühen Infektionsphasen zunächst mit einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Reaktion, die im Laufe der Erkrankung sinkt und so den Übergang zu späteren Infektionsstadien bewirkt. Dies geht mit dem Beginn der Antikörperproduktion und dem Beginn der Erregerausscheidung einher (Kapitel 2.1.4.4, Abb. 2.1). Zwar war in unserer Studie eine frühe IFN- $\gamma$ -Reaktion nachweisbar, die gleichzeitig auftretende Antikörperproduktion und Erregerausscheidung widersprechen dem theoretischen „klassischen Modell“ jedoch.

Ergebnisse einiger Verlaufsstudien und eine Untersuchung zum Sektionszeitpunkt (Shu et al. 2011) widersprachen dem „klassischen“ Modell ebenfalls (de Silva et al. 2011; Begg et al. 2012; Steward et al. 2006). So waren hohe IFN- $\gamma$ -Reaktionen auch

vereinzelt bei klinisch erkrankten Tieren nachweisbar (Steward et al. 2006). Eine Erregerausscheidung früher oder zeitgleich zu einer Antikörperbildung (Steward et al. 2006) oder einer IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde auch in weiteren Untersuchungen nachgewiesen (Steward et al. 2004, 2006; Lybeck et al. 2011). Robinson et al. (2008) detektierten im Rahmen einer Verlaufsstudie über 60 Wochen bei Wild ebenfalls gleichzeitig Antikörper und IFN- $\gamma$ . Ein fast gleichzeitiges Eintreten von IFN- $\gamma$ - und Antikörpersekretion wurde in einer weiteren Verlaufsstudie bestätigt, wobei adulte Schafe später begannen Antikörper zu sekretieren als Lämmer (Delgado et al. 2012). Nicht immer ging eine Erregerausscheidung mit einer Antikörperreaktion und einer niedrigen IFN- $\gamma$ -Reaktion einher (Storset et al. 2001; Lybeck et al. 2009; Begg et al. 2005). Auch gleichzeitig hohe IFN- $\gamma$ - und IL-10-Konzentrationen oder ein im Vergleich zur IFN- $\gamma$ -Reaktion früherer Nachweis von IL-10 wurden beschrieben (de Silva et al. 2011; Nagata et al. 2010) und deuten auf eine sich parallel entwickelnde Th1- und Th2-Antwort hin (de Silva et al. 2011).

Begg et al. (2011) betrachteten infizierte und nicht infizierte Schafe über einen Zeitraum von 19 Monaten. Im Gruppenmittel wiesen sie nach vier Monaten Antikörper und IFN- $\gamma$  nach. Wurden die Tests nur qualitativ betrachtet, wie es in den meisten Studien erfolgt, waren zu Beginn des Versuches jedoch deutlich weniger Tiere Antikörper-positiv als IFN- $\gamma$ -positiv. So entstand eine zeitliche Verzögerung im Eintreten der Antikörperreaktion. Entsprechend der „klassischen“ Theorie sank die IFN- $\gamma$ -Reaktion im Gruppenmittel nach 19 Monaten ab, während die Antikörperreaktion weiter anstieg. Bei der Betrachtung der einzelnen Tiere wiesen die Autoren dagegen drei verschiedene Reaktionsprofile nach (Abb. 6.1). Zum einen traten die Antikörper- und IFN- $\gamma$ -Reaktion bei 50 % der Tiere parallel auf. Bei einigen Tieren setzte die Antikörpersekretion zwar etwas später ein, war jedoch nicht mit einem Absinken der IFN- $\gamma$ -Reaktion verbunden. Das „klassische“ Modell wurde bei 39 % der Schafe gefunden, 11 % der Tiere wiesen nur eine IFN- $\gamma$ -Reaktion auf. Die hier beschriebenen individuellen Reaktionsprofile spiegeln sich auch in unseren Daten wider.

Das im Schrifttum postulierte „klassische“ Modell kann vor diesem Hintergrund so nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Ergebnisse der zitierten Studien zeigen, dass es nur für einen Teil der untersuchten Tiere zutrifft. Nur wenn diese in der Testpopulation die Mehrheit bilden, wird im Mittel das „klassische“ Modell nachgewiesen. Weiterhin kann aus unseren und den Daten von Begg et al (2011) abgeleitet werden, dass sich die Immunreaktion gegenüber MAP individuell unterscheidet. Dies trifft auch auf natürlich infizierte Ziegen zu. Lybeck et al. (2011) wiesen sehr unterschiedliche Reaktionen nach, als sie die Zeitpunkte des Auftretens der IFN- $\gamma$ -, der Antikörperreaktion und der MAP-Ausscheidung verglichen. Die Faktoren, die zu diesen Unterschieden beitragen, wurden diskutiert. Eine Abhängigkeit zur Schwere der Läsionen schien jedoch gegeben. Tiere ohne Antikörperreaktion wiesen einen sehr geringen Läsionsgrad auf, während sich der Anteil der Tiere mit schweren Veränderungen ohne lymphozytäre Infiltration zwischen den anderen beiden Profilen nicht unterschied (Begg et al. 2011).

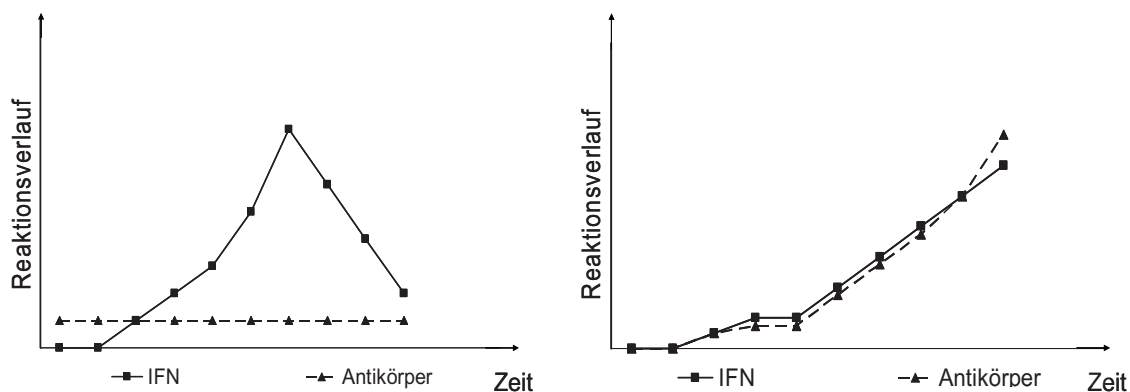


Abb. 6.1 Individuelle Reaktionsprofile der IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion im Infektionsverlauf der Paratuberkulose (modifiziert nach Begg et al., 2011): IFN- $\gamma$ -Reaktion ohne Antikörperbildung (links), parallel auftretende IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion (rechts.) Nicht dargestellt ist das „klassische“ Modell.

Es bestanden auch in unserer Studie deutliche Zusammenhänge zwischen Immunreaktion, Ausscheidung und der Schwere der Gewebeläsionen in Darm und den intestinalen Lymphknoten.

Mit zunehmender Schwere der Läsionen und der Häufigkeit des immunhistochemischen Mykobakteriennachweises in den Geweben nahm auch die Ausscheidung zu. Dies war unabhängig davon, ob Darmgewebe oder Lymphknoten untersucht worden waren. Im Lymphknoten unterschieden sich Tiere ohne oder mit wenigen Mykobakterien im Gewebe tendenziell nur in der ersten Versuchshälfte, wobei mit zunehmender Anzahl an Mykobakterien die Ausscheidung stieg. Anschließend sank sie, beide Gruppen unterschieden sich nicht mehr. Das Tier, das viele Mykobakterien in den Lymphknoten aufwies, schied stets mehr MAP aus als die Tiere mit den Scores 0 und 1. Dass die Ausscheidung positiv mit dem Läsionsgrad korreliert ist, wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt (Kurade et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit der Ausscheidung stieg mit zunehmender Inokulationsdosis (Mc Donald et al. 1999). Je höher diese war, desto höher war auch die Anzahl von MAP im Gewebe (Reddacliff und Whittington 2003). Daher ist durch die hier verwendete hohe Inokulationsdosis von einer starken Besiedlung des Gewebes auszugehen. Zwar war dies immunhistochemisch nur bei einem geringen Anteil der Versuchstiere nachweisbar, die Anzüchtung der Erreger aus dem Gewebe gelang jedoch bei 20 von 27 Ziegen. Die hohe Inokulationsdosis führt nicht nur zu einer starken Besiedlung des Gewebes, sie ist auch für die Ausbildung histologischer Läsionen verantwortlich (Delgado et al. 2012). Makroskopische Veränderungen entstehen erst mit zunehmender Schwere histologischer Läsionen. So zeigten Brady et al. (2008), dass nur die später im Infektionsverlauf entstehenden lepromatösen Läsionen (Kurade et al. 2004) zu makroskopischen Veränderungen führten. Da MAP auch bei Ziegenlämmern ohne



makroskopische Läsionen im Darm verbreitet war, ist davon auszugehen, dass körpereigene Faktoren zu ihrer Entstehung beitragen. So korrelierte das Vorhandensein makroskopischer Läsionen mit einem zunehmenden Entzündungsgrad (Dennis et al. 2008). Auch die Wahrscheinlichkeit für eine Ausscheidung von MAP mit dem Kot hing vom Grad der Entzündungsreaktion ab (Dennis et al. 2008). Entzündungen sind immer mit Gewebeschäden verbunden, so dass durch das zunehmend zugrunde gehende Darmgewebe mehr MAP freigesetzt und ausgeschieden wird. Durch die Ausbreitung der Läsionen im Darm treten vermutlich Resorptionsstörungen auf, durch die Immunreaktion ist außerdem von einem erhöhten Bedarf des Körpers an Protein auszugehen. Eine Hypoproteinämie bei infizierten Tieren wurde nachgewiesen (Donat et al. 2014c; Brady et al. 2008). Nicht resorbiertes Protein wirkt im Darm hygroskopisch und kann so zur Entstehung von Durchfall beitragen. Aufgrund der nur vereinzelt aufgetretenen klinischen Symptome kann in unserer Studie nicht bestätigt werden, dass die Ausbreitung der makroskopischen Läsionen in den Dickdarm zur Ausprägung klinischer Symptome führt (Brady et al. 2008).

Eine Bindung von MAP an Antikörper im Sinne einer Opsonisierung förderte zusammen mit Komplementfaktoren die Phagozytose von MAP - allerdings auch sein Überleben im Makrophagen (Hostetter et al. 2005). Zusammen mit den oben genannten Zusammenhängen erklärt sich die schwache positive Korrelation zwischen Ausscheidung und Antikörperkonzentration. Auch andere Studien wiesen bei natürlich infizierten Rindern und experimentell inokulierten Kälbern, Schafen und Ziegen eine Abhängigkeit der Antikörperreaktion von der Ausscheidungsstärke nach (Yokomizo et al. 1991; Lybeck et al. 2011; Steward et al. 2007; Sweeney et al. 2006b).

In der zweiten Versuchshälfte zeigten Tiere mit schweren histologischen Läsionen in Lymphknoten oder Darmgewebe höhere Antikörperkonzentrationen im Blut. Es bestand ebenfalls eine positive Abhängigkeit zwischen der Menge der nachgewiesenen Mykobakterien im jeweiligen Gewebe und der Antikörperreaktion. Wurde die Stärke der Läsionen im Darm betrachtet, war dieser Zusammenhang allerdings nur tendenziell und insbesondere in der zweiten Versuchshälfte nachweisbar. Es wurde ebenfalls mehrfach nachgewiesen, dass das Vorhandensein von Läsionen die Wahrscheinlichkeit einer positiven Antikörperreaktion erhöht (Pérez et al. 1997; Brady et al. 2008) und mit zunehmender Läsionsschwere auch die Antikörperkonzentration zunimmt (O'Brien et al. 2006; Begg et al. 2011; Shu et al. 2011; Kurade et al. 2004). Ziegen, bei denen mittels Immunhistochemie keine Mykobakterien im Darm nachweisbar waren, zeigten innerhalb der Gruppe eine größere Schwankungsbreite der Antikörperreaktion. In dieser Gruppe befanden sich auch die Tiere, die zu keinem Zeitpunkt Antikörper bildeten. Die Bildung von Antikörpern setzt den Antigenkontakt mit dem Immunsystem des Wirts voraus. Je mehr MAP vorhanden sind, desto häufiger kann die Antigenpräsentation erfolgen, was zu einer kontinuierlichen Antikörperbildung führt. Das bestätigt jedoch auch, dass eine starke Antikörperreaktion nicht zu einer Neutralisierung von MAP führt. Antikörper wirken bei einer MAP-Infektion nicht protektiv. Es findet zwar eine

physiologische Bindung an die Erreger und eine Opsonisierung statt, was zu einer verstärkten Phagozytose durch Makrophagen führt, die verstärkte Abtötung von MAP bleibt jedoch aus. Aufgrund der hier gezeigten Abhängigkeit der Antikörperreaktion von der Anzahl immunhistologisch nachgewiesener Mykobakterien wird die Hypothese, dass eine Opsonisierung die Vermehrung von MAP fördert, unterstützt. Einen entscheidenden negativen Einfluss auf das Überleben von MAP hat der Aktivierungsstatus des Makrophagen, wobei Komplementfaktoren die intrazelluläre Abtötung von MAP hemmen, während Antikörper allein *in vitro* eine bessere Zerstörung von MAP im Makrophagen bewirkten (Hostetter et al. 2005). Die Paratuberkulose ist eine Infektion des angeborenen Teils des Immunsystems. Der spezifische Teil reagiert mit der Ausbildung einer humoralen und zellulären Antwort physiologisch auf den Erregerkontakt. MAP nutzt natürliche Schutzmechanismen des angeborenen Immunsystems aus, das nicht mehr physiologisch auf die Signale des adaptiven Teils reagiert. Dementsprechend ist in unserer Studie eine unzureichende Aktivierung der caprinen Makrophagen erfolgt.

Dass sich die Antikörperreaktion zwischen den Gruppen S0 bis S2 erst in der zweiten Versuchshälfte eindeutig unterschied, bestätigt Daten von Wildwiederkäuern (Robinson et al. 2008). Tiere, die nur milde Läsionen aufwiesen, zeigten ab 16 Wochen *p. i.* eine schwächere Antikörperreaktion, während sie sich vorher nicht unterschieden. Als Ursache kann bei wiederholter Stimulation von B-Zellen durch MAP-Antigene im Verlauf der chronischen Infektion eine somatische Hypermutation von B-Zellen angenommen werden. In der Folge teilen sie sich schneller und produzieren eher Antikörper. Diese Vorgänge sind T-Zell-abhängig. Es ist denkbar, dass es zu einem Übergang von einer T-Zell-unabhängigen Antikörperreaktion in der ersten Versuchshälfte zu einer T-Zell-abhängigen in der zweiten Versuchshälfte kam. Die mittlere Antikörperkonzentration sank mit zunehmender Versuchsdauer in allen Gruppen parallel zur sinkenden IFN- $\gamma$ -Reaktion. Weiterhin ist zu beachten, dass die Immunantwort zunimmt, je mehr Stellen des Darmes betroffen sind. Die Antikörperreaktion war schwächer, wenn der Entzündungsgrad im Darmgewebe zunahm (Dennis et al. 2008).

Es bestand eine signifikante moderate Rangkorrelation zwischen IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion, die, wie bereits diskutiert, auf die IFN- $\gamma$ -bedingte Antikörperinduktion zurückzuführen war. Da die Schwankungsbreite der Antikörperreaktion innerhalb der untersuchten Population sehr groß war, ist keine lineare Beziehung zwischen beiden Parametern zu erwarten. Zwischen den Antikörpern und der IL-10-Reaktion bestand dagegen eine schwache negative Korrelation. IL-10 bewirkt indirekt über die T-Zell-bedingte Aktivierung von B-Zellen eine Antikörperbildung. Da letztere hier aber möglicherweise IFN- $\gamma$ -abhängig erfolgte, ist keine positive Korrelation zu erwarten. Die Hypothese der IFN- $\gamma$ -induzierten Antikörperproduktion wird dadurch unterstützt, dass die Korrelation mit IL-10 schwach negativ ist, denn IFN- $\gamma$  hemmt die Sekretion von IL-10. Die positive Korrelation

zwischen IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion bei Ziegen wurde von Lybeck et al. (2011) bestätigt. Bei zeitgleichem Auftreten und ähnlicher Kinetik beider Reaktionen unterschieden sich die Gewebeläsionen von Schafen nicht in ihrem Schweregrad. Trat aber ausschließlich eine IFN- $\gamma$ -Reaktion auf, waren nur milde Läsionen im Darmgewebe nachweisbar (Begg et al. 2011). In der vorliegenden Studie wiesen Lämmer ohne Läsionen im Lymphknoten zu Versuchsbeginn eine starke IFN- $\gamma$ -Reaktion auf, die mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich sank. Damit bestätigen wir die Erkenntnisse von Begg et al. (2011). Auch Pérez et al. (1999) wiesen eine positive IFN- $\gamma$ -Reaktion bei Tieren ohne Läsionen in Darm und Lymphknoten nach, interpretierten dies aber als Ergebnis einer für das Auffinden der Läsionen nicht ausreichenden Probenentnahme. Bei asymptomatischen Tieren ohne Gewebeläsionen war die IFN- $\gamma$ -Reaktion geringer als bei Tieren mit pauzibazillären Veränderungen. Die Befunde aus Lymphknoten und Darm wurden zusammengefasst, so dass nicht zwischen den Geweben differenziert werden kann (Gillan et al. 2010). Aufgrund dieser Erkenntnisse muss geschlossen werden, dass Tiere, die MAP effektiv eliminieren können, zum Beginn der Infektion eine starke, im weiteren Verlauf aber keine oder nur eine schwache IFN- $\gamma$ -Reaktion ausbilden. Unter der Annahme, dass Komponenten des angeborenen Immunsystems einige wenige MAP ohne Beteiligung des erworbenen Abwehrsystems abtöten können, wenn genügend Makrophagen aktiviert sind, würde eine anhaltende IFN- $\gamma$ -Reaktion bedeuten, dass eine aktive Infektion vorhanden ist. Die Konsequenzen für die Diagnostik werden an anderer Stelle erläutert (Kapitel 6.3.1).

Bei Tier Nummer 39 wurden weder Läsionen noch Erreger nachgewiesen. Eine Ausscheidung von MAP mit dem Kot erfolgte nur bis zur 16. Woche *p. i.* Bei der hohen Inokulationsfrequenz und der hohen Anzahl MAP in der Inokulationsdosis erscheint es unwahrscheinlich, dass der Erreger die Darmwand nicht überwunden hatte. Die wiederholte Detektion von Antikörpern spricht dagegen, denn Antikörper zeigen den Kontakt des Immunsystems mit MAP an, jedoch nicht immer eine aktive Infektion. Wahrscheinlich wurde der Erreger eliminiert, entweder ohne dass es zu einer Infektionsetablierung kam oder indem die Tilgung einer vorhandenen Infektion erfolgte. Für eine Infektionsüberwindung sprechen die Befunde der Tiere acht, zehn und 20. Läsionen in den Lymphknoten und die lange Ausscheidung von MAP mit dem Kot lassen auf eine Erregervermehrung im Organismus schließen. Ob Läsionen im Darm, die zum Sektionszeitpunkt nicht vorhanden waren, zuvor ausheilten, lässt sich rückblickend nicht sagen.

MAP scheint in den Lymphknoten besser überleben zu können als im Darmgewebe. Darauf lassen die Befunde von den Ziegen Nummer 30, 32 und 37 schließen. Während aus dem Darmgewebe keine Erreger anzüchtbar waren, gelang dies aus den Lymphknoten. Bei allen drei Tieren traten dort auch Läsionen auf, während nur eines geringgradige Veränderungen am Darm zeigte. Es muss berücksichtigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von MAP in kleinen Lymphknoten deutlich größer ist, als in der großen Schleimhautoberfläche des Darmes. Die Überwindung der

Infektion wurde in Studien mit ähnlichen Befunden häufig diskutiert (Steward et al. 2007; Huda et al. 2003; Gwodzd und Thompson 2002; Mc Donald et al. 1999; Storset et al. 2001; Mikkelsen et al. 2009). In keiner der Untersuchungen ist auszuschließen, dass der Erreger übersehen wurde. Hinzu kommt, dass die Paratuberkulose eine sehr lange Inkubationszeit hat (Kapitel 2.1.6.1) und in experimentellen Modellen nur ein begrenzter Beobachtungszeitraum zur Verfügung steht. Das Schicksal der Tiere über diesen Zeitraum hinaus ist unbekannt. Eine Überwindung der Infektion kann also nicht ausgeschlossen werden, basierend auf den derzeitigen Erkenntnissen ist das Übersehen einer Infektion aber ebenso wahrscheinlich (Mc Donald et al. 1999; Pérez et al. 1999).

Die IFN- $\gamma$ -Reaktion unterschied sich nicht im Verlauf zwischen den Gruppen mit unterschiedlich schweren Veränderungen des Darmgewebes; die Intensität bei Tieren mit schwereren Läsionen war in der zweiten Versuchshälfte tendenziell höher als bei Ziegen ohne oder mit geringen Veränderungen des Darmgewebes. Der Verlauf der IFN- $\gamma$ -Reaktion im Lymphknoten spiegelte bei Tieren mit Läsionen des Scores 1 und 2 den der Reaktion im Darm wider. Ein entsprechender Trend war auch vorhanden, wenn man die Anzahl immunhistochemisch nachgewiesener Mykobakterien zu Grunde legte. Bei Wild konnte eine gute Korrelation zwischen der Stärke der pathologischen Läsionen und der IFN- $\gamma$ -Reaktion nachgewiesen werden (O'Brien et al. 2006). Dabei ist der Gehalt an Mykobakterien entscheidend. Tiere mit multibazillären Läsionen wiesen eine geringere IFN- $\gamma$ -Reaktion auf als solche mit pauzibazillären Veränderungen (Gillan et al. 2010; Burrels et al. 1998; Kurade et al. 2004; Muñoz et al. 2009; Tanaka et al. 2005; Pérez et al. 1999). Wurden nur pauzibazilläre Läsionen unterschiedlichen Schweregrades betrachtet, unterschied sich die IFN- $\gamma$ -Reaktion von Rotwild nicht (Robinson et al. 2008). Da die Graduierung in unserer Studie jeweils pauzi- und multibazilläre Läsionen beinhaltet und sich eher an der Läsionsschwere orientiert (Kapitel 10.1.4, Tab. 10.14), waren die Unterschiede nicht eindeutig feststellbar. IFN- $\gamma$  ist ein die Ausbildung einer granulomatösen Entzündung förderndes Zytokin. Durch Einwanderung von Immunzellen schwillt der Darm an. Im Gegensatz zur Tuberkulose werden jedoch keine echten Granulome gebildet, die neutrophile Granulozyten beinhalten. Deren Einwanderung wird durch TNF $\alpha$  gefördert, das v. a. durch Makrophagen gebildet wird. Da im Zusammenhang mit Paratuberkulose v. a. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, nicht aber B-Zellen und Makrophagen aktiviert wurden (Jungersen et al. 2002), wird, wie in dieser Untersuchung gezeigt, TNF $\alpha$  in seiner Expression gehemmt. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere ohne Läsionen eine stärkere Expression von TNF $\alpha$  besaßen als Schafe mit Läsionen (Smeed et al. 2007).

Die These, dass die zelluläre Immunreaktion abhängig von der Menge aufgenommener bzw. im Gewebe vorhandener MAP ist, wird bestätigt, wenn man die IFN- $\gamma$ -Reaktion und die MAP-Ausscheidung betrachtet. IFN- $\gamma$  folgte im Verlauf zeitlich der MAP-Ausscheidung. Der Höhepunkt der Ausscheidung war in allen Gruppen 16 bis 20 Wochen *p. i.* nachvollziehbar, die maximale IFN- $\gamma$ -Reaktion in den Wochen 24 und 28 *p. i.* Stieg der Anteil ausscheidender Tiere am Ende des Versuchs (besonders in den

Gruppen V1 und V2, frühe Inokulation), wurde auch ein Anstieg der mittleren IFN- $\gamma$ -Reaktion nachgewiesen. Der starke Antigenstimulus durch MAP induziert eine schnelle und starke IFN- $\gamma$ -Reaktion, die die Vermehrung von MAP eindämmt. Das folgende Absinken der mittleren Zytokinkonzentration durch den verminderten Antigenkontakt verschlechtert die Kontrolle der Infektion, so dass MAP sich stärker vermehren kann und ausgeschieden wird. Die zelluläre Immunantwort reagiert also zeitlich versetzt auf die Erregerbelastung, wodurch die fehlende Korrelation zwischen IFN- $\gamma$ -Reaktion und Ausscheidung bedingt ist, die von anderen Autoren bestätigt wird (Lybeck et al 2011; Antognoli et al. 2007). Sie ist weiterhin auf die große Schwankungsbreite der IFN- $\gamma$ -Reaktion innerhalb der Gruppen zurückzuführen.

Das Sinken der IFN- $\gamma$ -Reaktion mit dem Fortschreiten der Infektion wird in mehreren Studien beschrieben (Steward et al. 2006; Uda et al. 2003; Gwozdz et al. 2000a; Khalifeh und Stabel 2004; Sweeney et al. 1998). Die Erschöpfung der Zellen oder die zunehmende Zerstörung der Lymphknoten und ein damit veränderter Zell-Zellkontakt können Gründe sein. Konzentrierte Zellen bildeten weit mehr IFN- $\gamma$  als nicht aufkonzentrierte, Zell-Zellinteraktionen spielten eine wichtige Rolle (Bosward et al. 2010). MAP-ausscheidende Tiere mit klinischen Symptomen wiesen teils jedoch weiter eine positive Zytokinreaktion auf (Huda et al. 2003; Lybeck et al. 2011; Steward et al. 2004; Gwozdz und Thompson 2002). Eine steigende Expression von TGF $\beta$  wurde für die Abschwächung der IFN- $\gamma$ -Reaktion verantwortlich gemacht (Smeed et al 2007). Eine schwache Induktion des Zytokins war auch in der vorliegenden Studie nachvollziehbar und kann zum Absinken der IFN- $\gamma$ -Reaktion beigetragen haben. Die starke IFN- $\gamma$ -Reaktion in der ersten Versuchshälfte spricht für eine Infektionskontrolle mit einer sonst gemischten pro- und antiinflammatorischen Immunantwort. Da die Expression von TNF $\alpha$  nach einer Inokulation einheitlich gehemmt wurde, wird auch nur wenig IL-12p40 induziert, da dessen Expression von TNF $\alpha$  abhängig ist. Bei Schlachtrindern war kein Unterschied in der TNF $\alpha$ -Expression zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren nachweisbar (Shu et al. 2011). Es ist bekannt, dass klinisch erkrankte Tiere mehr IL-10 bilden als subklinisch infizierte, was zur Hemmung von TNF $\alpha$  führt (Buza et al. 2003). Da hier keine IL-10-Expression vorlag, müsste die Expression von TNF $\alpha$  gesteigert werden. Die starke IFN- $\gamma$ -Reaktion hätte auch eine stärkere Induktion von IL-12p40 erwarten lassen, da dieses Zytokin die IFN- $\gamma$ -Reaktion fördert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Induktion von TNF $\alpha$  und IL-12 bei gleichzeitiger Hemmung von TGF $\beta$  in MAP-infizierten DC vorkommt (Langelaar et al. 2005). Diese Zellen aktivieren naive T-Zellen in den Lymphknoten und können zu einer IFN- $\gamma$ -Reaktion führen. Aufgrund der von uns beobachteten Expressionsverläufe der Zytokine sind eindeutige Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Zusammenhänge nicht möglich. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Die Rolle von IFN- $\gamma$  wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen wurde angeführt, dass eine starke IFN- $\gamma$ -Reaktion die Vermehrung von MAP kontrollieren kann (Lybeck et al. 2011; Begg et al. 2011; Robinson et al. 2008; Burrells et al. 1998;

de Silva et al. 2011; Mikkelsen et al. 2009; Tanaka et al. 2005). Gleichzeitig wurde es für die Entstehung pathologischer Läsionen und damit für das Fortschreiten der Erkrankung verantwortlich gemacht (Lybeck et al. 2011; Begg et al. 2011; Robinson et al. 2008; Burrels et al. 1998).

Hinsichtlich IL-10 waren keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Läsionsgrad nachweisbar. Lediglich der Reaktionshöhepunkt unterschied sich zwischen den Gruppen. Bei Tieren mit schweren Läsionen trat er im Versuchsverlauf später auf als bei Tieren ohne Veränderungen an Darm und Lymphknoten. Die IFN- $\gamma$ - und IL-10-Reaktion unterschied sich nicht in Abhängigkeit von der Menge nachgewiesener Mykobakterien in Darm und Lymphknoten. Dies widerspricht einer Studie, die bei Tieren mit schweren Läsionen eine stärkere Sekretion von IL-10 nachwies (Shu et al. 2011). Die untersuchten Rinder waren natürlich infizierte Schlachtkühe und damit deutlich älter als unsere Tiere. Eine geringere Infektionsdosis und damit eine später auftretende oder in ihrer Intensität geringere IFN- $\gamma$ -Reaktion sind zu vermuten. Zwischen der IL-10-Reaktion und der Ausscheidung von MAP mit dem Kot wurde nur eine geringe Korrelation berechnet. Bei einer Hemmung der proinflammatorischen Immunantwort durch IL-10 wäre eine stärkere Vermehrung des Erregers zu erwarten gewesen. Dies ist in den vorliegenden eigenen Untersuchungen nicht nachvollziehbar. Da der Antigenstimulus durch die hohe Inokulationsdosis so intensiv war, ist denkbar, dass die starke IFN- $\gamma$ -Reaktion die Sekretion von IL-10 hemmt. Ob bei geringerer Dosis mehr IL-10 gebildet worden wäre und damit die Korrelation stärker gewesen wäre, bleibt unbekannt.

Ein entscheidender Zeitpunkt für die Entwicklung der unterschiedlichen Ausscheidung, Antikörper- und IFN- $\gamma$ -Reaktion waren die 24. bis 28. Woche *p. i.*, also der Zeitpunkt, zu dem die maximale IFN- $\gamma$ -Reaktion nachweisbar war. Damit stellte sich bei Tieren mit schweren Läsionen das „klassische Modell“ mit fallender IFN- $\gamma$ -Reaktion und ansteigender Antikörperreaktion dar. Lediglich die Ausscheidung folgte dem nicht, da Tiere mit Score 2 zwar im Mittel mehr MAP ausschieden, gleichzeitig der Anteil ausscheidender Tiere wie in den anderen Gruppen sank.

## **6.3 Diskussion verschiedener diagnostischer Fragestellungen**

### **6.3.1 Eignung des IFN- $\gamma$ -Tests zur Diagnostik der Frühstadien der Paratuberkulose**

Der IFN- $\gamma$ -Test eignet sich derzeit unter Feldbedingungen nicht zur Einzeltier- und Bestandsdiagnostik in den frühen Infektionsstadien der Paratuberkulose.

Zum einen existiert derzeit kein MAP-spezifisches Restimulationsantigen. Falsch-positive Reaktionen sind aufgrund von Kreuzreaktionen zu ubiquitär vorkommenden Mykobakterienspezies nicht ausgeschlossen. Zum anderen steht für die Testevaluierung

kein geeigneter Referenztest in diesen Erkrankungsphasen zur Verfügung (Kapitel 2.1.7.2.2.2). Da Antikörperproduktion und Ausscheidung bei einer natürlichen Infektion in der Regel erst in der späten subklinischen Phase einsetzen und z. T. intermittierend sind, eignen sie sich nicht als Vergleichsmethode. Derzeit beziehen sich Evaluationsstudien für den Test daher auf *post mortem* Befunde aus Pathologie, Histologie und Gewebekultur (Pérez et al. 1999; Gwozdz et al. 2000b; Huda et al. 2003). Deren Genauigkeit ist abhängig von der Anzahl untersuchter Organe (Kapitel 6.1). Werden zu wenige Gewebeproben untersucht, sind falsch-negative Ergebnisse möglich. Inwieweit sich infizierte Gewebe nach einer überstandenen Infektion regenerieren, ist unbekannt. Tiere, die die Infektionsausbreitung kontrollieren oder MAP vollständig eliminieren, sind also zur Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse sehr genau zu untersuchen. Es muss sichergestellt sein, dass infizierte Tiere in der Vergleichsmethode erkannt werden. Nur dann sind Grenzwerte definierbar. Der von Hersteller angegebene Grenzwert des häufig verwendeten kommerziellen Testsystems zur Tuberkulosedagnostik wird auch für die Paratuberkulosedagnostik angewendet (Huda et al. 2004). Ob bei der Paratuberkulose niedrigere oder höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen beweisend für eine Infektion sind, ist nur in einer Studie untersucht. Unabhängig vom gewählten Grenzwert erkannte der IFN- $\gamma$ -Test alle infizierten Tiere, der Zeitpunkt positiver Reaktionen und die Anzahl der positiven Proben unterschieden sich aber. Auch histologisch negative Schafe zeigten positive Reaktionen (Gwozdz et al. 2000b). Die großen individuellen Schwankungen innerhalb der Gruppen in der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls (Kapitel 5.1.6.7), dass die Festlegung eines geeigneten Grenzwertes für die Nutzung des IFN- $\gamma$ -Tests unter Feldbedingungen weitere Forschung erfordert.

Da derzeit unbekannt ist, ob exponierte Tiere die Infektion kontrollieren oder eliminieren können, ist unklar, ob eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion von PBMC im Blut ausschließlich eine Infektion oder aber auch das Potential der Elimination der Paratuberkulose widerspiegelt (Nielsen 2010). Im Rahmen von Bekämpfungsprogrammen bedeutet ein positiver Test ein infiziertes Tier und so dessen Keulung. Bedeutet eine positive IFN- $\gamma$ -Reaktion „Elimination“, werden MAP-resistente Tiere, die entscheidend für eine Tilgung von MAP im Bestand sind, entfernt. Bevor die entsprechenden Grundlagenerkenntnisse nicht vorhanden sind, ist der IFN- $\gamma$ -Test nicht uneingeschränkt als diagnostischer Test unter Feldbedingungen zu empfehlen.

Eine weitere Schwierigkeit ist die Festlegung des geeigneten Alters für den IFN- $\gamma$ -Test. Im Rahmen der Bekämpfung müssen infizierte Tiere so früh wie möglich entfernt werden, um eine Verbreitung von MAP über den Kot zu verhindern. Die Schwankungen in der Intensität der IFN- $\gamma$ -Reaktion bei gesunden und infizierten Jungrindern (Kapitel 2.1.7.2.2.2) traten im Alter von einem halben bis zu eineinhalb Jahren auf. Mit zunehmender Infektionsdauer fiel bei einer großen Anzahl infizierter Wiederkäuer die Zytokinsekretion wieder (Huda et al. 2004, Kapitel 5.1.6.7). Zusätzlich ist der Infektionszeitpunkt unter natürlichen Bedingungen unbekannt, was die Angabe

des Zeitfensters für die Testung unmöglich macht. Einen Ausweg bieten wiederholte Bestandsuntersuchungen (Huda et al. 2003; Huda et al. 2004).

### **6.3.2 Beeinflussung der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die Neutralisation von sekretiertem IL-10 in Überständen unstimulierter und jPPD-restimulierter PBMC**

Der Zusatz des anti-IL-10-Antikörpers CC320 zu jPPD-restimulierten PBMC infizierter Ziegenlämmer führte durch eine spezifische Neutralisation von IL-10 zur Erhöhung der Se des IFN- $\gamma$ -ELISAs. Eindeutig wurde in der Gruppe V1 (früh, geringe Dosis) im Vergleich zu Zellkulturen ohne Antikörperzusatz nach jPPD-Restimulation signifikant mehr IFN- $\gamma$  nachgewiesen. Da zur überwiegenden Anzahl der BZP signifikant mehr IFN- $\gamma$  in Überständen mit CC320 gemessen wurde als in solchen mit der IgG-Isotyp-Kontrolle, ist die IL-10-Neutralisation von der Antikörperklasse unabhängig und spezifisch. Dieses Ergebnis bestätigt andere Untersuchungen, in denen sowohl in Zellkulturüberständen von experimentell mit Paratuberkulose oder Tuberkulose infizierten Rindern (Denis et al. 2007; Buza et al. 2004) als auch in Überständen natürlich infizierter Ziegen und Rinder eine signifikante Steigerung der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach IL-10-Neutralisation mit dem hier verwendeten Antikörper CC320 erzielt wurde (Lybeck et al. 2009; Denis et al. 2007).

In den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) zeigten sich kaum signifikante Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Konzentration in Überständen mit und ohne CC320 bzw. mit CC320 oder der IgG-Isotyp-Kontrolle. Da die Funktionalität von CC320 aber eindeutig gezeigt wurde, führten andere Einflüsse zu diesen Ergebnissen. Denn auch in diesen beiden Gruppen war die mittlere IFN- $\gamma$ -Sekretion nach einer IL-10-Neutralisation meist stärker als ohne Antikörperzusatz. Das Alter der inokulierten Tiere und die Kinetik der IFN- $\gamma$ - und IL-10-Reaktion führten dazu, dass die Unterschiede statistisch nicht verifizierbar waren. Inwieweit und aus welchen Gründen sie sich von anderen Studien unterscheiden, ist in Abschnitt 6.2.5 ausführlich dargestellt. Die geringen Auswirkungen der IL-10-Neutralisation innerhalb der Gruppe V2 (ab 32 Wochen *p. i.*, früh, hohe Dosis) sind ebenfalls darauf zurückzuführen. Das Niveau der IL-10-Sekretion war in den spät inokulierten Gruppen V3 (geringe Dosis) und V4 (hohe Dosis) bereits zu Versuchsbeginn auf das der Kontrolltiere gesunken. Die sekretierte IL-10-Menge in den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und insbesondere V2 (hohe Dosis) verringerte sich dagegen erst ab der zweiten Versuchshälfte. Je weniger IL-10 sich in den Kulturüberständen befindet, desto geringer ist der Neutralisationseffekt. Unabhängig von der geringen IL-10-Konzentration verringerte sich außerdem mit zunehmender Versuchsdauer gruppenunabhängig auch die jPPD-induzierte IFN- $\gamma$ -Sekretionsfähigkeit der PBMC, was ab einem bestimmten Punkt durch eine IL-10-Neutralisation nicht mehr auszugleichen ist, so dass Unterschiede statistisch nicht mehr verifizierbar sind. Die geringe Tierzahl in Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) ab der 40. Woche *p. i.* bedingte, dass ab der 28. Woche *p. i.* keine



signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar waren, denn je weniger Fälle eine Studienpopulation enthält, desto größer ist die Gewichtung einzelner zufälliger Unterschiede. Die großen Schwankungen der IFN- $\gamma$ -Reaktion innerhalb der Gruppe (Kapitel 5.5.1) verzerrten den Neutralisationseffekt zusätzlich.

Das frühe Infektionsstadium unserer Ziegen bedingte Unterschiede in der Zytokinausschüttung und führte zu einer verminderten IL-10-Neutralisation. Bei einmalig beprobten 25 Monate alten Rindern, die in der ersten Lebenswoche inokuliert worden waren, war im Gegensatz zur vorliegenden Studie ein deutlicher Neutralisationseffekt messbar (Buza et al. 2004, 2003). Die Tiere befanden sich in einem späteren Infektionsstadium. Im Gegensatz zu exponierten Ziegen zeigte sich bei natürlich infizierten, klinisch erkrankten Ziegen ein starker Neutralisationseffekt. Zwar ist der Infektionszeitpunkt unbekannt, aufgrund der geringeren Empfänglichkeit adulter Tiere gegenüber MAP ist von einer Jungtierinfektion auszugehen, so dass ein späteres Infektionsstadium im Vergleich zu unserer Studie vorliegt (Lybeck et al. 2009). Die eingesetzte CC320-Konzentration unterschied sich nicht zu unserer Studie, in den Vergleichsuntersuchungen war die PBMC-Anzahl jedoch entweder nicht standardisiert (Buza et al. 2004) oder doppelt so hoch (Lybeck et al. 2009). In letzterer Studie wurde eine 2,5fach höhere Konzentration jPPD eingesetzt, was die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Abhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Sekretion von der eingesetzten Menge jPPD bestätigt (Kapitel 5.1.6.3) und die Folgen der IL-10-Neutralisation beeinflusst.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergab sich in den früh inokulierten Gruppen V1 (geringe Dosis) und V2 (hohe Dosis) durch CC320 ein diagnostischer Vorteil. Signifikante Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollziegen ließen sich vier Wochen früher nachweisen als in Kulturüberständen ohne Antikörper oder nach Zugabe der IgG-Isotyp-Kontrolle. Zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich keine Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration nach IL-10-Neutralisation. Eine Maskierung von Differenzen zwischen den Inokulationsschemata durch CC320 ist ausgeschlossen.

Setzte man unstimulierten Zellen von Kontroll- oder Versuchstieren CC320 oder die IgG-Isotyp-Kontrolle zu, unterschied sich die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung im Vergleich zu Zellen ohne Antikörper nicht. Dies bestätigt die Ergebnisse einer weiteren experimentellen Studie an Rindern (Buza et al. 2004). Unstimulierte PBMC natürlich infizierter Ziegen zeigten eine geringe Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach IL-10-Neutralisation, was entweder auf unterschiedliche Sensitivität des verwendeten ELISA-Systems oder auf die Auseinandersetzung des Immunsystems mit weiteren Erregern zurückzuführen ist (Lybeck et al. 2009). Eine solche führt zu einer Aktivierung der zellulären Immunreaktion und damit gegebenenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen. Sie ist unter experimentellen Bedingungen nicht zu erwarten. In jPPD-restimulierten Zellkulturen von Kontrolltieren unterschied sich die gemessene IFN- $\gamma$ -Konzentration nicht signifikant zwischen Zellen mit und ohne Antikörperzusatz. Falsch-positive Reaktionen nicht infizierter Tiere durch eine unspezifische Restimulation wären im

diagnostischen Einsatz des IFN- $\gamma$ -ELISAs unter experimentellen Bedingungen nicht zu erwarten. Aufgrund der derzeit unzureichenden Sp der Restimulation (Kapitel 2.1.7.2.2.2) ist eine unspezifische Zytokinausschüttung durch die Reaktion auf andere Pathogene im Feld möglich. Bei einer verbesserten Se des ELISAs durch CC320 sind falsch-positive Reaktionen zu erwarten, da auch jPPD-restimulierte Zellen Paratuberkulose-negativer Tiere nach der IL-10-Neutralisation mehr IFN- $\gamma$  ausschütteten (Lybeck et al. 2009).

Die Zugabe der beiden Antikörper zu unstimulierten PBMC bewirkte tendenziell eine Verringerung der IFN- $\gamma$ -Sekretion gegenüber Zellen ohne Antikörper (Kapitel 5.5.1, Abb. 5.31). Dies steht in Widerspruch zu Buza et al. (2004) und Lybeck et al. (2009), wo unter Verwendung der gleichen Konzentrationen von CC320 und der IgG-Isotyp-Kontrolle weniger IFN- $\gamma$  messbar war, wenn den Zellen kein Antikörper zugegeben worden war. Diese und unsere Studie verwendeten jeweils ein anderes ELISA-System. Es ist möglich, dass überschüssige Antikörper unspezifisch an die ELISA-Platte banden oder sterisch die Anlagerung von IFN- $\gamma$  verhinderten. Bei Verwendung von verdünntem Vollblut anstelle von PBMC (Buza et al. 2004) könnten unspezifische Bindungen insbesondere der IgG-Isotyp-Kontrolle mit der PBMC-Oberfläche, IFN- $\gamma$  oder anderen Molekülen eine mechanische Behinderung der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung verhindert haben. Die Effekte waren nicht statistisch signifikant und daher zu vernachlässigen. Ob die absolute IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand einen Einfluss hatte, muss offen bleiben, da aufgrund häufig fehlender Konzentrationsangaben oder anderer Maßeinheiten ein Vergleich mit der Literatur schwierig ist.

Während die IFN- $\gamma$ -Sekretion in den zitierten Studien und unserer nach 24 h Neutralisation gemessen wurde, bestimmten wir IL-10 nach 64 h. In Vorversuchen hatte sich nach ConA-Restimulation gezeigt, dass das Maximum an IL-10 nach 72 h Inkubation sekretiert wurde (Daten nicht gezeigt), was von anderen Autoren bestätigt wird (Wattegedera et al. 2010). In Studien mit MAP-infizierten Rindern wurde die maximale Genexpression deutlich früher detektiert (de Almeida et al. 2008; Buza et al. 2004). Die Zytokinexpression korrelierte aber nicht zwingend mit seiner Sekretion (Shu et al. 2011). Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass zum Zeitpunkt der IFN- $\gamma$ -Messung weniger IL-10 in den Überständen vorhanden war als nach 64 h. Eine spätere IFN- $\gamma$ -Bestimmung hätte aufgrund der höheren IL-10-Konzentration zu einem stärkeren Neutralisationseffekt geführt. Die daraus folgende Steigerung der IFN- $\gamma$ -Konzentration ist aber abhängig von der CC320-Konzentration in der Probe (Lybeck et al. 2009; Buza et al. 2004). Um eine Sättigung der Reaktion und damit eine geringere IFN- $\gamma$ -Sekretion zu vermeiden, müssen Inkubationsdauer und Antikörperkonzentration aufeinander abgestimmt werden.

### 6.3.3 Eignung der getesteten rekombinanten MAP-Proteine als diagnostische Antigene zur Steigerung der Spezifität des IFN- $\gamma$ -Tests

Die getesteten rekombinanten MAP-Proteine sind nicht als Restimulationsantigene zur Erhöhung der Sp des IFN- $\gamma$ -Tests geeignet, da sie keine spezifische IFN- $\gamma$ -Reaktion bei mit Paratuberkulose infizierten Ziegen auslösten. Ein spezifisches Antigen muss, verglichen mit unstimulierten Zellen, nach Restimulation von PBMC infizierter Ziegen, zu einer signifikant stärkeren Zytokinausschüttung führen, die sich in der Intensität nicht zu stark von der nach jPPD-Restimulation unterscheidet, bei Kontrolltieren jedoch nicht auftritt. In den Zellkulturüberständen der Kontrolltiere bewirkten die rekombinanten MAP-Proteine keine höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration im Vergleich zu unstimulierten PBMC. Bei infizierten Lämmern traten zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion unstimulierter und MAP-Protein-restimulierter Zellen nur vereinzelt signifikante Unterschiede auf, wobei unstimulierte Zellen stets mehr IFN- $\gamma$  sekretierten, so dass insgesamt keine spezifische IFN- $\gamma$ -Induktion nachweisbar war. Bei infizierten Ziegen führte eine Restimulation mit jPPD dagegen in drei Versuchsgruppen stets zu einer signifikant stärkeren IFN- $\gamma$ -Sekretion als der Zusatz der rekombinanten MAP-Proteine. Lediglich in der Gruppe V2 (früh, hohe Dosis) war der Unterschied in der 44. Woche *p. i.* nicht statistisch verifizierbar. Zu diesem BZP befanden sich nur noch drei Tiere in der Gruppe.

Im Gegensatz zur negativen IFN- $\gamma$ -Reaktion wurde von allen MAP-Proteinen (unabhängig von der Tiergruppe) zu mindestens einem BZP eine deutliche IL-10-Sekretion hervorgerufen. Sie nahm entsprechend der Reaktionsfähigkeit unstimulierter Zellen (Kapitel 0) im Versuchsverlauf ab und war signifikant stärker als die Reaktion gegenüber jPPD (Kapitel 0). Die Steigerung der IL-10-Sekretion war nicht spezifisch für eine MAP-Infektion, da sie auch in den Kontrollgruppen auftrat. Die altersabhängige IL-10-Reaktion spiegelte sich hier wieder (Kapitel 5.1.6.8).

Die unspezifische Zytokininduktion beruhte vermutlich auf der LPS-Kontamination der verwendeten MAP-Proteine (Bannantine, persönliche Mitteilung). Die untersuchten Proteine wurden in einem *Escherichia coli*-Vektor exprimiert, weshalb nicht auszuschließen ist, dass bei der Präparation aus den Bakterien eine Kontamination mit LPS aus deren Zellwand erfolgte. LPS bindet auf Makrophagen an den CD14-Rezeptor und erhöht über den TRIF- und MyD88-Signalweg die IL-10-Sekretion (Boonstra et al. 2006). Auf Vektorbestandteile zurückzuführende Kreuzreaktionen sind bekannt (Gumber et al. 2009a). Da sich die Proteine in ihrer Fähigkeit eine IFN- $\gamma$ - oder IL-10-Sekretion zu induzieren kaum unterschieden, war eine Kontamination aller verwendeten Proteine aufgetreten. Geringgradige Unterschiede in der IL-10-Induktion zwischen den einzelnen rekombinanten MAP-Proteinen sind durch einen unterschiedlichen LPS-Gehalt in der pipettierten Menge erklärbar. Auch LacZ war vermutlich kontaminiert, da die Gewinnung dieses unspezifischen Expressionsproduktes der in *Escherichia coli* eingeschleusten Plasmide der der

exprimierten MAP-Proteine gleich. Daher trat keine signifikant unterschiedliche IFN- $\gamma$ - bzw. eine nur tendenziell verschiedene IL-10-Reaktion zwischen Zellen mit rekombinanten MAP-Proteinen und solchen mit LacZ auf.

Eine andere Studie bestätigt Kreuzreaktionen bei Kontrolltieren gegenüber unspezifisch in *Escherichia coli* exprimierten Proteinen aber auch gegenüber solchen, die in einem MAP-Typ-I-Stamm exprimiert worden waren (Gumber et al. 2009a). Die Vorabsorption mit Seren, die entsprechende Proteine des *Escherichia coli* -Vektors oder von *M. phlei* enthielten, reduzierten die OD in den Proben von Kontrolltieren, ohne die der Versuchsprouben zu beeinträchtigen (Gumber et al. 2009a). Die unspezifische IL-10-Sekretion hemmt die Th1-Antwort, so dass dadurch weniger IFN- $\gamma$  sekretiert wird (Buza et al. 2004).

Da ein Zusatz von LacZ tendenziell zu einer geringeren IL-10-Konzentration im Zellkulturüberstand führte, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die einzelnen rekombinanten MAP-Proteine selbst eine geringgradige IL-10-Sekretion bewirkten. Eine spezifische oder unspezifische Bindung an Oberflächenrezeptoren von in den PBMC enthaltenen Monozyten oder solchen in der Phagosomenmembran, die die Signalkaskade zur IL-10-Sekretion auslösen, ist denkbar. Verschiedene rekombinant hergestellte Proteine lösten eine IFN- $\gamma$ - und IL-10-Sekretion bei infizierten Tieren aus. MAP1518 erhöhte die IL-10-Sekretion von CD14<sup>+</sup>-Zellen infizierter Kälber, PBMC zeigten außerdem eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion (Nagata et al. 2010). Zwar ist eine LPS-Kontamination auch hier nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich, da die Testung mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot zeigte, dass die untersuchten Proteine von MAP produziert werden und eine Reaktion bei gesunden Kälbern nicht nachweisbar war (Nagata et al. 2005).

Für die in der vorliegenden Untersuchung getesteten rekombinanten MAP-Proteine liegen keine Literaturdaten zur Induktion einer zellulären Reaktion vor. Einige der Proteine sind auf ihre Eignung als diagnostische Antigene in Antikörper-ELISAs untersucht worden.

MAP1272c wurde in einer Mischung aus Seren von drei infizierten Rindern - nicht jedoch in negativen Seren - im Immunoblot erkannt (Li et al. 2007). Auch im ELISA traten keine falsch-positiven oder -negativen Reaktionen auf. Da Antikörper gegen dieses Protein von infizierten Tieren gebildet werden, muss es von Antigen-präsentierenden Zellen an B-Zellen präsentiert werden. Eine zusätzliche Aktivierung von T-Zellen, die wiederum B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen, ist ebenfalls denkbar. Dies und seine Sekretion in die Umgebung der Bakterien sind gute Voraussetzungen um vom Immunsystem als Antigen erkannt zu werden und diagnostisch nutzbar zu sein (Mikkelsen et al. 2011). Weitere Untersuchungen dieses Proteins hinsichtlich der Induktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 erscheinen zwar sinnvoll, da es bei anderen Mykobakterien aber als potentielles Invasin und Virulenzfaktor bekannt ist (Labo et al. 1998; Li et al. 2005), ist seine MAP-Spezifität infrage zu stellen.

MAP2077c wurde in zwei Studien mittels Proteinarray vergleichend zu anderen potentiellen Antigenen auf seine Fähigkeit, spezifische Antikörper zu binden, untersucht (Bannantine et al. 2008a, b). Die Bindungsfähigkeit lag deutlich über der der Negativkontrolle, unterschied sich jedoch hinsichtlich ihrer Intensität. Während in einer Studie nur eine geringe Spotintensität im Vergleich zu den anderen Proteinen nachweisbar war (Bannantine et al. 2008a), zeigte es in einer weiteren Studie die drittstärkste Intensität (Bannantine et al. 2008b). Worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, ist nicht nachvollziehbar, da dieselben Proteine verglichen und Testseren von denselben infizierten Rindern eingesetzt wurden. Die Intensität unterschied sich auch zwischen den Tierarten. Sie war in Proben vom Rind deutlich höher als in Serum von Mäusen, jedoch vergleichbar zu der von Kaninchenserum (Bannantine et al. 2008b). Bei diesem Protein handelt es sich um ein Eiweiß mit unklarer Funktion (Bannantine et al. 2008b). Es wird wie MAP1272c sekretiert und bindet an Antikörper infizierter Tiere. Seine MAP-Spezifität ist höher einzuschätzen, da nur eine geringe Kreuzreaktivität mit Seren von *M. bovis*- und *M. avium* spp. *avium*-infizierten Rindern auftrat (Bannantine et al. 2008a). Dies trifft nicht auf MAP1204 zu, das in etwa gleich stark mit Serum eines *M. avium* spp. *avium*-infizierten Rindes reagierte wie auf das eines natürlich mit Paratuberkulose infizierten Tieres (Bannantine et al. 2008a). Dieses extrazelluläre Invasin löste eine starke Spotintensität bei Rind und Kaninchen aus (Bannantine et al. 2008a). Für MAP 3481 existieren bisher keine Untersuchungen zu seiner Funktion und Antigenität. Es handelt sich um ein Lipoprotein in der Zellwand von MAP (Li et al. 2005). Aufgrund der LPS-Kontamination kann keine abschließende Aussage über die Eignung dieses Proteins getroffen werden.

Die zitierten Studien für die hier getesteten Proteine müssen aufgrund der tierartlichen Unterschiede in der Antikörperbindungsfähigkeit (Bannantine et al. 2008b) an der Ziege überprüft werden, auch wenn Kreuzreaktionen einzelner Proteine zwischen den Wiederkäuerspezies Schaf und Rind bekannt sind (Bannantine et al. 2008c, Paustian et al. 2004). Die Antikörperkonzentration gegen bestimmte Antigene stieg außerdem nicht kontinuierlich im Erkrankungsverlauf an. Es traten Peaks auf, was auf Schwankungen in der Antikörperbildung durch das Tier zurückgeführt wird (Bannantine et al. 2008c). Einzelne Antigene wurden nur in bestimmten Infektionsphasen oder unter bestimmten äußeren Bedingungen von MAP exprimiert und führten zu Schwankungen in der Antikörperproduktion (Gumber et al. 2009b; Gumber und Whittington 2009). Unterschiede zwischen Schafen und Rindern im subklinischen und klinischen Erkrankungsstadium waren nicht nachweisbar (Bannantine et al. 2008a,c). Einige Proteine, die *in vitro* unter Stress besonders stark exprimiert worden waren, führten insbesondere bei Schafen mit pauzibazillären Läsionen zu einer Antikörperreaktion. Andere wurden unabhängig von der Läsionsform exprimiert (Gumber et al. 2009b; Bannantine et al. 2008c). Die pauzibazilläre Läsionsform wurde beim Schaf einer Kontrolle der Infektion durch das Immunsystem zugeordnet (Pérez et al. 1999; Gwozdz et al. 2000a). Es ist also davon auszugehen, dass die Auseinandersetzung des

Abwehrsystems mit MAP in dieser Erkrankungsphase dazu führt, dass das Bakterium mehr Stressoren ausgesetzt ist, die sein Überleben gefährden. Die Präsentation bestimmter Antigene an T- und B-Zellen ist also beim Vorhandensein pauzibazillärer Läsionen wahrscheinlicher und kann erklären, warum Bannantine (2008c) bei einigen Tieren eine Antikörperreaktion auf bestimmte Proteine nachwies und bei anderen nicht. Die individuellen Unterschiede in der Auseinandersetzung zwischen Erreger und Wirt, wie sie auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurden, müssen zukünftig berücksichtigt werden.

Für die Entwicklung spezifischerer diagnostischer Tests müssen zunächst MAP-spezifische Antigene identifiziert werden, die kontinuierlich in allen Infektionsstadien vom Erreger exprimiert werden, um eine Immunreaktion auszulösen. Bei der Analyse des Genoms von MAP wurden nur 39 potentielle, MAP-spezifische Proteine nachgewiesen (Li et al. 2005). Ihre Eignung ist für die einzelnen Wiederkäuerarten zu validieren. Auch die Kombination verschiedener Antigene, von denen bekannt ist, in welchen Infektionsstadien und bei welchen Tierarten sie exprimiert werden, wird favorisiert (Bannantine et al. 2008a). Die Se eines ELISAs, in dem eine solche Antigenkombination getestet wurde, entsprach einem kommerziellen System. Wurden allerdings nur einzelne Proteine als Bindungsantigen eingesetzt, erhöhte sich zwar die Anzahl der als richtig infiziert erkannten Tiere, die Konzentration der Antigene im Gemisch war jedoch geringer als bei der Einzeltestung (Gumber et al. 2009a).

#### **6.3.4 Identifikation infizierter Ziegen mittels Genexpressionsprofils verschiedener Zytokine**

Die Erstellung genetischer Reaktionsprofile aus mehreren Zytokinen bietet eine potentielle neue diagnostische Möglichkeit mit Paratuberkulose infizierte Tiere zu identifizieren. Eine praktische Nutzung ist derzeit aufgrund fehlender Grundlagenkenntnisse nicht möglich.

Die Erstellung von Zytokinmustern speziell zur Diagnostik der Erkrankung ist bisher nicht beschrieben. Die Evaluierung der Expression unterschiedlichster Gene von Makrophagen oder PBMC aus Blut, Lymphknoten des Darmes oder Darmgewebe MAP-infizierter Wiederkäuer war Gegenstand vieler Untersuchungen (Abendaño et al. 2013; Gillan et al. 2010; Robinson et al. 2011; Rue-Albrecht et al. 2014; Coussens und Colvin 2004). Ziel war der Nachweis von Unterschieden zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren bzw. die Untersuchung einer Abhängigkeit der Genexpression von der Infektionsdauer (Coussens und Colvin 2004) und vom Infektionsstadium (Robinson et al. 2011). Dabei wurden auch Zytokingene untersucht, um eine Beeinflussung der Infektionsausprägung durch die verschiedenen Mediatoren aufzuklären (Tanaka et al. 2005; Coussens et al. 2004; Borrmann et al. 2011). Die zu Grunde liegenden Hypothesen bezogen sich auf pathogenetische Fragestellungen. Eine diagnostische Nutzung der Genexpressionsunterschiede wurde bisher nicht beschrieben. Eine Untersuchung diskutierte, dass die Analyse der Genexpression zur Entwicklung

diagnostischer Tests beitragen kann (Adams et al. 2011) und lediglich eine weitere legte bei der Erstellung von Reaktionsprofilen infizierter und nicht infizierter Tiere eine diagnostische Fragestellung zu Grunde (Zhong et al. 2011). Allerdings war nicht die Erstellung eines Expressionsprofils verschiedener Gene sondern die Identifikation einzelner zum Infektionsnachweis geeigneter Bestandteile des Proteoms das Ziel. Die Erstellung eines Zytokinprofils basierend auf ihrer Transkription stellt somit einen neuen diagnostischen Ansatz dar.

Das von uns untersuchte Zytokinspektrum bietet allerdings derzeit keine Möglichkeit infizierte von nicht infizierten Tieren zu unterscheiden. Die Genexpressionsprofile von Kontroll- und Versuchsziegen unterschieden sich zwar zu allen untersuchten BZP, dies beruht aber fast ausschließlich auf der kontinuierlich erhöhten IFN- $\gamma$ -Genexpression der Versuchstiere. Häufiger als bei Kontrolltieren veränderte sich auch die Expression von TNF $\alpha$ , IL-12p40 und TGF $\beta$ . Die Unterschiede waren jedoch entweder nur gering oder traten nur zu bestimmten BZP auf. Auch in der Gruppe K1 (früh) veränderte sich die Expression von TNF $\alpha$  und TGF $\beta$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu einzelnen BZP. Da es sich im Feld nicht um Verlaufsuntersuchungen handelt und der Infektionszeitpunkt eines Tieres unbekannt ist, haben die untersuchten Zytokine - mit Ausnahme von IFN- $\gamma$  - keine diagnostische Aussagekraft. Die Expressionsanalyse von IFN- $\gamma$  bedeutet jedoch einen erhöhten Aufwand an Material, Zeit und Kosten im Vergleich zum IFN- $\gamma$ -Test.

Die Aussagekraft der erstellten Genexpressionsprofile wird durch die geringe Anzahl untersuchter Tiere und die großen Expressionsunterschiede innerhalb der Gruppen beeinträchtigt. Die Untersuchung einer größeren Fallzahl ist zwingend erforderlich, um die Streuung zu reduzieren und das gesamte Reaktionsspektrum in der Population widerzuspiegeln. Anderenfalls sind falsch-positive und -negative Reaktionen nicht auszuschließen.

Auch die geringe Anzahl der untersuchten Parameter und ihre Auswahl beeinträchtigen das Ergebnis. Werden mehr spezifische Parameter in das Profil einbezogen, erhöht sich die diagnostische Sicherheit. Aufgrund wirtschaftlicher Überlegungen kann in der Routinediagnostik nur eine begrenzte Anzahl Zytokine in einen Test einbezogen werden.

Vorraussetzung für die Nutzung von Zytokinexpressionsprofilen als Diagnostikum ist die Festlegung von Grenzwerten für positive und negative Reaktionen. Dies setzt die Erstellung eines tierartspezifischen Profils der Basiszytokinreaktion von PBMC gesunder Tiere voraus. Ein solches derzeit nicht existierendes Referenzprofil muss die gesamte empfängliche Population widerspiegeln.

Natürliche Unterschiede in der Zytokinexpression gesunder Tiere basierend auf Tierart, Rasse, Alter und physiologischen Unterschieden in der Zellzusammensetzung des Blutes sind denkbar. Innerhalb der infizierten Population sind Unterschiede in Abhängigkeit von Alter und Läsionsform bekannt (Gillan et al. 2010; Shu et al. 2011; Smeed et al. 2007). Die Expression verschiedener Gene, einschließlich der von

Zytokinen, scheint sich in ihrer Zusammensetzung und Intensität im Verlauf einer Infektion zu verändern (Coussens und Colvin 2004; Robinson et al. 2011). Da der Infektionszeitpunkt eines natürlich infizierten Tieres unbekannt ist, ist die Auswahl der untersuchten Zytokine hinsichtlich ihrer Stabilität im Infektionsverlauf entscheidend. Weiterhin existieren Unterschiede in der Genexpression zwischen den Zielgeweben von MAP und der Reaktion im Blut (Coussens et al. 2004). Die Infektion breitet sich allmählich aus, so dass verschiedene Reaktionsmechanismen des Immunsystems an unterschiedlichen Stellen gleichzeitig ablaufen – während an einer Stelle des Darmes bereits Läsionen bestehen, wird ein anderer Teil erst infiziert. Die Reaktion im Blut bildet also verschiedene immunologische Prozesse an den Zielorganen ab. Je nachdem, welcher dieser Prozesse überwiegt, können unterschiedliche Expressionsprofile entstehen, die jedoch alle eine Infektion widerspiegeln.

Entscheidend für eine Paratuberkulose-spezifische Reaktion ist die Sicherheit, dass die Unterschiede nicht auf den Kontakt mit anderen Erregern zurückzuführen sind, was nur durch die spezifische Restimulation isolierter Zellen erreichbar ist. Momentan existiert kein 100%ig spezifisches Antigen, so dass derzeit auch bei der Erstellung der Reaktionsprofile mit falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen ist. Die Erstellung von Referenzprofilen für andere Infektionen, insbesondere mit anderen Mykobakterienspezies wäre daher notwendig, um Überschneidungen zu dem der Paratuberkulose auszuschließen. Es ist bekannt, dass weniger eng verwandte Erreger unterschiedliche Signaltransduktionswege im Immunsystem des Wirts aktivieren (Adams et al. 2011).

Sollte sich ein charakteristisches Zytokinprofil für klinisch erkrankte Tiere herausstellen, wäre eine schnelle Befundung in Zusammenhang mit der MAP-PCR aus dem Kot, die nur starke Ausscheider nachweist, möglich.

Die farbliche Codierung der Reaktionsrichtung und –stärke kann zu einer schnelleren Befunderstellung beitragen und wird aufgrund der besseren Übersicht über auftretende Unterschiede derzeit zunehmend in wissenschaftlichen Publikationen genutzt (Adams et al. 2011; Lybeck et al. 2011). Je nach Anzahl der farblichen Abstufungen gehen dabei Detailinformationen verloren, für die Felddiagnostik - z. B. im Rahmen eines Sanierungsprogramms - ist dies jedoch von untergeordneter Bedeutung. Eine farbliche Codierung ist leicht programmierbar, schnelle Abgleiche mit vorhandenen „Standardprofilen“ sind möglich.



## 6.4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen für weiterführende Untersuchungen

1. Die Etablierung eines international vergleichbaren, reproduzierbaren caprinen Langzeitinfektionsmodells für die Paratuberkulose ist gelungen. Bei Folgestudien sind die Randomisierung bei der Bildung der Tiergruppen und die Verblindung der Untersucher/des Laborpersonals zu verbessern.
2. Ein Einfluss der gewählten Inokulationsdosen und Inokulationszeitpunkte auf die zelluläre, proinflammatorische Immunantwort bestand nicht. Die Inokulationsdosen divergierten nur um das Zweifache. Bei größeren Differenzen sind Abhängigkeiten der Immunreaktion dokumentiert. Ab welchem Unterschied in der Menge der Inokulationsdosen sich eine Abhängigkeit der Immunreaktion darstellen lässt, sollte evaluiert werden.
3. Die Intensität der zellulären, proinflammatorischen Immunantwort ist bei hohen Inokulationsdosen individuell und korreliert positiv mit der MAP-Ausscheidung, der Antikörpermenge, der MAP-Anzahl in Darm und Lymphknoten und dem Schweregrad der pathohistologischen Läsionen. Die Rolle von IFN- $\gamma$  bei einer Infektionsüberwindung und bei der Läsionsentstehung sollte durch gleichzeitige IFN- $\gamma$ -Bestimmung und pathohistologische Untersuchungen zu verschiedenen BZP aufgeklärt werden.
4. Der Übergang zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort ist nicht durch IL-10 bedingt. Bei hohen Infektionsdosen treten beide Anteile der Immunantwort parallel und IL-10-unabhängig auf. Das „klassische“ Modell der Immunreaktion gegenüber MAP ist daher nicht allgemeingültig. Bezüglich der Inokulationsbedingungen, die zu Abweichungen von diesem Modell führen und den Folgen für Diagnostik und Bekämpfung einer MAP-Infektion besteht Forschungsbedarf.
5. Die gewählten rekombinanten MAP-Proteine eignen sich nicht als spezifische Antigene im IFN- $\gamma$ -Test. Die Se des Tests wird durch die IL-10-Neutralisation erhöht. Der Bedarf an MAP-spezifischeren Antigenen auf der Basis weiterer rekombinanter MAP-Proteine oder der Einzelkomponenten von jPPD ist aufgrund fehlender Tests für die Frühdiagnostik einer MAP-Infektion dringend.
6. Zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren existieren mit Ausnahme von IFN- $\gamma$  keine diagnostisch nutzbaren Unterschiede in der Genexpression der gewählten Zytokine. Es sollten weitere Zytokine hinsichtlich ihrer diagnostischen Eignung getestet werden.
7. Der IFN- $\gamma$ -Test eignet sich derzeit aufgrund fehlender Daten zur Rolle des Zytokins bei einer Infektionsüberwindung nicht für den Einsatz unter Feldbedingungen. Ob MAP eliminierbar ist, sollte daher untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

### **Etablierung eines caprinen Infektionsmodells für die Paratuberkulose sowie Nachweis und Charakteristik der spezifischen Immunantwort gegenüber *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) unter Berücksichtigung verschiedener diagnostischer Fragestellungen**

Die Diagnostik in Frühstadien der Paratuberkulose ist nicht sicher möglich. Dies beruht auf dem unzureichenden Verständnis der Pathogenese der Erkrankung. Es fehlen außerdem sensitive und spezifische diagnostische Methoden. Als potentieller Test gilt der IFN- $\gamma$ -Assay, für den jedoch spezifische Restimulationsantigene fehlen. Es ist unbekannt, ob sich weitere Zytokine für die Diagnostik eignen.

Um pathogenetische Fragestellungen zu beantworten und diagnostische Tests zu entwickeln und zu evaluieren, sollte ein sicheres, international vergleichbares Langzeitinfektionsmodell an der Thüringer Wald Ziege entwickelt und ein geeigneter Inokulationsmodus gefunden werden. Die Studie diente auch dazu, die zelluläre und humorale Immunantwort zu charakterisieren und Zusammenhänge zur Ausscheidung des Erregers und den pathohistologischen Befunden darzustellen. Insbesondere der Übergang von der zellulären zur humoralen Immunantwort war von Interesse. Weiterhin sollte die Sensitivität des IFN- $\gamma$ -Tests durch Neutralisation von IL-10 verbessert werden. Es wurden vier rekombinant hergestellte MAP-Proteine auf ihre Eignung als spezifische Antigene in diesem Test untersucht. Anhand der Genexpression von IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und IL-12p40 sollten für MAP-Infektionen typische Zytokinmuster erstellt und auf ihre diagnostische Eignung untersucht werden.

Es wurde ein Infektionsmodell etabliert, das internationalen Standards entspricht. Die Infektion gelang bei 96 % der Versuchstiere. Die gewählten Inokulationsdosen (Unterschied um den Faktor zwei) führten ebenso wie die gewählten Inokulationszeitpunkte (Abstand von 29 Tagen innerhalb der ersten vier Lebenswochen) nicht zu Unterschieden in der Erregerausscheidung und der zellulären und humoralen Immunantwort. Die frühe Inokulation mit der höheren Dosis bewirkte bei einigen Tieren möglicherweise einen Thiaminmangel. Nach einer passiven Ausscheidung über vier Wochen *p. i.* wurden drei verschiedene fäkale Ausscheidungsprofile nachgewiesen: 1. eine kontinuierliche, 2. eine intermittierende und 3. eine während der Versuchsdauer sistierende MAP-Ausscheidung mit dem Kot. Die Inokulation führte zu einer schnellen IFN- $\gamma$ -Reaktion, die ab der zweiten Versuchshälfte sank. Die Antikörperproduktion stieg nur wenig später an und verlief parallel zur IFN- $\gamma$ -Reaktion. Drei Tiere bildeten keine Antikörper. Die immunologischen Reaktionen waren durch große individuelle Schwankungen gekennzeichnet. Bei einer Ziege war retrospektiv keine Infektion aber eine IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion nachweisbar. Tiere mit schweren Läsionen schieden mehr Erreger aus und wiesen in der zweiten Versuchshälfte eine deutlich

stärkere Antikörperreaktion auf. Während sich dies als Trend auch für die Intensität der IFN- $\gamma$ -Reaktion nachweisen ließ, unterschied sich ihr Verlauf nicht in Abhängigkeit von der Schwere der pathohistologischen Läsionen. In den ersten 28 Versuchswochen trat unabhängig von der Inokulation eine altersbedingte IL-10-Induktion auf. Im Anschluss unterschied sich die sekretierte Menge IL-10 nicht zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Selbst die Neutralisation dieser geringen IL-10-Mengen in Zellkulturüberständen bewirkte eine Steigerung der IFN- $\gamma$ -Konzentration im IFN- $\gamma$ -Assay. Die vier untersuchten rekombinanten MAP-Proteine induzierten keine spezifische IFN- $\gamma$ -Reaktion, aufgrund einer Kontamination mit LPS jedoch unspezifisch IL-10. Die Genexpression zwischen infizierten und nicht infizierten Ziegen unterschied sich nur für IFN- $\gamma$  signifikant. Ein eindeutig für die Paratuberkulose spezifisches Zytokinmuster war nicht nachweisbar.

Das etablierte Infektionsmodell erwies sich als geeignet pathogenetische Fragestellungen zu beantworten und Diagnostika zu entwickeln und zu evaluieren. Für die Untersuchung pathologischer Fragestellungen, die Feldinfektionen imitieren sollen, sollte die Inokulation ab dem 42. Lebenstag bevorzugt werden. Inokulationsdosen, die sich maximal um den Faktor zwei unterscheiden, reichten nicht aus, um Unterschiede in der Immunreaktion darzustellen. Hohe Infektionsdosen führten zu einer schnellen IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion. IL-10 hat unter diesen Inokulationsbedingungen keinen Einfluss auf den Übergang von zellulärer zu humoraler Immunantwort. Die Schwere der Läsionen war abhängig von der Stärke der Immunantwort und stand in Relation zur Intensität der Ausscheidung. Aufgrund der parallelen Ausscheidung, Antikörperreaktion und IFN- $\gamma$ -Reaktion ist das „klassische“ Modell der Immunreaktion nicht mehr aufrecht zu erhalten, da es lediglich auf einen Teil infizierter Tiere zutrifft. Es muss in Abhängigkeit von der aufgenommenen Erregermenge von einer individuellen Immunreaktion ausgegangen werden. Eine Überwindung der Infektion ist in Betracht zu ziehen.

Die untersuchten rekombinanten MAP-Proteine eigneten sich nicht für den Einsatz im IFN- $\gamma$ -Assay. Der Einsatz IL-10-neutralisierender Antikörper ist zur Sensitivitätserhöhung des Tests empfehlenswert. Der Einsatz des IFN- $\gamma$ -Tests unter Feldbedingungen ist derzeit nicht möglich, da sowohl ein Grenzwert als auch ein Altersfenster für die Beprobung aufgrund der großen Schwankungen in der Immunreaktion nicht angegeben werden können. Weiterhin ist unklar, ob eine frühe IFN- $\gamma$ -Reaktion in Zusammenhang mit einer Überwindung der Infektion steht.

Die Diagnostik infizierter Tiere anhand von spezifischen Zytokinmustern ist derzeit nicht möglich.

## 8 Summary

### **Introduction of a caprine infection model for paratuberculosis, detection and characterisation of cellular and humoral immune response considering specific diagnostic questions**

Today diagnosis of paratuberculosis in early stages of infection is not reliably possible. This is due to limited understanding of the pathogenesis of infection. Sensitive and specific diagnostic methods are missing. A potential diagnostic test is the IFN- $\gamma$ -assay, but there are no specific restimulation antigens available. It is unknown if other cytokines could be used for diagnostic purposes.

In this study an internationally comparable and reliable long-time infection model using goats of the breed “Thüringer Wald Ziege” had to be introduced for studying pathogenetic questions and to develop and evaluate diagnostic tests. A reproducible mode of inoculation had to be found. Another aim of the study was to characterize the humoral und cellular immune response and to elucidate relations to shedding of bacteria and the severity of pathohistological lesions. We were especially interested in the switch from cellular to humoral immune response and whether the sensitivity of the IFN- $\gamma$ -assay could be enhanced by neutralizing IL-10. Four recombinant MAP-proteins were tested for their potential as specific restimulation antigens. Gene expression of IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  and IL-12p40 was analyzed to demonstrate cytokine profiles specific for paratuberculosis and to prove their diagnostic ability.

An infection model was chosen that fulfils international requirements. Infection rate was 96 %. Both doses of inoculation (differing about factor two) and both inoculation times (interval of 29 days during the first four weeks of life) did not result in differences of MAP-excretion, cellular and humoral immune reaction. Early inoculation with the higher dose probably caused a deficiency of thiamine in some goats. After four weeks of passive shedding, three different profiles of faecal excretion could be demonstrated: 1. continuous, 2. intermittent and 3. ceasing excretion of MAP during the observation period. The inoculation leads to a fast IFN- $\gamma$ -response, which decreased in the second part of the study. The induction of antibodies started shortly after the onset of the IFN- $\gamma$ -response and paralleled it thereafter. There was no antibody detection in three animals. The immune response was hallmarked by strong individual variability. In one goat, no infection could be retrospectively verified but detection of IFN- $\gamma$  and antibodies was possible. Animals presenting severe lesions excreted more MAP and had a stronger antibody reaction in the second half of the study. While the intensity of the IFN- $\gamma$ -response showed the same trend, the kinetics of IFN- $\gamma$  did not differ as a function of the severity of pathohistological lesions. During the first 16 weeks of the study an IL-10 induction was measured. It was dependent on age but not on inoculation. After that period IL-10-concentration did not differ between inoculated and control animals.

Even neutralisation of such small amount of IL-10 in cell culture supernatants increased IFN- $\gamma$  in the IFN- $\gamma$ -assay. The four tested recombinant MAP-proteins did not induce a specific IFN- $\gamma$ - but an unspecific IL-10 secretion due to contamination with LPS. Geneexpression between infected and control goats did only differ for IFN- $\gamma$ . A cytokine profile specific for paratuberculosis was not demonstrated.

The infection model presented here was found to be suitable to study pathogenesis of paratuberculosis and to develop and evaluate diagnostic tests. To answer questions regarding pathology that mimics field conditions an inoculation after 42 days of life should be preferred. Doses for inoculation that differ by factor two were not sufficient to show differences in immune response. High doses for inoculation induced an early IFN- $\gamma$  and antibody reaction. Under these conditions of inoculation IL-10 had no influence on the switch from cellular to humoral immune response. Severity of pathohistological lesions depended on the intensity of immune reaction and was related to the amount of excreted MAP. Because faecal shedding, antibody and IFN- $\gamma$ -reaction ran in parallel, the “classic” model of the immune response of paratuberculosis has to be questioned. It just applies for one part of infected individuals. The individual immune reaction is influenced by the ingested amount of MAP. Overcoming the infection can be possible.

The four tested recombinant MAP proteins were not suitable to be used in the IFN- $\gamma$ -assay. To enhance sensitivity of this test the use of IL-10 neutralizing antibodies had to be recommended. The IFN- $\gamma$ -assay is currently not applicable under field conditions because there is no reliable cut-off existent and the optimal age of testing is unknown due to the great variability of the immune response. It is also unclear if an early IFN- $\gamma$ -response correlates with overcoming the infection.

Diagnosis of paratuberculosis using specific cytokine profiles is currently not possible.

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbas B., Riemann H.P., Lonnerdal B., 1983. Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *Am J Vet Res.* 44, 2229-2236.
- Abendaño N., Juste R.A., Alonso-Hearn M., 2013. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: a common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res Int.* 2013:908348. doi: 10.1155/2013/908348.
- Adams J.L., Czuprynski C.J., 1994. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb P Microb Pathog.* 16, 401-411.
- Adams L.G., Khare S., Lawhon S.D., Rossetti C.A., Lewin H.A., Lipton M.S., Turse J.E., Wylie D.C., Bai Y., Drake K.L., 2011. Multi-comparative systems biology analysis reveals time-course biosignatures of in vivo bovine pathway responses to *B.melitensis*, *S.enterica* Typhimurium and *M.avium paratuberculosis*. *BMC Proc.* 2011 Jun 3;5 Suppl 4,6.
- Adkins B., Leclerc C., Marshall-Clarke S., 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 4, 553-564.
- Alexander D.C., Turenne C.Y., Behr M.A., 2009. Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol.* 191, 1018-1025.
- Alinovi C.A., Ward M.P., Lin T.L., Moore G.E., Wu C.C., 2009. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 136, 177-179.
- Allen A.J., Park K.T., Barrington G.M., Lahmers K.K., Hamilton M.J., Davis W.C., 2009. Development of a bovine ileal cannulation model to study the immune response and mechanisms of pathogenesis of paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16, 453-463.
- Allworth M.B., Kennedy D.J., 2000. Progress in national control and assurance programs for ovine Johne's disease in Australia. *Vet Microbiol.* 77, 415-422.

- Alzuherri H.M., Woodall C.J., Clarke C.J., 1996. Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 49, 331-345.
- Amon J., Titgemeyer F., Burkovski A., 2009. A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in mycobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 17, 20-29.
- Amu S., Gjertsson I., Tarkowski A., Brisslert M., 2006. B-cell CD25 expression in murine primary and secondary lymphoid tissue. *Scand J Immunol.* 64, 482-492.
- Antognoli M.C., Hirst H.L., Garry F.B., Salman M.D., 2007. Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses Public Health.* 54, 152-159.
- Arlt S., Heuwieser W., 2005. Evidence based veterinary medicine. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 112, 146-148.
- Ayele W.Y., Bartos M., Svastova P., Pavlik I., 2004. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol.* 103, 209-217.
- Ayele W.Y., Svastova P., Roubal P., Bartos M., Pavlik I., 2005. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* 71, 1210-1214.
- Azuma I., Ajisaka M., Yamamura Y., 1970. Polysaccharides of *Mycobacterium bovis* Ushi 10, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, and Atypical *Mycobacterium* P1. *Infect Immun.* 2, 347-349.
- Bainton D.F., 1981. The discovery of lysosomes. *J Cell Biol.* 91, 66-76.
- Bang B., 1906. Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berl Tierarztl Wochenschr.* 50, 759-763.
- Bannantine J.P., Stabel J.R., 2000. HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet Microbiol.* 76, 343-358.
- Bannantine J.P., Baechler E., Zhang Q., Li L., Kapur V., 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with *Mycobacterium avium* subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 40, 1303-1310.

- Bannantine J.P., Huntley J.F., Miltner E., Stabel J.R., Bermudez L.E., 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*. 149, 2061-2069.
- Bannantine J.P., Paustian M.L., Waters W.R., Stabel J.R., Palmer M.V., Li L., Kapur V., 2008a. Profiling bovine antibody responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection by using protein arrays. *Infect Immun*. 76, 739-749.
- Bannantine J.P., Waters W.R., Stabel J.R., Palmer M.V., Li L., Kapur V., Paustian M.L., 2008b. Development and use of a partial *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* protein array. *Proteomics*. 8, 463-474.
- Bannantine J.P., Rosu V., Zanetti S., Rocca S., Ahmed N., Sechi L.A., 2008c. Antigenic profiles of recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 122, 116-125.
- Bannantine J.P., Paulson A.L., Chacon O., Fenton R.J., Zinniel D.K., McVey D.S., Smith D.R., Czuprynski C.J., Barletta R.G., 2011. Immunogenicity and reactivity of novel *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PPE MAP1152 and conserved MAP1156 proteins with sera from experimentally and naturally infected animals. *Clin Vaccine Immunol*. 18, 105-112.
- Bassey E.O., Collins M.T., 1997. Study of T-lymphocyte subsets of healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Infect Immun*. 65, 4869-4872.
- Baumgartner W., Khol J.L., 2008. Paratuberculosis-potentials and limits of control programs. *Proc. XXV. Jubilee World Buiatrics Congress*, 7-10.
- Beard P.M., Daniels M.J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S., Greig A., Hutchings M.R., McKendrick I., Stevenson K., Sharp J.M., 2001a. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol*. 39, 1517-1521.
- Beard P.M., Rhind S.M., Buxton D., Daniels M.J., Henderson D., Pirie A., Rudge K., Greig A., Hutchings M.R., Stevenson K., Sharp J.M., 2001b. Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J Comp Pathol*. 124, 290-299.
- Beard P.M., Stevenson K., Pirie A., Rudge K., Buxton D., Rhind S.M., Sinclair M.C., Wildblood L.A., Jones D.G., Sharp J.M., 2001c. Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 39, 3080-3084.



- Bech-Nielsen S., Jorgensen J.B., Ahrens P., Feld N.C., 1992. Diagnostic accuracy of a Mycobacterium phlei-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J Clin Microbiol.* 30, 613-618.
- Begg D.J., Griffin J.F., 2005. Vaccination of sheep against *M. paratuberculosis*: immune parameters and protective efficacy. *Vaccine.* 23, 4999-5008.
- Begg D.J., O'Brien R., Mackintosh C.G., Griffin J.F., 2005. Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect Immun.* 73, 5603-5611.
- Begg D.J., Whittington R.J., 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet J.* 176, 129-145.
- Begg D.J., de Silva K., Di Fiore L., Taylor D.L., Bower K., Zhong L., Kawaji S., Emery D., Whittington R.J., 2010. Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 141, 301-311.
- Begg D.J., de Silva K., Carter N., Plain K.M., Purdie A., Whittington R.J., 2011. Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology.* 216, 840-846.
- Benazzi S., Berrada J., Schliesser T., 1995. First report of paratuberculosis (Johne's disease) in sheep in Morocco. *Zentralbl Veterinarmed B.* 42, 339-344.
- Bendixen P.H., 1978. Immunological reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord Vet Med.* 30, 163-168.
- Benedictus A., Mitchell R.M., Linde-Widmann M., Sweeney R., Fyock T., Schukken Y.H., Whitlock R.H., 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Prev Vet Med.* 83, 215-227.
- Benedictus G., 1984. Evaluation of the organized control of paratuberculosis in the province of Friesland. *Tijdschr Diergeneeskd.* 109, 905-916.
- Benedictus G. und Bosma J., 1985. The intravenous administration of johnin in the diagnosis of paratuberculosis in practice. *Vet Q.* 7, 139-145.
- Benedictus G., Dijkhuizen A.A., Stelwagen J., 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec.* 121, 142-146.

- Berghaus R.D., Farver T.B., Anderson R.J., Jaravata C.C., Gardner I.A., 2006. Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis on large California dairies. *J Dairy Sci.* 89, 963-970.
- Bermudez L.E., Petrofsky M., Sommer S., Barletta R.G., 2010. Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun.* 78, 3570-3577.
- Bhide M.R., Mucha R., Mikula I. Jr., Kisova L., Skrabana R., Novak M., Mikula I. Sr., 2009. Novel mutations in TLR genes cause hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection. *BMC Genet.* 10:21. doi: 10.1186/1471-2156-10-21.
- Boelaert F., Walravens K., Biront P., Vermeersch J.P., Berkvens D., Godfroid J., 2000. Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet Microbiol.* 77, 269-281.
- Bögli-Stuber K., Kohler C., Seitert G., Glanemann B., Antognoli M.C., Salman M.D., Wittenbrink M.M., Wittwer M., Wassenaar T., Jemmi T., Bissig-Choisat B., 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. *J Appl Microbiol.* 99, 587-597.
- Boonstra A., Rajsbaum R., Holman M., Marques R., Asselin-Paturel C., Pereira J.P., Bates E.E., Akira S., Vieira P., Liu Y.J., Trinchieri G., O'Garra A., 2006. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol.* 177, 7551-7558.
- Borody T.J., Leis S., Warren E.F., Surace R., 2002. Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy - approaching a cure? *Dig Liver Dis.* 34, 29-38.
- Borrmann E., Möbius P., Diller R., Köhler H., 2011. Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains of Types II and III in a standardized in vitro model. *Vet Microbiol.* 152, 101-111.
- Bosward K.L., Dhand N.K., Begg D.J., Thomson P.C., Emery D.L., Whittington R.J., 2010. Optimization of a whole blood gamma interferon assay for the detection of sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest.* 22, 210-217.

- Brady C., O'Grady D., O'Meara F., Egan J., Bassett H., 2008. Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet Rec.* 162, 147-152.
- Brennan P.J., Nikaido H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 64, 29-63.
- Brotherston J.G., Gilmour N.J.L., Samuel J.M., 1961. Quantitative studies of *Mycobacterium johneii* in the tissues of sheep. *Journal of Comparative Pathology.* 71, 286-299.
- Buergelt C.D., Hall C., McEntee K., Duncan J.R., 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet Pathol.* 15, 196-207.
- Bull T.J., McMinn E.J., Sidi-Boumedine K., Skull A., Durkin D., Neild P., Rhodes G., Pickup R., Hermon-Taylor J., 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 41, 2915-2923.
- Bull T.J., Gilbert S.C., Sridhar S., Linedale R., Dierkes N., Sidi-Boumedine K., Hermon-Taylor J., 2007. A novel multi-antigen virally vectored vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *PLoS One.* 2, e1229.
- Burrells C., Inglis N.F., Davies R.C., Sharp J.M., 1995. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies silvaticum and paratuberculosis using two defined mycobacterial antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 45, 311-320.
- Burrells C., Clarke C.J., Colston A., Kay J.M., Porter J., Little D., Sharp J.M., 1998. A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology. *Vet Immunol Immunopathol.* 66, 343-358.
- Bush R.D., Windsor P.A., Toribio J.A., 2006. Losses of adult sheep due to ovine Johne's disease in 12 infected flocks over a 3-year period. *Aust Vet J.* 84, 246-253.
- Buza J.J., Mori Y., Bari A.M., Hikono H., Aodon-geril, Hirayama S., Shu Y., Momotani E., 2003. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection causes suppression of RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and tumor necrosis factor alpha expression in peripheral blood of experimentally infected cattle. *Infect Immun.* 71, 7223-7227.

- Buza J.J., Hikono H., Mori Y., Nagata R., Hirayama S., Aodon-geril, Bari A.M., Shu Y., Tsuji N.M., Momotani E., 2004. Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect Immun.* 72, 2425-2428.
- Carlens O., 1928. Studien über das lymphatische Gewebe des Darmkanals bei einigen Haustieren, mit besonderer Berücksichtigung der embryonalen Entwicklung, der Mengenverhältnisse und der Altersinvolution dieses Gewebes im Dünndarm des Rindes. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 86, 393-493.
- Carrigan M.J., Seaman J.T., 1990. The pathology of Johne's disease in sheep. *Aust Vet J.* 67, 47-50.
- Chacon O., Bermudez L.E., Barletta R.G., 2004. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol.* 58, 329-363.
- Challans J.A., Stevenson K., Reid H.W., Sharp J.M., 1994. A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from clinical specimens. *Vet Rec.* 134, 95-96.
- Chandler R.L., 1961. Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. IV. Comparative susceptibility to infection of C.57, C.B.A and Swiss white mice. *J Comp Pathol.* 71, 233-242.
- Chi J., VanLeeuwen J.A., Weersink A., Keefe G.P., 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med.* 55, 137-153.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S., 1984a. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol.* 20, 966-971.
- Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S., 1984b. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* 74, 218-262.
- Chiodini R.J., Hermon-Taylor J., 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J Vet Diagn Invest.* 5, 629-631.

- Chiodini R.J., 1996. Immunology: resistance to paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12, 313-343.
- Christopher-Hennings J., Dammen M.A., Weeks S.R., Epperson W.B., Singh S.N., Steinlicht G.L., Fang Y., Skaare J.L., Larsen J.L., Payeur J.B., Nelson E.A., 2003. Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine feces. *J Vet Diagn Invest.* 15, 87-93.
- Chui L.W., King R., Sim J., 2010. Development of an immunocapture-polymerase chain reaction assay using IgY to detect *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Can J Vet Res.* 74, 102-107.
- Clark D.L. Jr, Koziczkowski J.J., Radcliff R.P., Carlson R.A., Ellingson J.L., 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *J Dairy Sci.* 91, 2620-2627.
- Clarke C.J., Little D., 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J Comp Pathol.* 114, 419-437.
- Clarke C.J., 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol.* 116, 217-261.
- Cocito C., Gilot P., Coene M., de Kesel M., Poupart P., Vannuffel P., 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev.* 7, 328-345.
- Collins D.M., Stephens D.M., de Lisle G.W., 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol.* 36, 289-299.
- Collins M.T., Kenefick K.B., Sockett D.C., Lambrecht R.S., McDonald J., Jorgensen J.B., 1990. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens. *J Clin Microbiol.* 28, 2514-2519.
- Collins M.T., 1994. Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 204, 208-210.

- Collins M.T., Zhao B.Y., 1995. Comparison of the commercial serum antibody ELISA, gamma interferon test kit and radiometric faecal culture for early diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected Holstein calves. In: Chiodini R.J., Collins M.T., Bassey E.O.E. (ed.). Proc. 4th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, United Kingdom, 67-76.
- Collins M.T., 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12, 357-371.
- Collins P., Matthews P.R., McDiarmid A., Brown A., 1983. The pathogenicity of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria for experimental animals. *J Med Microbiol.* 16, 27-35.
- Corn J.L., Manning E.J., Sreevatsan S., Fischer J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6963-6967.
- Corpa J.M., Garrido J., García Marín J.F., Pérez V., 2000. Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol.* 122, 255-265.
- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180, 5771-5777.
- Cousins D.V., Evans R.J., Francis B.R., 1995. Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. *Aust Vet J.* 72, 458-462.
- Cousins D.V., Whittington R., Marsh I., Masters A., Evans R.J., Kluver P., 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes.* 13, 431-442.
- Coussens P.M., 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev.* 2, 141-161.
- Coussens P.M., 2004. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle. *Infect Immun.* 72, 3089-3096.
- Coussens P.M., Jeffers A., Colvin C., 2004. Rapid and transient activation of gene expression in peripheral blood mononuclear cells from Johne's disease positive cows exposed to *Mycobacterium paratuberculosis* in vitro. *Microb Pathog.* 36, 93-108.

- Coussens P.M., Verman N., Coussens M.A., Elftman M.D., McNulty A.M., 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.* 72, 1409-1422.
- Cox J.C., Drane D.P., Jones S.L., Ridge S., Milner A.R., 1991. Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J.* 68, 157-160.
- Cranwell M.P., 1993. Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. *Vet Rec.* 133, 219-220.
- Dalziel D.K., 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br Med J.* 2, 1068-1070.
- Dargatz D.A., Byrum B.A., Barber L.K., Sweeney R.W., Whitlock R.H., Shulaw W.P., Jacobson R.H., Stabel J.R., 2001. Evaluation of a commercial ELISA for diagnosis of paratuberculosis in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 218, 1163-1166.
- Dargatz D.A., Byrum B.A., Collins M.T., Goyal S.M., Hietala S.K., Jacobson R.H., Koprak C.A., Martin B.M., McCluskey B.J., Tewari D., 2004. A multilaboratory evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay test for the detection of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 16, 509-514.
- de Almeida D.E., Colvin C.J., Coussens P.M., 2008. Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 125, 234-245.
- de Juan L., Mateos A., Domínguez L., Sharp J.M., Stevenson K., 2005. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 106, 249-257.
- de Lisle G.W., Seguin P., Samagh B.S., Corner A.H., Duncan J.R., 1980. Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests. *Can J Comp Med.* 44, 177-182.
- de Lisle G.W., Milestone B.A., 1989. The economic impact of Johne's disease in New Zealand. In: *Johne's Disease, Current Trends in Research Diagnosis and Management.* Victoria, Australia, CSIRO, 41-45.
- de Lisle G.W., Cannon M.C., Yates G.F., Collins D.M., 2006. Use of a polymerase chain reaction to subtype *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, an increasingly important pathogen from farmed deer in New Zealand. *N Z Vet J.* 54, 195-197.

- de Lisle G.W. 2010. Ruminant Aspects of Paratuberculosis Vaccination. In: Behr M.A. und Collins D.M.. Paratuberculosis, Kapitel 29, 344-352.
- de Silva K., Begg D., Whittington R., 2011. The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 139, 10-16.
- Delgado L., Juste R.A., Muñoz M., Morales S., Benavides J., Ferreras M.C., Marín J.F., Pérez V., 2012. Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 145, 23-31.
- Dellabona P., Peccoud J., Kappler J., Marrack P., Benoist C., Mathis D., 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell.* 62, 1115-1121.
- Denis M., Wedlock D.N., McCarthy A.R., Parlane N.A., Cockle P.J., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Buddle B.M., 2007. Enhancement of the sensitivity of the whole-blood gamma interferon assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infections in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 14, 1483-1489.
- Dennis M.M., Antognoli M.C., Garry F.B., Hirst H.L., Lombard J.E., Gould D.H., Salman M.D., 2008. Association of severity of enteric granulomatous inflammation with disseminated *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection and antemortem test results for paratuberculosis in dairy cows. *Vet Microbiol.* 131, 154-163.
- Deutz A., Spergser J., Wagner P., Rosengarten R., Köfer J., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in wild animal species and cattle in Styria/Austria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 118, 314-320.
- Donat K., Schau U., Soschinka A., 2011. Identification of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infected dairy herds by environmental sampling. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124, 360-367.
- Donat K., Soschinka A., Erhardt G., Brandt H.R., 2014a. Paratuberculosis: decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis depends on within-herd prevalence. *Animal.* 8, 852-858.
- Donat K., Schlotter K., Erhardt G., Brandt H.R., 2014b. Prevalence of paratuberculosis in cattle and control measures within the herd influence the performance of ELISA tests. *Vet Rec.* 174, 119. doi: 10.1136/vr.101533.



- Donat K., Erhardt G., Soschinka A., Brandt H.R., 2014c. Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. *Vet Rec.* 174, 408. doi: 10.1136/vr.101957.
- Douarre P.E., Cashman W., Buckley J., Coffey A., O'Mahony J.M., 2010. Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods. *Gut Pathog.* 2, 11. doi: 10.1186/1757-4749-2-11.
- Dufour B., Pouillot R., Durand B., 2004. A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet Res.* 35, 69-81.
- Dzieciol M., Volgger P., Khol J., Baumgartner W., Wagner M., Hein I., 2010. A novel real-time PCR assay for specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk with the inherent possibility of differentiation between viable and dead cells. *BMC Res Notes.* 3:251. doi: 10.1186/1756-0500-3-251.
- Eamens G.J., Whittington R.J., Marsh I.B., Turner M.J., Saunders V., Kemsley P.D., Rayward D., 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. *Vet Microbiol.* 77, 357-367.
- Eamens G.J., Whittington R.J., Turner M.J., Austin S.L., Fell S.A., Marsh I.B., 2007. Evaluation of radiometric faecal culture and direct PCR on pooled faeces for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol.* 125, 22-35.
- EG-Öko-Basisverordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91, ABl. Nr. L 189 vom 20.07.2007, S. 1, Art. 14, Abs. 1a) Satz i.
- Eisenberg S.W., Koets A.P., Nielen M., Heederik D., Mortier R., De Buck J., Orsel K., 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res.*;42:117. doi: 10.1186/1297-9716-42-117.
- Ekino S., Nawa Y., Tanaka K., Matsuno K., Fujii H., Kotani M., 1980. Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 58, 289-296.

- Ellingson J.L., Bolin C.A., Stabel J.R., 1998. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of *paratuberculosis*. *Mol Cell Probes*. 12, 133-142.
- Elze J., 2009. Nachweis von *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* bei Schlachtrindern. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Englund S., Ballagi-Pordány A., Bölske G., Johansson K.E., 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 33, 163-171.
- Englund S., Bölske G., Johansson K.E., 2002. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 209, 267-271.
- Erume J., Spergser J., Rosengarten R., 2001. Rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from cattle and zoo animals by nested PCR. *Afr Health Sci*. 1, 83-89.
- Falconi C., Oleaga Á., 2010. Prevalence of antibodies against selected agents shared between Cantabrian chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) and domestic goats. *Eur J Wildl Res*. 56, 319-325.
- Fecteau M.E., Whitlock R.H., 2011. Treatment and chemoprophylaxis for *paratuberculosis*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 27, 547-557.
- Ferreira R., Fonseca L.S., Lilenbaum W., 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine *paratuberculosis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 35, 173-175.
- Fischer O., Mátlová L., Dvorská L., Svástová P., Bartl J., Melichárek I., Weston R.T., Pavlík I., 2001. Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Med Vet Entomol*. 15, 208-211.
- Fischer O.A., Matlova L., Bartl J., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Melicharek I., Bartos M., Pavlik I., 2003. Earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. *Vet Microbiol*. 91, 325-338.
- Fischer O.A., Matlova L., Dvorska L., Svastova P., Bartos M., Weston R.T., Kopečna M., Trcka I., Pavlik I., 2005. Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. *Med Vet Entomol*. 19, 360-366.

- Florou M., Leontides L., Kostoulas P., Billinis C., Sofia M., Kyriazakis I., Lykotrafitis F., 2008. Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. *Epidemiol Infect.* 136, 644-652.
- Fridriksdottir V., Gunnarsson E., Sigurdarson S., Gudmundsdottir K.B., 2000. Paratuberculosis in Iceland: epidemiology and control measures, past and present. *Vet Microbiol.* 77, 263-267.
- Fritsch I., Luyven G., Köhler H., Lutz W., Möbius P., 2012. Suspicion of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis transmission between cattle and wild-living red deer (*Cervus elaphus*) by multitarget genotyping. *Appl Environ Microbiol.* 78, 1132-1139.
- Fry M.P., Kruze J., Collins M.T., 2008. Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. *J Vet Diagn Invest.* 20, 329-332.
- Gasteiner J., Awad-Masalmeh M., Baumgartner W., 2000. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet Microbiol.* 77, 339-349.
- Gay J.M., Sherman D.M., 1992. Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. *Vet Med.* 87, 1133-1139.
- Gezon H.M., Bither H.D., Gibbs H.C., Acker E.J., Hanson L.A., Thompson J.K., Jorgenson R.D., 1988. Identification and control of paratuberculosis in a large goat herd. *Am J Vet Res.* 49, 1817-1823.
- Gierke F., 2009. Ermittlung von Einflussfaktoren auf die intra vitam Diagnostik der Paratuberkulose. Berlin, Freie Universität, Diss.
- Gierke F., Köhler H., 2009. Tenazität, Ausscheidung und Übertragungswege des Paratuberkuloseerregers – Konsequenzen für die Bekämpfung der Paratuberkulose in Rinderbeständen. *Prakt Tierarzt.* 90, 1169-1178.
- Gierke F., Seidler T., Ziller M., Köhler H., 2009. Evaluation der Impfung gegen Paratuberkulose beim Rind als Bekämpfungsmaßnahme. [https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar\\_mods\\_00013483](https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar_mods_00013483).
- Gillan S., O'Brien R., Hughes A.D., Griffin J.F., 2010. Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 17, 108-117.

- Gioffré A., Echeverría-Valencia G., Zumárraga M., Morsella C., Mon M.L., Viale M., Paolicchi F., Romano M.I., 2012. Production and evaluation of a purified protein derivative from an Argentine strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Rev Argent Microbiol.* 44, 155-164.
- Gollnick N.S., Mitchell R.M., Baumgart M., Janagama H.K., Sreevatsan S., Schukken Y.H., 2007. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine monocyte-derived macrophages is not affected by host infection status but depends on the infecting bacterial genotype. *Vet Immunol Immunopathol.* 120, 93-105.
- Gonda M.G., Chang Y.M., Shook G.E., Collins M.T., Kirkpatrick B.W., 2007. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Prev Vet Med.* 80, 103-119.
- González J., Geijo M.V., García-Pariente C., Verna A., Corpa J.M., Reyes L.E., Ferreras M.C., Juste R.A., García Marín J.F., Pérez V., 2005. Histopathological classification of lesions associated with natural *paratuberculosis* infection in cattle. *J Comp Pathol.* 133, 184-196.
- Good M., Clegg T., Sheridan H., Yearsely D., O'Brien T., Egan J., Mullaney P., 2009. Prevalence and distribution of *paratuberculosis* (Johne's disease) in cattle herds in Ireland. *Ir Vet J.* 62, 597-606.
- Grant I.R., BaMachackova Ml H.J., Rowe M.T., 1998. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett Appl Microbiol.* 26, 166-170.
- Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T., 1999. Effect of higher pasteurization temperatures, and longer holding times at 72 degrees C, on the inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Lett Appl Microbiol.* 28, 461-465.
- Grant I.R., 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J Appl Microbiol.* 98, 1282-1293.
- Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D., 2005. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl Environ Microbiol.* 71, 2853-2861.
- Green E.P., Tizard M.L., Moss M.T., Thompson J., Winterbourne D.J., McFadden J.J., Hermon-Taylor J., 1989. Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17, 9063-9073.

- Greig A., Stevenson K., Henderson D., Perez V., Hughes V., Pavlik I., Hines M.E. 2nd, McKendrick I., Sharp J.M., 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *J Clin Microbiol.* 37, 1746-1751.
- Grewal S.K., Rajeev S., Sreevatsan S., Michel F.C. Jr., 2006. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure. *Appl Environ Microbiol.* 72, 565-574.
- Griffin J.F., 2007. Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis. *N Z Vet J.* 55, 23-29.
- Groenendaal H., Galligan D.T., 2003. Economic consequences of control programs for paratuberculosis in midsize dairy farms in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 223, 1757-1763.
- Guerrero C., Bernasconi C., Burki D., Bodmer T., Telenti A., 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol.* 33, 304-307.
- Gumber S., Eamens G., Whittington R.J., 2006. Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without *Mycobacterium paratuberculosis* infection. *Vet Microbiol.* 115, 91-101.
- Gumber S., Whittington R.J., 2009. Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis following exposure to heat. *Vet Microbiol.* 136, 82-90.
- Gumber S., Taylor D.L., Whittington R.J., 2009a. Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Vet Microbiol.* 137, 290-296.
- Gumber S., Taylor D.L., Marsh I.B., Whittington R.J., 2009b. Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol.* 133, 344-357.
- Gwozdz J.M., Thompson K.G., Manktelow B.W., Murray A., West D.M., 2000a. Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78, 560-566.

- Gwozdz J.M., Thompson K.G., Murray A., Reichel M.P., Manktelow B.W., West D.M., 2000b. Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Aust Vet J.* 78, 779-783.
- Gwozdz J.M., Thompson K.G., 2002. Antigen-induced production of interferon-gamma in samples of peripheral lymph nodes from sheep experimentally inoculated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 84, 243-252.
- Hagan W.A., 1938. Age as a factor in susceptibility to Johne's disease. *Cornell Veterinarian.* 28, 34-40.
- Hamilton H.L., Cooley A.J., Adams J.L., Czuprynski C.J., *Mycobacterium paratuberculosis* monoassociated nude mice as a paratuberculosis model. *Vet Pathol.* 28, 146-155.
- Hammer P., Kiesner C., Walte H.G., Knappstein K., Teufel P., 2003. Heat resistance of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.* 54, 275-303.
- Harding H.P., 1957. Experimental infection with *Mycobacterium johnei* II. The histopathology of infection in experimental goats. *J Comp Pathol.* 67, 37-52.
- Hasanova L., Pavlik I., 2006. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet Med-Czech.* 51, 193-211.
- Hasvold H.J., Valheim M., Berntsen G., Storset A.K., 2002. In vitro responses to purified protein derivate of caprine T lymphocytes following vaccination with live strains of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 90, 79-89.
- He Z., De Buck J., 2010. Localization of proteins in the cell wall of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 by proteomic analysis. *Proteome Sci.* 21. doi: 10.1186/1477-5956-8-21.
- Heegaard P.M.H., Müller K., 1988. Lectins and the Immune system. *Eos Rivista Di Immunologica Et Immunofarmacologica.* 8, 239-247.
- Hendrick S.H., Kelton D.F., Leslie K.E., Lissemore K.D., Archambault M., Duffield T.F., 2005a. Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* 227, 1302-1308.

- Hendrick S.H., Duffield T.E., Kelton D.E., Leslie K.E., Lissemore K.D., Archambault M., 2005b. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays performed on milk and serum samples for detection of paratuberculosis in lactating dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 226, 424-428.
- Herbert C.N., Doyle T.M., Paterson A.B., 1959. Tuberculin sensitivity in attested cattle vaccinated against Johne's disease. *Vet Rec.* 71, 108-111.
- Hermann L., 1998. Mycobacterium paratuberculosis and milk. *IFST.* 98, 19-28.
- Herrmann T., Baschieri S., Lees R.K., MacDonald H.R., 1992. In vivo responses of CD4+ and CD8+ cells to bacterial superantigens. *Eur J Immunol.* 22, 1935-1938.
- Hesse N., Krutzinna C., Rahmann G., 2002. Milchziegen auf Biobetrieben in Deutschland. *Ökologie & Landbau.* 124, 30-31.
- Heuer C., Verdugo C., Price-Carter M., Collins D., French N.P., Wilson P.R., 2012. Epidemiological Interferences from typing Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) isolates from mixed sheep, deer and cattle farms. In: Nielsen S.S. (ed.) *Proc. 11th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis, Sydney, Australia,* 250.
- Hines M.E. 2nd, Stabel J.R., Sweeney R.W., Griffin F., Talaat A.M., Bakker D., Benedictus G., Davis W.C., de Lisle G.W., Gardner I.A., Juste R.A., Kapur V., Koets A., McNair J., Pruitt G., Whitlock R.H., 2007a. Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet Microbiol.* 122, 197-222.
- Hines M.E. 2nd, Stiver S., Giri D., Whittington L., Watson C., Johnson J., Musgrove J., Pence M., Hurley D., Baldwin C., Gardner I.A., Aly S., 2007b. Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in experimentally-challenged baby goats. *Vet Microbiol.* 120, 261-283.
- Hines S.A., Buergelt C.D., Wilson J.H., Bliss E.L., 1987. Disseminated Mycobacterium paratuberculosis infection in a cow. *J Am Vet Med Assoc.* 190, 681-683.
- Hirsch A., 1956. Infection of hamsters and rabbits with Mycobacterium johnei. *J Comp Pathol.* 66, 260-269.
- Holmström A., Stenlund S., 2005. Control of paratuberculosis in live cattle and semen imported to Sweden 1995-2004. *Proc. 8th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark,* 74.

- Holstad G., Sigurdardóttir O.G., Storset A.K., Tharaldsen J., Nyberg O., Schönheit J., Djønne B., 2005. Description of the infection status in a Norwegian cattle herd naturally infected by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Acta Vet Scand.* 46, 45-56.
- Hostetter J., Steadham E., Haynes J., Bailey T., Cheville N., 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 26, 269-283.
- Hostetter J., Kagan R., Steadham E., 2005. Opsonization effects on *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* - macrophage interactions. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 793-796.
- Hostetter J.M., Steadham E.M., Haynes J.S., Bailey T.B., Cheville N.F., 2002. Cytokine effects on maturation of the phagosomes containing *Mycobacteria avium* subspecies *paratuberculosis* in J774 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 34, 127-134.
- Hu X., Paik P.K., Chen J., Yarilina A., Kockeritz L., Lu T.T., Woodgett J.R., Ivashkiv L.B., 2006. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity.* 24, 563-574.
- Huda A., Jensen H.E., 2003. Comparison of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine *paratuberculosis*. *J Comp Pathol.* 129, 259-267.
- Huda A., Lind P., Christoffersen A.B., Jungersen G., 2003. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical *paratuberculosis* in Danish cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 94, 95-103.
- Huda A., Jungersen G., Lind P., 2004. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 104, 43-53.
- Huntley J.F., Whitlock R.H., Bannantine J.P., Stabel J.R., 2005. Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American bison. *Vet Pathol.* 42, 42-51.
- Ikonomopoulos J., Balaskas C., Kantzoura B., Fragiadaki E., Pavlik I., Bartos M., Lukas J.C., Gazouli M., 2007. Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture. *Vet J.* 174, 337-343.



- Inglis G.D., Kalischuk L.D., 2003. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 69, 3435-3447.
- Jahraus A., Tjelle T.E., Berg T., Habermann A., Storrie B., Ullrich O., Griffiths G., 1998. In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. *J Biol Chem.* 273, 30379-30390.
- Janagama H.K., Jeong Ki., Kapur V., Coussens P., Sreevatsan S., 2006. Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis strains. *BMC Microbiol.* 14, 6-10.
- Jark U., Ringena I., Franz B., Gerlach G.F., Beyerbach M., Franz B., 1997. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 57, 189-198.
- Jarlier V., Nikaido H., 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.* 123, 11-18.
- Johansen K.A., Hugen E.E., Payeur J.B., 2006. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the presence of hexadecylpyridinium chloride, natamycin, and vancomycin. *J Food Prot.* 69, 878-883.
- Johne A., Frothingham L., 1895. Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. *Dtsch Z für Thiermed Vgl Pathol.* 21, 438-455.
- Johnson-Ifearulundu Y.J., Kaneene J.B., Sprecher D.J., Gardiner J.C., Lloyd J.W., 2000. The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. *Prev Vet Med.* 46, 171-181.
- Jolly A., Colavecchia S.B., Fernández B., Fernández E., Mundo S.L., 2011. Antibodies Induced by Lipoarabinomannan in Bovines: Characterization and Effects on the Interaction between *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis and Macrophages In Vitro. *Vet Med Int.* 258479. doi: 10.4061/2011/258479.
- Jones D.G., Kay J.M., 1996. Serum biochemistry and the diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in sheep. *Vet Rec.* 139, 498-499.
- Jørgensen J.B., 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med.* 29, 267-270.
- Jørgensen J.B., 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet Scand.* 23, 325-335.

- Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Allcroft D.J., Hutchings M.R., 2005. Clustering of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits and the environment: how hot is a hot spot? *Appl Environ Microbiol.* 71, 6033-6038.
- Judge J., Kyriazakis I., Greig A., Davidson R.S., Hutchings M.R., 2006. Routes of intraspecies transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): a field study. *Appl Environ Microbiol.* 72, 398-403.
- Jungersen G., Huda A., Hansen J.J., Lind P., 2002. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 453-460.
- Jungersen G., Grell S.N., Clemensen A., Roust T., Howard C.J., 2005. Interleukin-12 potentiation of the interferon-gamma test rescues day-old blood samples for diagnosis of paratuberculosis PPD specific cellular mediated immune responses. In: Manning E.J.B., Nielssen S.S. (ed.) *Proc. 8th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis*, Copenhagen, Denmark, 93.
- Juste R.A., García Marín J.F., Peris B., Sáez de Ocáriz C.S., Badiola J.J., 1994. Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol.* 110, 185-194.
- Juste R.A., Alonso-Hearn M., Molina E., Geijo M., Vazquez P., Sevilla I.A., Garrido J.M., 2009. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res Notes.* 2:233. doi: 10.1186/1756-0500-2-233.
- Kabara E., Kloss C.C., Wilson M., Tempelman R.J., Sreevatsan S., Janagama H., Coussens P.M., 2010. A large-scale study of differential gene expression in monocyte-derived macrophages infected with several strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Brief Funct Genomics.* 9, 220-237.
- Kalis C.H., Hesselink J.W., Russchen E.W., Barkema H.W., Collins M.T., Visser I.J., 1999. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest.* 11, 345-351.
- Kalis C.H., Hesselink J.W., Barkema H.W., Collins M.T., 2001. Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy herds. *Am J Vet Res.* 62, 270-274.

- Kalis C.H., Collins M.T., Hesselink J.W., Barkema H.W., 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet Microbiol.* 97, 73-86.
- Kappler J.W., Pullen A., Callahan J., Choi Y., Herman A., White J., Potts W., Wakeland E., Marrack P., 1989. Consequences of self and foreign superantigen interaction with specific V beta elements of the murine TCR alpha beta. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 54, 401-407.
- Katayama N., Tanaka C., Fujita T., Saitou Y., Suzuki S., Onouchi E., 2000. Effect of ensilage on inactivation of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Grass Sci.* 46, 282-288.
- Kathaperumal K., Kumanan V., McDonough S., Chen L.H., Park S.U., Moreira M.A., Akey B., Huntley J., Chang C.F., Chang Y.F., 2009. Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine.* 27, 123-135.
- Kennedy D., Citer L., 2010. Paratuberculosis control measures in Australia. In: Behr M.A. und Collins D.M.. *Paratuberculosis*, Kapitel 28, 330-341.
- Khalifeh M.S., Stabel J.R., 2004. Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 99, 39-46.
- Khare S., Ficht T.A., Santos R.L., Romano J., Ficht A.R., Zhang S., Grant I.R., Libal M., Hunter D., Adams L.G., 2004. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42, 1075-1081.
- Khare S., Adams L.G., Osterstock J., Roussel A., David L., 2008. Effects of shipping and storage conditions of fecal samples on viability of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 46, 1561-1562.
- Khare S., Nunes J.S., Figueiredo J.F., Lawhon S.D., Rossetti C.A., Gull T., Rice-Ficht A.C., Adams L.G., 2009. Early phase morphological lesions and transcriptional responses of bovine ileum infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 46, 717-728.

- Khol J.L., Damoser J., Dünser M., Baumgartner W., 2007. Paratuberculosis, a notifiable disease in Austria - current status, compulsory measures and first experiences. *Prev Vet Med.* 82, 302-307.
- Khol J.L., Duenser M., Damoser J., Baumgartner W., 2009. A new approach in the compulsory fight against paratuberculosis – eradication of clinical cases. In: Nielsen SS (ed.) *Proc. 9th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis*, Madison, Wisconsin, 297-299.
- Khol J.L., Geisbauer E., Wassertheurer M., Revilla-Fernández S., Damoser J., Österreicher E., Dünser M., Kleb U., Baumgartner W., 2012. Outcome of three commercial serum ELISAs and faecal detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in consecutive samples from a cattle herd with low prevalence of paratuberculosis (Johne's disease). *Transbound Emerg Dis.* 59, 197-207.
- Kim S.G., Shin S.J., Jacobson R.H., Miller L.J., Harpending P.R., Stehman S.M., Rossiter C.A., Lein D.A., 2002. Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest.* 14, 126-131.
- Kim Y.G., Bech-Nielsen S., Gordon J.C., Slemmons R.D., Spangler E., 1989. Comparison of two methods for isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples. *Am J Vet Res.* 50, 1110-1113.
- Kirchner H. 1994. *Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems.* Heidelberg-Berlin, Oxford: Spektrum Akad Verl. 1. korrigierte Nachdruck 1994.
- Klausen J., Huda A., Ekeröth L., Ahrens P., 2003. Evaluation of serum and milk ELISAs for paratuberculosis in Danish dairy cattle. *Prev Vet Med.* 58, 171-178.
- Klawonn W., Cussler K., Dräger K.G., Gyra H., Köhler H., Zimmer K., Hess R.G., 2002. The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 109, 510-516.
- Koets A., Rutten V., Hoek A., van Mil F., Müller K., Bakker D., Gruys E., van Eden W., 2002. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function. *Infect Immun.* 70, 3856-3864.

- Koets A.P., Rutten V.P., Hoek A., Bakker D., van Zijderveld F., Müller K.E., van Eden W., 1999. Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 70, 105-115.
- Koets A.P., Adugna G., Janss L.L., van Weering H.J., Kalis C.H., Wentink G.H., Rutten V.P., Schukken Y.H., 2000. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 83, 2702-2708.
- Köhler H., Gyra H., Zimmer K., Dräger K.G., Burkert B., Lemser B., Hausleithner D., Cubler K., Klawonn W., Hess R.G., 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 48, 185-195.
- Köhler H., Burkert B., Pavlik I., Diller R., Geue L., Conraths F.J., Martin G., 2008. Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine serum. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 121, 203-210.
- Koo H.C., Park Y.H., Hamilton M.J., Barrington G.M., Davies C.J., Kim J.B., Dahl J.L., Waters W.R., Davis W.C., 2004. Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected calves. *Infect Immun.* 72, 6870-6883.
- Kopecky K.E., Booth G.D., Merkal R.S., Larsen A.B., 1971. Hematologic changes associated with intravenous Johnin testing in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 32, 1343-1347.
- Körmendy B., 1988. Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculins in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Acta Vet Hung.* 36, 177-183.
- Körmendy B., Kopál T., Bálint T., Szilágyi M., Béki L., 1989. Economic losses caused by paratuberculosis in a dairy herd: case report. *Acta Vet Hung.* 37, 45-53.
- Körmendy B., 1990. Paratuberculosis in a cattle herd: comparison of allergic, serologic and faecal microscopic tests. *Acta Microbiol Hung.* 37, 219-222.
- Korou L.M., Liandris E., Gazouli M., Ikonopoulou J., 2010. Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 144, 353-358.

- Kostoulas P., Leontides L., Billinis C., Amiridis G.S., Florou M., 2006. The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Prev Vet Med.* 74, 226-238.
- Krüger C., Köhler H., Liebler-Tenorio E.M., 2015. Sequential development of lesions 3, 6, 9, and 12 months after experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 52, 276-290.
- Kruip T.A., Muskens J., van Roermund H.J., Bakker D., Stockhofe-Zurwieden N., 2003. Lack of association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with oocytes and embryos from moderate shedders of the pathogen. *Theriogenology.* 59, 1651-1660.
- Kruze J., Salgado M., Paredes E., Mella A., Collins M.T., 2006. Goat paratuberculosis in Chile: first isolation and confirmation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in a dairy goat. *J Vet Diagn Invest.* 18, 476-479.
- Kuehnelt M.P., Goethe R., Habermann A., Mueller E., Rohde M., Griffiths G., Valentin-Weigand P., 2001. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol.* 3, 551-566.
- Kumar S., 2006. Diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol.* 116, 129-137.
- Kumar S., Singh S.V., Sevilla I., Singh A.V., Whittington R.J., Juste R.A., Sharma G., Singh P.K., Sohal J.S., 2008. Lacto-incidence and evaluation of 3 tests for the diagnosis of Johne's disease using milk of naturally infected goatherds and genotyping of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Small Ruminant Res.* 74, 37-44.
- Küpper J., Brandt H., Donat K., Erhardt G., 2012. Heritability estimates for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* status of German Holstein cows tested by fecal culture. *J Dairy Sci.* 95, 2734-2739.
- Kuo C.J., Bell H., Hsieh C.L., Ptak C.P., Chang Y.F., 2012. Novel mycobacteria antigen 85 complex binding motif on fibronectin. *J Biol Chem.* 287, 1892-1902.
- Kurade N.P., Tripathi B.N., Rajukumar K., Parihar N.S., 2004. Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 41, 378-387.

- Labò M., Gusberti L., Rossi E.D., Speziale P., Riccardi G., 1998. Determination of a 15437 bp nucleotide sequence around the inhA gene of *Mycobacterium avium* and similarity analysis of the products of putative ORFs. *Microbiology*. 144, 807-814.
- Lacroix-Lamandé S., Rochereau N., Mancassola R., Barrier M., Clauzon A., Laurent F., 2009. Neonate intestinal immune response to CpG oligodeoxynucleotide stimulation. *PLoS One*. 4(12):e8291. doi: 10.1371/journal.pone.0008291.
- Lambeth C., Reddacliff L.A., Windsor P., Abbott K.A., McGregor H., Whittington R.J., 2004. Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in sheep. *Aust Vet J*. 82, 504-508.
- Lambrecht R.S., Carriere J.F., Collins M.T., 1988. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*. 54, 910-916.
- Landsverk T., Halleraker M., Aleksandersen M., McClure S., Hein W., Nicander L., 1991. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. *Vet Immunol Immunopathol*. 28, 1-16.
- Langelaar M.F., Weber C.N., Overdijk M.B., Müller K.E., Koets A.P., Rutten V.P., 2005. Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (M.a.p.), *Escherichia coli* (E. coli) or recombinant M.a.p. heat shock protein 70. *Vet Immunol Immunopathol*. 107, 153-161.
- Lardner A., 2001. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol*. 69, 522-530.
- Larsen A.B., Merkal R.S., Vardaman T.H., 1956. Survival time of *Mycobacterium* paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 17, 549-551.
- Larsen A.B., Kopecky K.E., 1965. Studies on the intravenous administration of Johnin to diagnose Johne's disease. *Am. J. Vet. Res*. 26, 673-675.
- Larsen A.B., Moon H.W., 1971. Experimental *Mycobacterium* paratuberculosis Infection in Chickens. *Am J Vet Res*. 33, 1231-1235.
- Larsen A.B., Merkal R.S., Cutlip R.C., 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium* paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 36, 255-257.
- Larsen A.B., Miller J.M., 1979. Susceptibility of the lemming (*Dicrostonyx rubricatus*) to *Mycobacterium* paratuberculosis. *Am J Vet Res*. 40, 1657-1658.

- Larsen A.B., Stalheim O.H., Hughes D.E., Appell L.H., Richards W.D., Himes E.M., 1981. Mycobacterium paratuberculosis in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J Am Vet Med Assoc. 179, 169-171.
- Larsen H., Vardaman T.H., Merkal R.S., 1963. An extended study of a herd of cattle naturally infected with Johne's disease. I. The significance of the intradermic Johnin test. Am J Vet Res. 24, 91-93.
- Lawrence W.E., 1956. Congenital Infection with Mycobacterium johnei in Cattle. Vet Rec. 68, 312-314.
- Lee J.S., Shin S.J., Collins M.T., Jung I.D., Jeong Y.I., Lee C.M., Shin Y.K., Kim D., Park Y.M., 2009. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein activates dendritic cells and induces a Th1 polarization. Infect Immun. 77, 2979-2988.
- Lehtola M.J., Torvinen E., Miettinen I.T., Keevil C.W., 2006. Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in potable-water biofilms. Appl Environ Microbiol. 72, 848-853.
- Lei L., Hostetter J.M., 2007. Limited phenotypic and functional maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells following Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in vitro. Vet Immunol Immunopathol. 120, 177-186.
- Lepper A.W., Wilks C.R., 1988. Intracellular iron storage and the pathogenesis of paratuberculosis. Comparative studies with other mycobacterial, parasitic or infectious conditions of veterinary importance. J Comp Pathol. 98, 31-53.
- Leroy B., Viart S., Trincherio N., Roupie V., Govaerts M., Letesson J.J., Huygen K., Wattiez R., 2009. Use of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis specific coding sequences for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. Vet Microbiol. 135, 313-319.
- Li L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A., May B.J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S., Kapur V., 2005. The complete genome sequence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 102, 12344-12349.
- Li L., Munir S., Bannantine J.P., Sreevatsan S., Kanjilal S., Kapur V., 2007. Rapid expression of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis recombinant proteins for antigen discovery. Clin Vaccine Immunol. 14, 102-105.



- Liapi M., Leontides L., Kostoulas P., Botsaris G., Iacovou Y., Rees C., Georgiou K., Smith G.C., Naseby D.C., 2011. Bayesian estimation of the true prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in Cypriot dairy sheep and goat flocks. *Small Ruminant Res.* 95, 174-178.
- Little D., Alzuherri H.M., Clarke C.J., 1996. Phenotypic characterisation of intestinal lymphocytes in ovine paratuberculosis by immunohistochemistry. *Vet Immunol Immunopathol.* 55, 175-187.
- Lombard J.E., Garry F.B., McCluskey B.J., Wagner B.A., 2005. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 227, 1975-1981.
- Lombard J.E., Wagner B.A., Smith R.L., McCluskey B.J., Harris B.N., Payeur J.B., Garry F.B., Salman M.D., 2006. Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis distribution and herd infection status on US dairy operations. *J Dairy Sci.* 89, 4163-4171.
- Lovell R.M., Levi M., Francis J., 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *J comp Pathol.* 54, 120-129.
- Lugton I., 1999. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol Cell Biol.* 77, 364-372.
- Lybeck K.R., Storset A.K., Olsen I., 2009. Neutralization of interleukin-10 from CD14(+) monocytes enhances gamma interferon production in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected goats. *Clin Vaccine Immunol.* 16, 1003-1011.
- Lybeck K.R., Storset A.K., Djønn B., Valheim M., Olsen I., 2011. Faecal shedding detected earlier than immune responses in goats naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Res Vet Sci.* 91, 32-39.
- Lybeck K.R., Løvoll M., Johansen T.B., Olsen I., Storset A.K., Valheim M., 2013. Intestinal strictures, fibrous adhesions and high local interleukin-10 levels in goats infected naturally with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J Comp Pathol.* 148, 157-172.
- MacDonald T.T., 2003. The mucosal immune system. *Parasite Immunol.* 25, 235-246.

- Machackova M., Svastova P., Lamka J., Parmova I., Liska V., Smolik J., Fischer O.A., Pavlik I., 2004. Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Vet Microbiol.* 101, 225-234.
- Mackintosh C.G., de Lisle G.W., Collins D.M., Griffin J.F., 2004. Mycobacterial diseases of deer. *N Z Vet J.* 52, 163-174.
- Mackintosh C.G., Labes R.E., Griffin J.F., 2005. The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J.* 53, 216-222.
- Mackintosh C.G., Labes R.E., Clark R.G., de Lisle G.W., O'Brien R., Mackintosh C.G., Bakker D., Kopečna M., Pavlik I., Griffin J.F., 2006. Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the red deer (*Cervus elaphus*). *Infect Immun.* 74, 3530-3537.
- Mackintosh C.G., Labes R.E., Clark R.G., de Lisle G.W., Griffin J.F., 2007. Experimental infections in young red deer (*Cervus elaphus*) with a bovine and an ovine strain of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *N Z Vet J.* 55, 23-29.
- Mackintosh C.G., Labes R.E., Thompson B.R., Clark R.G., de Lisle G.W., Johnstone P.D., Griffin J.F., 2008. Efficacy, immune responses and side-effects of vaccines against Johne's disease in young red deer (*Cervus elaphus*) experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *N Z Vet J.* 56, 1-9.
- Mackintosh C.G., Clark R.G., Thompson B., Tolentino B., Griffin J.F., de Lisle G.W., 2010. Age susceptibility of red deer (*Cervus elaphus*) to paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 143, 255-261.
- Mackintosh C.G., Clark R.G., Tolentino B., de Lisle G.W., Liggett S., Griffin J.F., 2011. Immunological and pathological responses of red deer resistant or susceptible genotypes, to experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 143, 131-142.
- Manning E.J., Collins M.T., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev Sci Tech.* 20, 133-150.
- Manning E.J., Cushing H.F., Hietala S., Wolf C.B., 2007. Impact of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection on serologic surveillance for Johne's disease in goats. *J Vet Diagn Invest.* 19, 187-190.

- Marcé C., Ezanno P., Seegers H., Pfeiffer D.U., Fourichon C., 2011. Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study. *Vet Res.* 42:36. doi: 10.1186/1297-9716-42-36.
- Marodi L., 2002. Down-regulation of Th1 responses in human neonates. *Clin Exp Immunol.* 128, 1-2.
- McDonald W.L., Ridge S.E., Hope A.F., Condrón R.J., 1999. Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust Vet J.* 77, 113-119.
- McFadden J.J., Butcher P.D., Chiodini R.J., Hermon-Taylor J., 1987. Crohn's disease isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 25, 796-801.
- McGregor H., Dhand N.K., Dhungyel O.P., Whittington R.J., 2012. Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev Vet Med.* 107, 76-84.
- McKenna S.L., Keefe G.P., Barkema H.W., Sockett D.C., 2005. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol.* 110, 105-111.
- McNab W.B., Meek A.H., Martin S.W., Duncan J.R., 1991a. Associations between dairy production indices and lipoarabinomannan enzyme-immunoassay results for paratuberculosis. *Can J Vet Res.* 55, 356-361.
- McNab W.B., Meek A.H., Duncan J.R., Brooks B.W., Van Dreumel A.A., Martin S.W., Nielsen K.H., Sugden E.A., Turcotte C., 1991b. An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis. *Can J Vet Res.* 55, 252-259.
- Mercier P., Beaudreau F., Laroucau K., Bertin C., Boschioli M.L., Baudry C., Seegers H., Malher X., 2009. Comparative age-related responses to serological and faecal tests directed to *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) in French dairy goats. *Small Ruminant Res.* 87, 50-56.
- Mercier P., Baudry C., Beaudreau F., Seegers H., Malher X., 2010. Estimated prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in herds of dairy goats in France. *Vet Rec.* 167, 412-415.
- Merkal R.S., Larsen A.B., Kopecky K.E., 1968. Comparison of examination and test methods for early detection of paratuberculous cattle. *Am J Vet Res.* 29, 1533-1538.

- Merkal R.S., 1973. Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 163, 1100-1102.
- Merkal R.S., Larsen A.B., Nelson H.A., Pier A.C., 1973. Thermography of tuberculin reactions in cattle. *Infect Immun.* 7, 805-808.
- Merkal R.S., Curran B.J., 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol.* 28, 276-279.
- Merkal R.S., Larsen A.B., Booth G.D., 1975. Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 36, 837-838.
- Merkal R.S., 1984. Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. *J Am Vet Med Assoc.* 184, 939-943.
- Meyer M., 2011. Klinische und pathologische Befunde nach experimenteller Infektion von Ziegenlämmern mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Michel A.L., Bastianello S.S., 2000. Paratuberculosis in sheep: an emerging disease in South Africa. *Vet Microbiol.* 77, 299-307.
- Miethke T., Heeg K., Wahl C., Wagner H., 1991. Crosslinked staphylococcal enterotoxin B stimulates CD8+ T cells only in the presence of unlinked costimulator signals. *Immunobiology.* 183, 433-450.
- Mikkelsen H., Jungersen G., Nielsen S.S., 2009. Association between milk antibody and interferon-gamma responses in cattle from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected herds. *Vet Immunol Immunopathol.* 127, 235-241.
- Mikkelsen H., Aagaard C., Nielsen S.S., Jungersen G., 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol.* 152, 1-20.
- Miller K., 1983. The Stimulation of Human B and T Lymphocytes by Various Lectins. *Immunobiol.* 165, 132-146.
- Milner A.R., Mack W.N., Coates K.J., Hill J., Gill I., Sheldrick P., 1990. The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle. *Vet Microbiol.* 25, 193-198.
- Möbius P., Köhler H., 2004. Mykobakterien des *Mycobacterium-avium-Komplexes*: Differenzierung und Pathogenität für Tiere und den Menschen. *FLI-Info* 2, 9-12.

- Möbius P., Hotzel H., Rassbach A., Köhler H., 2008. Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 126, 324-333.
- Mokresh A.H., Butler D.G., 1990. Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Can J Vet Res.* 54, 313-319.
- Molina A., Morera L., Llanes D., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am J Vet Res.* 52, 863-868.
- Moloney B.J., Whittington R.J., 2008. Cross species transmission of ovine Johne's disease from sheep to cattle: an estimate of prevalence in exposed susceptible cattle. *Aust Vet J.* 86, 117-123.
- Momotani E., Whipple D.L., Thiermann A.B., Cheville N.F., 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol.* 25, 131-137.
- Mortensen H., Nielsen S.S., Berg P., 2004. Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holstein cows. *J Dairy Sci.* 87, 2108-2113.
- Mortier R.A., Barkema H.W., Bystrom J.M., Illanes O., Orsel K., Wolf R., Atkins G., De Buck J., 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. *Vet Res.* 44:94. doi: 10.1186/1297-9716-44-94.
- Mortier R.A., Barkema H.W., Wilson T.A., Sajobi T.T., Wolf R., De Buck J., 2014a. Dose-dependent interferon-gamma release in dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 161, 205-210.
- Mortier R.A., Barkema H.W., Negron M.E., Orsel K., Wolf R., De Buck J., 2014b. Antibody response early after experimental infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy calves. *J Dairy Sci.* 97, 5558-5565.
- Mortier R.A., Barkema H.W., Orsel K., Wolf R., De Buck J., 2014c. Shedding patterns of dairy calves experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Res.* 45:71. doi: 10.1186/s13567-014-0071-1.

- Moss M.T., Green E.P., Tizard M.L., Malik Z.P., Hermon-Taylor J., 1991. Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut*. 32, 395-398.
- Motiwala A.S., Janagama H.K., Paustian M.L., Zhu X., Bannantine J.P., Kapur V., Sreevatsan S., 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect Immun*. 74, 6046-6056.
- Münster P., Völkel I., Wemheuer W., Schwarz D., Döring S., Czerny C.P., 2013. A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transbound Emerg Dis*. 60, 175-187.
- Munjal S.K., Tripathi B.N., Paliwal O.P., 2005. Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Pathol*. 42, 427-436.
- Munjal S.K., Tripathi B.N., Paliwal O.P., Boehmer J., Homuth M., 2007. Application of different methods for the diagnosis of experimental *paratuberculosis* in goats. *Zoonoses Public Health*. 54, 140-146.
- Muñoz M., Delgado L., Verna A., Benavides J., García-Pariente C., Fuertes M., Ferreras M.C., García-Marín J.F., Pérez V., 2009. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine *paratuberculosis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32, 239-252.
- Muskens J., Barkema H.W., Russchen E., van Maanen K., Schukken Y.H., Bakker D., 2000. Prevalence and regional distribution of *paratuberculosis* in dairy herds in The Netherlands. *Vet Microbiol*. 77, 253-261.
- Muskens J., van Zijderveld F., Eger A., Bakker D., 2002. Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against *paratuberculosis* in two Dutch dairy herds. *Vet Microbiol*. 86, 269-278.
- Mutwiri G.K., Butler D.G., Rosendal S., Yager J., 1992. Experimental infection of severe combined immunodeficient beige mice with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. *Infect Immun*. 60, 4074-4079.
- Nagata R., Muneta Y., Yoshihara K., Yokomizo Y., Mori Y., 2005. Expression cloning of gamma interferon-inducing antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun*. 73, 3778-3782.

- Nagata R., Kawaji S., Minakawa Y., Wang X., Yanaka T., Mori Y., 2010. A specific induction of interleukin-10 by the Map41 recombinant PPE antigen of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 135, 71-78.
- Navarro J.A., Seva J., Caro M.R., Sánchez J., Gómez M.A., Bernabé A., 1997. Postnatal development of lymphocyte subpopulations in the intestinal mucosa in goat. *Vet Immunol Immunopathol.* 55, 303-311.
- Navarro J.A., Ramis G., Seva J., Pallarés F.J., Sánchez J., 1998. Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis. *J Comp Pathol.* 118, 109-121.
- Neelsen F., 1885. Ein zweifelloser Fall von congenitaler Tuberkulose. *Fortschr Med.* 3, 198-202.
- Nielsen S.S., 2003. Possibilities for intervention against paratuberculosis in Danish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 44, 289-290.
- Nielsen S.S., 2010. Immune-based diagnosis of Paratuberculosis. In: Behr M.A. und Collins D.M.. Paratuberculosis, Kapitel 24, 284-293.
- Nielsen S.S., Ersbøll A.K., 2006. Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally infected dairy cows. *J Dairy Sci.* 89, 4557-4566.
- Nielsen S.S., Toft N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 88, 1-14.
- Noh K.T., Shin S.J., Son K.H., Jung I.D., Kang H.K., Lee S.J., Lee E.K., Shin Y.K., You J.C., Park Y.M., 2012. The *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein, a toll-like receptor 4 agonist, enhances dendritic cell-based cancer vaccine potency. *Exp Mol Med.* 44, 340-349.
- Nordlund K.V., Goodger W.J., Pelletier J., Collins M.T., 1996. Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* 208, 1872-1876.
- Ocepek M., Krt B., Pate M., Pogacnik M., 2002. Seroprevalence of paratuberculosis in Slovenia between 1999 and 2001. *Slov Vet Res.* 39, 179-185.
- OIE, 2014. Paratuberculosis (Johne's disease). In: Terrestrial Manual 2014, Chapter 2.1.11., [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.11\\_PARAT\\_B.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.11_PARAT_B.pdf), 1-16.

- Olsen I., Reitan L.J., Holstad G., Wiker H.G., 2000. Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect Immun.* 68, 801-808.
- Olsen I., Boysen P., Kulberg S., Hope J.C., Jungersen G., Storset A.K., 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect Immun.* 73, 5628-5635.
- Osterstock J.B., Fosgate G.T., Norby B., Manning E.J., Collins M.T., Roussel A.J., 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 230, 896-901.
- Ott S.L., Wells S.J., Wagner B.A., 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 40, 179-192.
- Owen R.L., 1983. And now pathophysiology of M cells - good news and bad news from Peyer's patches. *Gastroenterology.* 85, 468-470.
- Palmer M.V., Stoffregen W.C., Carpenter J.G., Stabel J.R., 2005. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *J Wildl Dis.* 41, 629-635.
- Paolicchii F.A., Zumarraga M.J., Gioffre A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A., Alito A., Romano M., 2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50, 20-26.
- Park K.T., Allen A.J., Barrington G.M., Davis W.C., 2014. Deletion of *relA* abrogates the capacity of *Mycobacterium avium* paratuberculosis to establish an infection in calves. *Front Cell Infect Microbiol.* 4:64, doi: 10.3389/fcimb.2014.00064.
- Paustian M.L., Amonsin A., Kapur V., Bannantine J.P., 2004. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: implications for diagnosis of Johne's Disease. *J Clin Microbiol.* 42, 2675-2681.
- Pavlik I., Pavlas M., Bejcková L., 1994. Occurrence, economic significance and diagnosis of paratuberculosis. *Vet Med (Praha).* 39, 451-496.
- Pavlik I., Bölske G., Englund S., Viske D., Dvorska L., du Maine R., Svastova P., Parmova I., Bazant J., 1999. Use of DNA fingerprinting for epidemiological studies of paratuberculosis in Sweden and the Czech Republic. In: Manning E.J.B., Collins M.T. (ed.). *Proc. 6th Int. Col. Parat.*, International Association for Paratuberculosis, Melbourne, Vic., Australia, 176-187.



- Pavlik I., Bartl J., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Machackova M., Yayo Ayele W., Horvathova A., 2000. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet Microbiol.* 77, 231-251.
- Pearson J.K.L., Mc Clelland T.G., 1955. Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. *Vet Rec.* 67, 615-616.
- Pérez V., García Marín J.F., Badiola J.J., 1996. Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J Comp Pathol.* 114, 107-122.
- Pérez V., Tellechea J., Badiola J.J., Gutiérrez M., García Marín J.F., 1997. Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 58, 799-803.
- Pérez V., Tellechea J., Corpa J.M., Gutiérrez M., García Marín J.F., 1999. Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 60, 123-127.
- Perry G.H., Vivanco H., Holmes I., Gwozdz J.M., Bourne J., 2006. No evidence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in in vitro produced cryopreserved embryos derived from subclinically infected cows. *Theriogenology.* 66, 1267-1273.
- Pinedo P.J., Rae D.O., Williams J.E., Donovan G.A., Melendez P., Buergelt C.D., 2008. Association among results of serum ELISA, faecal culture and nested PCR on milk, blood and faeces for the detection of paratuberculosis in dairy cows. *Transbound Emerg Dis.* 55, 125-133.
- Pinedo P.J., Buergelt C.D., Donovan G.A., Melendez P., Morel L., Wu R., Langae T.Y., Rae D.O., 2009. Candidate gene polymorphisms (BoIFNG, TLR4, SLC11A1) as risk factors for paratuberculosis infection in cattle. *Prev Vet Med.* 91, 189-196.
- Pitt D.J., Pinch D.S., Janmaat A., Condron R.J., 2002. An estimate of specificity for a Johne's disease absorbed ELISA in northern Australian cattle. *Aust Vet J.* 80, 57-60.
- Ponnusamy D., Periasamy S., Tripathi B.N., Pal A., 2013. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res Vet Sci.* 94, 306-312.

- Pott J., Basler T., Duerr C.U., Rohde M., Goethe R., Hornef M.W., 2009. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 11, 1802-1815.
- Poupart P., Coene M., Van Heuverswyn H., Cocito C., 1993. Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. *J Clin Microbiol.* 31, 1601-1605.
- Pozzato N., Capello K., Comin A., Toft N., Nielsen S.S., Vicenzoni G., Arrigoni N., 2011. Prevalence of paratuberculosis infection in dairy cattle in Northern Italy. *Prev Vet Med.* 102, 83-86.
- Raizman E.A., Wells S.J., Jordan P.A., DelGiudice G.D., Bey R.R., 2005. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis from free-ranging deer and rabbits surrounding Minnesota dairy herds. *Can J Vet Res.* 69, 32-38.
- Raizman E.A., Fetrow J., Wells S.J., Godden S.M., Oakes M.J., Vazquez G., 2007. The association between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Prev Vet Med.* 78, 179-195.
- Raizman E.A., Fetrow J.P., Wells S.J., 2009. Loss of income from cows shedding *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis prior to calving compared with cows not shedding the organism on two Minnesota dairy farms. *J Dairy Sci.* 92, 4929-4936.
- Rajukumar K., Tripathi B.N., Kurade N.P., Parihar N.S., 2001. An enzyme-linked immunosorbent assay using immonoaffinity-purified antigen in the diagnosis of caprine paratuberculosis and its comparison with conventional ELISAs. *Vet Res Commun.* 25, 539-553.
- Rankin J.D., 1961a. The experimental infection of cattle with *Mycobacterium johnei*. III. Calves maintained in an infectious environment. *J Comp Pathol.* 71, 10-15.
- Rankin J.D., 1961b. The non-specificity of a complement fixation test used in the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Res Vet Sci.* 2, 89-95.
- Rawther S.S., Saseendranath M.R., Nair G.P., Tresamol P.V., Pillai U.N., Abraham J., Senthilkumar T.M., Nagalakshmy S., Nimisha K.K., 2012. Diagnosis of paratuberculosis in goats by cell mediated immune response, conventional and molecular diagnostic techniques. *Trop Anim Health Prod.* 44, 911-914.

- Reddacliff L., Eppleston J., Windsor P., Whittington R., Jones S., 2006. Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet Microbiol.* 115, 77-90.
- Reddacliff L.A., Whittington R.J., 2003. Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 96, 247-258.
- Reddacliff L.A., McClure S.J., Whittington R.J., 2004. Immunoperoxidase studies of cell mediated immune effector cell populations in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* 97, 149-162.
- Reddacliff L.A., Beh K., McGregor H., Whittington R.J., 2005. A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust Vet J.* 83, 435-441.
- Reynolds J.D., Morris B., 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol.* 13, 627-635.
- Richards W.D., Thoen C.O., 1977. Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Clin Microbiol.* 6, 392-395.
- Ristow P., Marassi C.D., Rodrigues A.B., Oelemann W.M., Rocha F., Santos A.S., Carvalho E.C., Carvalho C.B., Ferreira R., Fonseca L.S., Lilenbaum W., 2007. Diagnosis of paratuberculosis in a dairy herd native to Brazil. *Vet J.* 174, 432-434.
- Robbe-Austerman S., Gardner I.A., Thomsen B.V., Morrill D.G., Martin B.M., Palmer M.V., Thoen C.O., Ewing C., 2006a. Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations. *Vet Res.* 37, 553-564.
- Robbe-Austerman S., Krull A.C., Stabel J.R., 2006b. Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53, 213-217.
- Robbe-Austerman S., Stabel J.R., Palmer M.V., 2006c. Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *J Vet Diagn Invest.* 18, 189-194.

- Robinson M., O'Brien R., Mackintosh C., Griffin F., 2008. Differential immune responses of red Deer (*Cervus elaphus*) following experimental challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 15, 963-969.
- Robinson M.W., O'Brien R., Mackintosh C.G., Griffin J.F., 2010. Peripheral blood mononuclear cell population changes associated with age and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Immunol Immunopathol.* 136, 211-218.
- Robinson M.W., O'Brien R., Mackintosh C.G., Clark R.G., Griffin J.F., 2011. Immunoregulatory cytokines are associated with protection from immunopathology following *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in red deer. *Infect Immun.* 79, 2089-2097.
- Romero C., Hamdi A., Valentine J.F., Naser S.A., 2005. Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis.* 11, 116-125.
- Rose S., Lichtenheld M., Foote M.R., Adkins B., 2007. Murine neonatal CD4<sup>+</sup> cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol.* 178, 2667-2678.
- Rosenberger G., 1978. Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates. In: Rosenberger, G. *Krankheiten des Rindes*, 2. Auflage. Verlag Parey Berlin, Hamburg, 756-760.
- Rosseels V., Roupie V., Zinniel D., Barletta R.G., Huygen K., 2006. Development of luminescent *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for rapid screening of vaccine candidates in mice. *Infect Immun.* 74, 3684-3686.
- Rothel J.S., Jones S.L., Corner L.A., Cox J.C., Wood P.R., 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J.* 69, 1-4.
- Rue-Albrecht K., Magee D.A., Killick K.E., Nalpas N.C., Gordon S.V., MacHugh D.E., 2014. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the mycobacterium genus. *Front Immunol.* 5:536. doi: 10.3389/fimmu.2014.00536. eCollection 2014.
- Runnels R.A., 1955. Paratuberculosis in a pig. *J Am Vet Med Ass.* 127, 523-524.

- Salgado M., Kruze J., Collins M.T., 2007. Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds. *J Vet Diagn Invest.* 19, 99-102.
- Santema W., Hensen S., Rutten V., Koets A., 2009. Heat shock protein 70 subunit vaccination against bovine paratuberculosis does not interfere with current immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vaccine.* 27, 2312-2319.
- Saxegaard F., Fodstad F.H., 1985. Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *Vet Rec.* 116, 439-441.
- Schönenbrücher H., Abdulmawjood A., Failing K., Bülte M., 2008. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine feces. *Appl Environ Microbiol.* 74, 2751-2758.
- Schorey J.S., Cooper A.M., 2003. Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol.* 5, 133-142.
- Schrauder A., Ammon A., Stark K., Euler U., Bräunig J., Weise E., 2003. Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis – eine Literaturstudie. Robert Koch Institut.  
[http://www.bfr.bund.de/cm/343/morbus\\_crohn\\_und\\_mycobacterium\\_avium\\_ssp\\_paratuberculosis\\_literaturstudie.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/morbus_crohn_und_mycobacterium_avium_ssp_paratuberculosis_literaturstudie.pdf)
- Schütt C., Bröker B., 2009. *Grundwissen Immunologie.* 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.
- Schwartz D., Shafran I., Romero C., Piromalli C., Biggerstaff J., Naser N., Chamberlin W., Naser S.A., 2000. Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in tissue from Crohn's disease patients. *Clin Microbiol Infect.* 6, 303-307.
- Secott T.E., Lin T.L., Wu C.C., 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect Immun.* 70, 2670-2675.
- Secott T.E., Lin T.L., Wu C.C., 2004. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun.* 72, 3724-3732.
- Seitz S.E., Heider L.E., Heuston W.D., Bech-Nielsen S., Rings D.M., Spangler L., 1989. Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Am Vet Med Assoc.* 194, 1423-1426.

- Sergeant E.S., Marshall D.J., Eamens G.J., Kearns C., Whittington R.J., 2003. Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Prev Vet Med.* 61, 235-248.
- Shafran I., Kugler L., El-Zaatari FA., Naser S.A., Sandoval J., 2002. Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 34, 22-28.
- Sherman D.M., Gay J.M., Bouley D.S., Nelson G.H., 1990. Comparison of the complement-fixation and agar gel immunodiffusion tests for diagnosis of subclinical bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 51, 461-465.
- Shin S.J., Chang C.F., Chang C.D., McDonough S.P., Thompson B., Yoo H.S., Chang Y.F., 2005. In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infect Immun.* 73, 5074-5085.
- Shin S.J., Anklam K., Manning E.J., Collins M.T., 2009. Rapid mycobacterial liquid culture-screening method for *Mycobacterium avium* complex based on secreted antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol.* 16, 613-620.
- Shu D., Subharat S., Wedlock D.N., Luo D., de Lisle G.W., Buddle B.M., 2011. Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease. *Clin Vaccine Immunol.* 18, 1467-1476.
- Shulaw W.P., Bech-Nielsen S., Rings D.M., Getzy D.M., Woodruff T.S., 1993. Serodiagnosis of paratuberculosis in sheep by use of agar gel immunodiffusion. *Am J Vet Res.* 54, 13-19.
- Sigurðardóttir O.G., Press C.M., Saxegaard F., Evensen O., 1999. Bacterial isolation, immunological response, and histopathological lesions during the early subclinical phase of experimental infection of goat kids with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Pathol.* 36, 542-550.
- Sigurðardóttir O.G., Press C.M., Evensen O., 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet Pathol.* 38, 184-189.
- Sigurðardóttir O.G., Valheim M., Press C.M., 2004. Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Adv Drug Deliv Rev.* 56, 819-834.

- Singh A.V., Singh S.V., Sohal J.S., Singh P.K., 2009. Comparative potential of modified indigenous, indigenous and commercial ELISA kits for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in goat and sheep. *Indian J Exp Biol.* 47, 379-382.
- Singh S.V., Singh P.K., Singh A.V., Sohal J.S., Gupta V.K., Vihan V.S., 2007. Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis 'Bison type' with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. *Vaccine.* 25, 7102-7110.
- Slana I., Pribylova R., Kralova A., Pavlik I., 2011. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. *Appl Environ Microbiol.* 77, 3115-3119.
- Smeed J.A., Watkins C.A., Rhind S.M., Hopkins J., 2007. Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet Res.* 14, 3-18.
- Smithwick R.W., Bigbie M.R. Jr, Ferguson R.B., Karlix M.A., Wallis C.K., 1995. Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 33, 2763-2764.
- Sockett D.C., Carr D.J., Collins M.T., 1992. Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can J Vet Res.* 56, 148-153.
- Sommer S., Pudrith C.B., Colvin C.J., Coussens P.M., 2009. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis suppresses expression of IL-12p40 and iNOS genes induced by signalling through CD40 in bovine monocyte-derived macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 128, 44-52.
- Souza C., Davis W.C., Eckstein T.M., Sreevatsan S., Weiss D.J., 2013. Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. avium organisms. *PLoS One.* 8 (9):e75924. doi: 10.1371/journal.pone.0075924.
- Souza C.D., Evanson O.A., Sreevatsan S., Weiss D.J., 2007a. Cell membrane receptors on bovine mononuclear phagocytes involved in phagocytosis of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 68, 975-980.

- Souza C.D., Evanson O.A., Weiss D.J., 2007b. Role of the mitogen-activated protein kinase pathway in the differential response of bovine monocytes to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Microbes Infect.* 9, 1545-1552.
- Souza C.D., Evanson O.A., Weiss D.J., 2008. Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb Pathog.* 44, 215-223.
- Spangler E., Heider L.E., Bech-Nielsen S., Dorn C.R., 1991. Serologic enzyme-linked immunosorbent assay responses of calves vaccinated with a killed *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine. *Am J Vet Res.* 52, 1197-1200.
- Stabel J.R., 1996. Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 8, 345-350.
- Stabel J.R., 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *J Vet Diagn Invest.* 9, 375-380.
- Stabel J.R., 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 77, 465-473.
- Stabel J.R., Robbe-Austerman S., 2011. Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model. *Clin Vaccine Immunol.* 18, 393-405.
- Stabel J.R., Ackermann M.R., 2002. Temporal *Mycobacterium paratuberculosis* infection in T-cell receptor (TCR)-alpha and TCR-delta-deficient mice. *Vet Immunol Immunopathol.* 89, 127-132.
- Stabel J.R., Palmer M.V., Whitlock R.H., 2003. Immune responses after oral inoculation of weanling bison or beef calves with a bison or cattle isolate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Wildl Dis.* 39, 545-555.
- Stabel J.R., Bosworth T.L., Kirkbride T.A., Forde R.L., Whitlock R.H., 2004. A simple, rapid, and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 16, 22-30.
- Stabel J.R., Bannantine J.P., 2005. Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 43, 4744-4750.



- Stabel J.R., Kimura K., Robbe-Austerman S., 2007. Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 19, 43-51.
- Stabel J.R., Palmer M.V., Harris B., Plattner B., Hostetter J., Robbe-Austerman S., 2009. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in neonatal calves after oral or intraperitoneal experimental infection. *Vet Microbiol.* 136, 306-313.
- Stabel J.R., Bannantine J.P., Eda S., Robbe-Austerman S., 2011. Induction of B cell responses upon experimental infection of neonatal calves with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 18, 1139-1149.
- Stabel J.R., Waters W.R., Bannantine J.P., Lyashchenko K., 2011. Mediation of host immune responses after immunization of neonatal calves with a heat-killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 18, 2079-2089.
- Stamp J.T., Watt J.A., 1954. Johne's disease in sheep. *Journal of Comparative Pathology.* 64, 26-40.
- Stehman S.M., 1996. Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12, 441-455.
- Stephan R., 2007. Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Verbr Lebensm* 2, 222-227.
- Sternberg S., Viske D., 2003. Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand.* 44, 247-249.
- Stevenson K., 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Vet Res.* 46, 64. doi: 10.1186/s13567-015-0203-2.
- Stevenson K., Hughes V.M., de Juan L., Inglis N.F., Wright F., Sharp J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 40, 1798-1804.
- Stewart D.J., Vaughan J.A., Stiles P.L., Noske P.J., Tizard M.L., Prowse S.J., Michalski W.P., Butler K.L., Jones S.L., 2004. A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol.* 104, 165-178.

- Stewart D.J., Vaughan J.A., Stiles P.L., Noske P.J., Tizard M.L., Prowse S.J., Michalski W.P., Butler K.L., Jones S.L., 2006. A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet Microbiol.* 113, 13-24.
- Stewart D.J., Vaughan J.A., Stiles P.L., Noske P.J., Tizard M.L., Prowse S.J., Michalski W.P., Butler K.L., Jones S.L., 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. *Vet Microbiol.* 122, 83-96.
- Stief B., Möbius P., Türk H., Hörügel U., Arnold C., Pöhle D., 2012. Paratuberculosis in a miniature donkey (*Equus asinus* f. *asinus*). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 125, 38-44.
- Storset A.K., Hasvold H.J., Valheim M., Brun-Hansen H., Berntsen G., Whist S.K., Djønne B., Press C.M., Holstad G., Larsen H.J., 2001. Subclinical paratuberculosis in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study. *Vet Immunol Immunopathol.* 80, 271-287.
- Storset A.K., Berg I., Djønne B., 2011. Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of paratuberculosis in goats. *Immunobiology.* 216, 840-846.
- Streeter R.N., Hoffsis G.F., Bech-Nielsen S., Shulaw W.P., Rings D.M., 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.* 56, 1322-1324.
- Strommenger B., Stevenson K., Gerlach G.F., 2001. Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 196, 31-37.
- Sugden E.A., Stilwell K., Michaelides A., 1997. A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest.* 9, 413-417.
- Sweeney R.W., 1996. Transmission of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12, 305-312.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Rosenberger A.E., 1992a. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol.* 30, 166-171.

- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Rosenberger A.E., 1992b. Mycobacterium paratuberculosis isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am J Vet Res.* 53, 477-480.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Hamir A.N., Rosenberger A.E., Herr S.A., 1992c. Isolation of Mycobacterium paratuberculosis after oral inoculation in uninfected cattle. *Am J Vet Res.* 53, 1312-1314.
- Sweeney R.W., Jones D.E., Habecker P., Scott P., 1998. Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with Mycobacterium paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 59, 842-847.
- Sweeney R.W., Uzonna J., Whitlock R.H., Habecker P.L., Chilton P., Scott P., 2006a. Tissue predilection sites and effect of dose on Mycobacterium avium subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Res Vet Sci.* 80, 253-259.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., McAdams S., Fyock T., 2006b. Longitudinal study of ELISA seroreactivity to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in infected cattle and culture-negative herd mates. *J Vet Diagn Invest.* 18, 2-6.
- Sweeney R.W., Whitlock R.H., Bowersock T.L., Cleary D.L., Meinert T.R., Habecker P.L., Pruitt G.W., 2009. Effect of subcutaneous administration of a killed Mycobacterium avium subsp paratuberculosis vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. *Am J Vet Res.* 70, 493-497.
- Taddei S., Robbi C., Cesena C., Rossi I., Schiano E., Arrigoni N., Vicenzoni G., Cavarani S., 2004. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples: comparison of three polymerase chain reaction-based diagnostic tests with a conventional culture method. *J Vet Diagn Invest.* 16, 503-508.
- Tafti A.K., Rashidi K., 2000. The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 47, 487-495.
- Tanaka S., Sato M., Taniguchi T., Yokomizo Y., 1994. Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in BALB/c and C3H/HeJ mice inoculated with Mycobacterium paratuberculosis. *J Comp Pathol.* 110, 381-388.
- Tanaka S., Itohara S., Sato M., Taniguchi T., Yokomizo Y., 2000. Reduced formation of granulomata in gamma(delta) T cell knockout BALB/c mice inoculated with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Vet Pathol.* 37, 415-421.

- Tanaka S., Sato M., Onitsuka T., Kamata H., Yokomizo Y., 2005. Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Vet Pathol.* 42, 579-588.
- Taylor A.W., 1953. The experimental infection of cattle with varieties of *Mycobacterium johnei* isolated from sheep. *J. Comp. Pathol.* 63, 368-373.
- Taylor T.K., Wilks C.R., McQueen D.S., 1981. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* 109, 532-533.
- Thompson B.R., Clark R.G., Mackintosh C.G., 2007. Intra-uterine transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in subclinically affected red deer (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J.* 55, 308-313.
- Thomsen V.T., Nielsen S.S., Thakur A., Jungersen G., 2012. Characterization of the long-term immune response to vaccination against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 145, 316-322.
- Thorel M.F., Krichevsky M., 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. *Int J Syst Bacteriol.* 40, 254-260.
- Thorel M.F., Vialard J., Manfroni F., Bernardot J., Ostyn A., Vandeveld J., 1992. Experimental paratuberculosis in sheep after intravenous or oral inoculation: pathogenicity and biologic diagnosis. *Ann Rech Vet.* 23, 105-115.
- Thornton C.G., Passen S., 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J Microbiol Methods.* 59, 43-52.
- Tiwari A., Vanleeuwen J.A., Dohoo I.R., Stryhn H., Keefe G.P., 2002. Effect of seropositivity for bovine Leukemia virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and *Neospora caninum* on calving to conception in maritime Canadian dairy cattle. *Proc Soc Vet Epidemiol Prev Vet Med, Warwick, UK,* 243-252.
- Tourais-Esteves I., Bernardet N., Lacroix-Lamandé S., Ferret-Bernard S., Laurent F., 2008. Neonatal goats display a stronger TH1-type cytokine response to TLR ligands than adults. *Dev Comp Immunol.* 32, 1231-1241.

- Twort F.W., Ingram G.L.Y., 1912. A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic for pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc Roy Soc London*. 84, 517-543.
- Uzonna J.E., Chilton P., Whitlock R.H., Habecker P.L., Scott P., Sweeney R.W., 2003. Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine*. 21, 3101-3109.
- Valentin-Weigand P., 2015. Gattung *Mycobacterium*. In: Selbitz H.J., Truyen U. u Valentin-Weigand P. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart. Kapitel 14.8, 304-314.
- Valheim M., Storset A.K., Aleksersen M., Brun-Hansen H.C., Press McL., 2002. Lesions in subclinical paratuberculosis of goats are associated with persistent gut-associated lymphoid tissue. *J Comp Pathol*. 127, 194-202.
- Valheim M., Sigurdardóttir O.G., Storset A.K., Aune L.G., Press C.M., 2004. Characterization of macrophages and occurrence of T cells in intestinal lesions of subclinical paratuberculosis in goats. *J Comp Pathol*. 131, 221-232.
- van der Giessen J.W., Haring R.M., Vauclare E., Eger A., Haagsma J., van der Zeijst B.A., 1992. Evaluation of the abilities of three diagnostic tests based on the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in cattle: application in a control program. *J Clin Microbiol*. 30, 1216-1219.
- Van Kruiningen H.J., Chiodini R.J., Thayer W.R., Coutu J.A., Merkal R.S., Runnels P.L., 1986. Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease: A preliminary report. *Dig Dis Sci*. 31, 1351-1360.
- van Roermund H.J., Bakker D., Willemsen P.T., de Jong M.C., 2007. Horizontal transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in an experimental setting: calves can transmit the infection to other calves. *Vet Microbiol*. 122, 270-279.
- van Schaik G., Kalis C.H., Benedictus G., Dijkhuizen A.A., Huirne R.B., 1996. Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet Rec*. 139, 624-627.

- van Schaik G., Pradenas F.M., Mella N.A., Kruze V.J., 2007. Diagnostic validity and costs of pooled fecal samples and individual blood or fecal samples to determine the cow- and herd-status for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Prev Vet Med.* 82, 159-165.
- van Ulsen F.W., 1970. Paratuberculosis in a pygmy ass, *Equus asinus*. *Tijdschr Diergeneesk.* 95, 446-448.
- Vannuffel P., Gilot P., Limbourg B., Naerhuyzen B., Dieterich C., Coene M., Machtelinckx L., Cocito C., 1994. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J Clin Microbiol.* 32, 1211-1216.
- Vary P.H., Andersen P.R., Green E., Hermon-Taylor J., McFadden J.J., 1990. Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol.* 28, 933-937.
- Veazey R.S., Taylor H.W., Horohov D.W., Krahenbuhl J.L., Oliver J.L. 3rd, Snider T.G. 3rd, 1995a. Histopathology of C57BL/6 mice inoculated orally with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol.* 113, 75-80.
- Veazey R.S., Horohov D.W., Krahenbuhl J.L., Taylor H.W., Oliver J.L. 3rd, Snider T.G. 3rd, 1995b. Comparison of the resistance of C57BL/6 and C3H/He mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 47, 79-87.
- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten 2005 BGBI I Nr. 74, S. 3516, zuletzt geändert 17. April 2014, BGBI. I S. 388.
- Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit Biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung - BioStoffV) vom 27. Januar 1999. BGBI. I S. 50.
- Viske D., Larsson B., Engvall A., Bölske G., 1996. Paratuberculosis in Sweden. *The Paratuberculosis Newsletter* 8-2, 29.
- Vizard A.L., Anderson G.A., Baldock F.C., 1992. A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J.* 69, 121.
- Vogel O., 1977. Paratuberculosis in a dog. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 90, 419-421.

- Vosters O., Lombard C., André F., Sana G., Sokal E.M., Smets F., 2010. The interferon-alpha and interleukin-10 responses in neonates differ from adults, and their production remains partial throughout the first 18 months of life. *Clin Exp Immunol.* 162, 494-499.
- Waddell L.A., Rajić A., Sargeant J., Harris J., Amezcua R., Downey L., Read S., McEwen S.A., 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis: a systematic review. *Can J Public Health.* 99, 145-155.
- Waters W.R., Miller J.M., Palmer M.V., Stabel J.R., Jones D.E., Koistinen K.A., Steadham E.M., Hamilton M.J., Davis W.C., Bannantine J.P., 2003. Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection of calves. *Infect Immun.* 71, 5130-5138.
- Wattegedera S.R., Watson D.M., Hope J.C., Kaiser P., Sales J., McInnes C.J., Entrican G., 2010. Relative quantitative kinetics of interferon-gamma and interleukin-10 mRNA and protein production by activated ovine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 136, 34-42.
- Weber M.F., van Schaik G. 2009a. Results of the Dutch bulk milk quality assurance programme for paratuberculosis. In: Nielsen S.S. (ed.) *Proc. 9th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis*, Madison, Wisconsin, 324-327.
- Weber M.F., Verhoeff J., van Schaik G., van Maanen C., 2009b. Evaluation of Ziehl-Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. *Prev Vet Med.* 92, 256-266.
- Weber M.F., Kogut J., de Bree J., van Schaik G., Nielen M., 2010. Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis faecal culture positive. *Prev Vet Med.* 97, 29-36.
- Weiss D.J., Evanson O.A., McClenahan D.J., Abrahamsen M.S., Walcheck B.K., 2001. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis or *Mycobacterium avium* subsp. avium. *Infect Immun.* 69, 1002-1008.
- Weiss D.J., Evanson O.A., Moritz A., Deng M.Q., Abrahamsen M.S., 2002. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. avium. *Infect Immun.* 70, 5556-5561.

- Weiss D.J., Evanson O.A., Deng M., Abrahamsen M.S., 2004. Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 41, 326-337.
- Weiss D.J., Evanson O.A., de Souza C., Abrahamsen M.S., 2005. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 66, 721-726.
- Weiss D.J., Souza C.D., 2008. Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Pathol.* 45, 829-841.
- Weiss D.J., Souza C.D., Evanson O.A., Sanders M., Rutherford M., 2008. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *J Leukoc Biol.* 83, 48-55.
- Wells S.J., Collins M.T., Faaberg K.S., Wees C., Tavoranpanich S., Petrini K.R., Collins J.E., Cernicchiaro N., Whitlock R.H., 2006. Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 13, 1125-1130.
- Wells S.J., Kubat N., Espejo L.A., Godden S.M., 2012. Effect of Delaying Exposure to *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* until adulthood on incidence of infection in adult dairy cows. *Proc. 8th Int. Col. Parat. International Association for Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark.* 332.
- Whan L., Ball H.J., Grant I.R., Rowe M.T., 2005. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl Environ Microbiol.* 71, 7107-7112.
- Whitlock R.H., 2010. Current JD programme in the USA. In: Behr M.A. und Collins D.M., *Paratuberculosis, Kapitel 27.3*, 321-323.
- Whitlock R.H., 2010. Paratuberculosis control measures in the USA. In: Behr M.A. und Collins D.M., *Paratuberculosis, Kapitel 28*, 319-329.
- Whitlock R.H., Buergelt C., 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12, 345-356.



- Whitlock R.H., Hutchinson L.T., Merkal R.S., Glickman L.T., Rossiter C., Harmon S., Spencer P., Fetrow J., Bruce J., Benson C.E., Dick J., 1985. Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the North Eastern U.S. In: Proceedings of the 89th Annual Meeting of the USAHA, Milwaukee, Wisconsin, USA, 89, 484-490.
- Whitlock R.H., Rosenberger A.E., 1990. Fecal culture protocol for Mycobacterium paratuberculosis: a recommended procedure. Proc Annu Meet U.S. Anim Health Assoc. 94, 280-285.
- Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Van Tiem J., 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet Microbiol. 77, 387-398.
- Whittington R.J., Marsh I., Turner M.J., McAllister S., Choy E., Eamens G.J., Marshall D.J., Ottaway S., 1998. Rapid detection of Mycobacterium paratuberculosis in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. J Clin Microbiol. 36, 701-707.
- Whittington R.J., Fell S., Walker D., McAllister S., Marsh I., Sergeant E., Taragel C.A., Marshall D.J., Links I.J., 2000. Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in flocks of sheep. J Clin Microbiol. 38, 2550-2556.
- Whittington R.J., Sergeant E.S., 2001. Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in animal populations. Aust Vet J. 79, 267-278.
- Whittington R.J., Taragel C.A., Ottaway S., Marsh I., Seaman J., Fridriksdottir V., 2001. Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland. Vet Microbiol. 79, 311-322.
- Whittington R.J., Eamens G.J., Cousins D.V., 2003. Specificity of absorbed ELISA and agar gel immuno-diffusion tests for paratuberculosis in goats with observations about use of these tests in infected goats. Aust Vet J. 81, 71-75.
- Whittington R.J., Marshall D.J., Nicholls P.J., Marsh I.B., Reddacliff L.A., 2004. Survival and dormancy of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in the environment. Appl Environ Microbiol. 70, 2989-3004.

- Whittington R.J., Marsh I.B., Reddacliff L.A., 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Appl Environ Microbiol.* 71, 5304-5308.
- Whittington R.J., Windsor P.A., 2007. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet J.* 179, 60-69.
- Wilesmith J.W., 1982. Johne's disease: a retrospective study of vaccinated herds in Great Britain. *Br Vet J.* 138, 321-331.
- Wilson D.J., Rossiter C., Han H.R., Sears P.M., 1993. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am J Vet Res.* 54, 1851-1857.
- Windsor P.A., Eppleston J., 2006. Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine *paratuberculosis*. *N Z Vet J.* 54, 237-241.
- Windsor P.A., Whittington R.J., 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet J.* 184, 37-44.
- Woo S.R., Czuprynski C.J., 2008. Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *J Vet Sci.* 9, 1-8.
- Woo S.R., Heintz J.A., Albrecht R., Barletta R.G., Czuprynski C.J., 2007. Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microb Pathog.* 43, 106-113.
- Woodbine K.A., Schukken Y.H., Green L.E., Ramirez-Villaescusa A., Mason S., Moore S.J., Bilbao C., Swann N., Medley G.F., 2009. Seroprevalence and epidemiological characteristics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on 114 cattle farms in south west England. *Prev Vet Med.* 89, 102-109.
- Wu C.W., Livesey M., Schmoller S.K., Manning E.J., Steinberg H., Davis W.C., Hamilton M.J., Talaat A.M., 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect Immun.* 75, 2110-2119.

- Yachnin S., 1972. The potentiation and inhibition by autologous red cells and platelets of human lymphocyte transformation induced by pokeweed mitogen concanavalin A, mercuric chloride antigen, and mixed leucocyte culture. *Clin Exp Immunol.* 11, 109-124.
- Yokomizo Y., Merkal R.S., Lyle P.A., 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 44, 2205-2207.
- Yokomizo Y., Yugi H., Merkal R.S., 1985. A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Nihon Juigaku Zasshi.* 47, 111-119.
- Yokomizo Y., Kishima M., Mori Y., Nishimori K., 1991. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J Vet Med Sci.* 53, 577-584.
- Zhang M.Z., Zhang S., 2011. An efficient DNA extraction method for polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest.* 23, 41-48.
- Zhong L., Taylor D., Begg D.J., Whittington R.J., 2011. Biomarker discovery for ovine paratuberculosis (Johne's disease) by proteomic serum profiling. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34, 315-326.
- Ziehl F.H.P., 1882. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsch. Med. Wschr.* 8, 451.
- Zimmer K., Dräger K.G., Klawonn W., Hess R.G., 1999. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 46, 137-140.
- Zurbrick B.G., Czuprynski C.J., 1987. Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 55, 1588-1593.
- Zurbrick B.G., Follett D.M., Czuprynski C.J., 1988. Cytokine regulation of the intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine monocytes. *Infect Immun.* 56, 1692-1697.

## 10 Anhang

### 10.1 Materialien und Methoden

#### 10.1.1 Charakterisierung der Einzeltiere, Ergebnisse der mikrobiologischen und parasitologischen Untersuchungen sowie Auswahl der Tiere für die real-time PCR

Tab. 10.1 Charakterisierung der Einzeltiere und Auswahl der zu untersuchenden Ziegen für die real-time PCR

Tier-nummer	Geburts-datum	Geburts-gewicht [kg]	Einstaltungs-gewicht [kg]	Abstammung		Auswahl Genexpressions-bestimmung
				Nummer des Vaters	Nummer der Mutter	
<b>Kontrollgruppe 1</b>						
1	19.02.	2,7	3,4	4	7	—
2	19.02.	3,3	3,8	1	26	x
3	20.02.	2,2	2,6	4	10	x
4	19.02.	3,7	4	2	25	x
5	21.02.	4,1	4,4	1	11	—
6	18.02.	3,5	3,8	1	12	x
<b>Versuchsgruppe 1</b>						
7	19.02.	3,5	4	4	7	x
8	21.02.	3,2	3,4	4	16	x
9	19.02.	3	3,4	1	26	—
10	19.02.	3,4	4	2	2	x
11	19.02.	4,4	4,4	4	17	x
12	20.02.	3,3	3,6	6	24	—
13	22.02.	3	2,8	5	14	—
<b>Versuchsgruppe 2</b>						
14	20.02.	3,5	4,2	2	23	x
15	19.02.	4,1	4,8	2	25	x
16	22.02.	3	2,8	5	14	—
17	19.02.	3,3	4	2	2	—
18	21.02.	3	3	4	16	x
19	19.02.	3,1	3,8	1	15	—
20	20.02.	2,9	3,4	6	24	x
<b>Kontrollgruppe 2</b>						
21	14.02.	2,7	3,4	6	21	x
22	17.02.	3,3	3,4	3	18	x
23	23.02.	4,3	6	2	6	—
24	10.02.	3,1	4,6	3	3	—
25	12.02.	3,2	4,6	6	22	x
26	27.02.	3,6	4	1	27	x
<b>Versuchsgruppe 3</b>						
27	15.02.	3	3,4	4	20	x
28	10.02.	3,5	4,8	3	3	x
29	16.02.	3,8	4,2	6	8	—
30	23.02.	4,1	6	3	19	—
31	14.02.	2,9	3,6	1	1	x
32	19.02.	4,2	4,8	2	2	x
<b>Versuchsgruppe 4</b>						
33	16.02.	3,2	3,6	6	8	—
34	15.02.	3,5	4	3	13	x
35	18.02.	4	5,2	3	9	x
36	12.02.	3,1	4,6	6	22	—
37	24.02.	3,5	4,8	4	4	—
38	14.02.	2,9	3,8	6	21	x
39	25.02.	3,3	4,2	6	5	x

Tab. 10.2 Mikrobiologische Charakterisierung und entsprechende Befunde der Tiere zum Zeitpunkt der Einstellung

<b>Untersuchung auf</b>	<b>Material</b>	<b>Regime</b>	<b>Nachweismethode</b>	<b>Befunde</b>
<i>Chlamydiaceae</i>	Kot-, Nasen-, Konjunktivaltupfer	3 x, Abstand 24 h	23S-rtPCR	38 × negativ  Ziege Nr. 13 Nachweis von <i>Chlamydophila psittacii</i>
<i>Salmonella</i> spp.	Kottupfer	1 x, 3fach- Tupfer	Nach ISO 6579 Anhang D	39 × negativ
<i>Pasteurella</i> spp.	Nasentupfer	3 x, Abstand 24 h	Kultur	37 × negativ  Ziegen Nr. 8 und 33 Nachweis von <i>Pasteurella multocida</i>
<i>Mannheimia</i> spp.	Nasentupfer	3 x, Abstand 24 h	Kultur	37 × negativ  Ziegen Nr. 29 und 38 Nachweis von <i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Mycoplasma</i> spp.	Nasentupfer	3 x, Abstand 24 h	Kultur, Bestätigung durch Immunfluoreszenz	39 × negativ
<i>Coxiella burnetii</i>	Blutserum	1 x	Antikörper-ELISA	39 × negativ

## 10.1.2 Materialien

### 10.1.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Tab. 10.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Gerät/Gebrauchsgegenstand	Artikelbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage	LA 2200 S	Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen
Brutschrank	Hera Cell 37 °C, BS1	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Elektrische Achtkanalpipetten (5-100 µl; 20-1250 µl)	Eppendorf research pro	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera freeze	Thermo Scientific, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Gefrierschränke	Liebherr comfort	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
	Thermokryotechnics exquisite	Thermo Scientific, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Handzähler	Handzähler	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kolbenhubpipetten (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 50-250 µl; 200-1000 µl)	Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Kühl- und Gefrierkombination	Privileg de luxe	Quelle AG, Fürth
Kühlschränke	MED 100	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
	Privileg	Quelle AG, Fürth
	Profi line	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Magnetrührer	RCTbasic	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop	Olympus BX 41	Olympus Europa GmbH, Hamburg
PCR-Arbeitshauben	CleneCab	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch

<b>Gerät/Gebrauchsgegenstand</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
	Template Tamer <sup>TM</sup>	Quantum Appligene, Heidelberg
Photometer	NanoDrop <sup>®</sup> -ND-1000 Spektralphotometer	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Spectra-Fluor	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
pH-Wert-Messgerät	Labor-pH-Meter inoLab phLevel 2P	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetus <sup>®</sup> -akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Plattenwaschautomat	Skan Washer, Modell 12201	Skatron Instruments AS, Lier, Norwegen
Pumpe zur Sterilfiltration von Flüssigkeiten	Fixed Speed peristaltic pump XX8020230	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts
Reinstwasseranlage	Purelab plus	ELGA LabWater, Celle
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HSP 18	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermocycler	ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
	Biometra <sup>®</sup> T3	Biometra, biomedizinische Analytik AG, Göttingen
Vakuum-Saugvorrichtung für Pasteurpipetten	Vacu Safe	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
	Vibrofix VF 1	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	Shake Temp SW23	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zell-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Feinoptik Blankenburg, Blankenburg
Zentrifugen	Costar <sup>®</sup> MINIzentrifuge Modell 10	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande

<b>Gerät/Gebrauchsgegenstand</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
	Megafuge 1 OR	Haereus Instruments Labortechnik GmbH, Hanau
	Multifuge 3 SR	Haereus Instruments Labortechnik GmbH, Hanau
	Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg

### 10.1.2.2 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Tab. 10.4 Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände

<b>Material</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Alufolie	Alufolie 100 m × 50 cm × 0,05 mm	Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG, Hamburg
Blutentnahmesystem	Membran Adapter zur Verwendung mit S-Monovette <sup>®</sup> Kanüle	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	Multifly Set 20G, Schlauch 8 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
	S-Monovette <sup>®</sup> , 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Desinfektionsmittel	Korsolin	Bode Chemie AG, Hamburg
	Sterilium Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie AG, Hamburg
	Virkon S	Antec international Ltd., Sudbury, Großbritannien
Entsorgungsbeutel	Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glas-Messpipetten	BLAUBRAND <sup>®</sup> (10 ml), AR-Glas, Klasse AS	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
	BLAUBRAND <sup>®</sup> ETERNA, Typ 3 (10 ml), AR-Glas, Klasse AS	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Glasspülmittel	Neodisher LM3	Chemische Fabrik Dr. Weigert GmbH & Co. KG, Hamburg
Glaswaren	Schott Duran	Schott AG, Jena



<b>Material</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Kanülen	Einmalkanülen Easy Lance 20G	WDT, Garbsen
Mikrotiter-/ Reaktionsplatten	96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Costar® 24Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated, New York, Vereinigte Staaten von Amerika
	Deep Well Plate PP, 1,2 ml	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
	MicroAmp™ Optical 96- Well Reaction Plate	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
	Mikrotestplatten, 96 Vertiefungen rund	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
	Nunc Maxisorp F96-Well- Platten	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Nukleinsäureentferner	DNase Away	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	DNase Away Tücher	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	RNAse Away	Molecular Bio Products Inc., San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika
Pasteur-Pipetten	Pasteur-Pipette, Glas, Einweg	VWR International GmbH, Dresden
Petrischalen	Petrischalen 90 x 16,2 ohne Nock, bestrahlt	VWR International GmbH, Dresden
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. standard 20-300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	epT.I.P.S.- Standard/Bulk 50-1250 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Filtertips TipOne (10 µl, 200 µl und 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg

<b>Material</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Plattenabdeckfolien	neoLab-Pipettenspitzen aus PP blau für Vol v. 101-1000 µl	neoLab Migge Laborbedarf Vertiebs GmbH, Heidelberg
	Standardtips 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
	Nunc Sealing Tape SI	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Reagenz-Reservoir	Rotilabo®-Abdeckfolien für Mikrottestplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
	Reagenz-Reservoir 25 ml, steril	VWR International GmbH, Dresden
Reaktionsgefäße	Reagenz-Reservoir 25 ml, unsteril	VWR International GmbH, Dresden
	Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schutzhandschuhe	Thermotube™ PCR Tubes 0,2 ml	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Nitrilhandschuhe, puderfrei Supreno	Microflex Corporation, Wien, Österreich
	Puderfreie latex Untersuchungshandschuhe, nicht steril	Shield Scientific, Arnhem, Niederlande
Spritzen	Einmalspritzen 20 ml Injekt® Luer Solo sterile	Braun Melsungen AG, Melsungen
	Einmalspritzen Injekt® 2 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Pressure filtration uni, sterile-EO, non pyrogenic, SFCA membrane	Sartorius stedim Biotech GmbH, Göttingen
Transportkisten	Werkzeugkasten Basic 16“	Curver Kunststoff GmbH, Dreieich
	SteriSet®	Wagner GmbH, München

<b>Material</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Überärmel	Überärmel PE weiss	VWR International GmbH, Dresden
Zentrifugenröhrchen	PP-Test Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 10.1.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 10.5 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
2 %ige Malachitgrün-Lösung		
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Biochrom KG, Berlin
2-Mercaptoethanol reinst, research grade	HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Heidelberg New York
2-Propanol chemisch rein	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Remmingen
Agar-Agar, bakteriologisch, hochrein		Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Amphotericin B		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin	BSA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Carbenicillin		Serva Feinbiochemica Heidelberg, Heidelberg New York
Caseinpepton		Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Dinatriumhydrogenphosphat-12-Hydrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O	VEB Laborchemie Apolda, ehem. Deutsche Demokratische Republik
Eigelbsuspension		BD, Heidelberg
Ethanol rein	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Merck KGaA, Darmstadt
Fleischextrakt „Lab Lemco“		Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Glycerin		Merck KGaA, Darmstadt
Heparin		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hexapyridiniumchlorid	HPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kälberblut		Gerd Fiebig GmbH, Berlin
Kaliumchlorid	KCl	VEB Laborchemie Apolda, ehem. Deutsche Demokratische Republik
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	VK Labor- & Feinchemikalien, ehem. Deutsche Demokratische Republik
Middlebrook OADC-Supplement		BD, Heidelberg
Middlebrook-Agar 7H10		BD, Heidelberg
Middlebrook-Bouillon 7H9		BD, Heidelberg
Mycobactin J		Allied Monitor Incorporation, Fayette, Vereinigte Staaten von Amerika
Nähragar I		SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin
Natriumcarbonat-10-Hydrat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> × 10H <sub>2</sub> O	Isokommerz, VE Außen- und Binnenhandelsbetrieb, Herzberg/Elster, ehem. Deutsche Demokratische Republik
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Riedel de Haën AG, Seelze-Hannover
Natriumhydroxid	NaOH	Lachema o.p., Brno, Tschechien
Natriumpyruvat		Merck KGaA, Darmstadt
Polymyxin B		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Summenformel</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Tween20	Serva Feinbiochemica Heidelberg, Heidelberg New York
Salzsäure, 37 %ig	HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure, 95-97 % zur Analyse	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Trimethoprim		ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt am Main

#### 10.1.2.4 Kits und Fertiglösungen

Tab. 10.6 Kits und Fertiglösungen

<b>Methode</b>	<b>Artikelbezeichnung</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNA-Verdau	RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transkription	Omniscript RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden
-RNase-Hemmung	Recombinant RNasin <sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
-Primer	Random Hexamers	Jena Bioscience GmbH, Jena
real-time PCR	SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Antikörper- ELISA	ID Screen <sup>®</sup> Paratuberculosis Indirect	ID-VET, Montpellier, Frankreich

### 10.1.2.5 Reagenzien für die Zellisolation

Tab. 10.7 Verwendete Reagenzien für die Zellisolation

<b>Medien und Lösungen zur Isolation von PBMC</b>	
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin
Lymphozytenseparationsmedium 1077 (LSM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
RPMI 1640 mit stabilem Glutamin und Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypan Blue, 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung	Biochrom KG, Berlin
<b>PBMC-Stimulantien</b>	
Concanavalin A, Lectin from <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Geflügeltuberkulin-PPD (aPPD)	WDT eG, Serumwerk Memsen, Hoyershagen
Johnin-PPD (jPPD)	ID-Lelystad, Lelystad, Niederlande
LacZ	John Bannantine, Iowa, Vereinigte Staaten von Amerika
MAP 1272c	John Bannantine, Iowa, Vereinigte Staaten von Amerika
MAP 1204	John Bannantine, Iowa, Vereinigte Staaten von Amerika
MAP 2077e	John Bannantine, Iowa, Vereinigte Staaten von Amerika
MAP 3481	John Bannantine, Iowa, Vereinigte Staaten von Amerika
Staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

### 10.1.2.6 Antikörper und ELISA-Komponenten

Alle verwendeten Antikörper wurden von AbD Serotec, Düsseldorf bezogen. Sie wurden bei -20 °C gelagert

*Antikörper aus der Maus*

Bezeichnung	Antigen- spezifität	Klon	Anti- körper- klasse	Markierung	Funktion/ Verwendung
Mouse anti bovine Interleukin-10: Low Endotoxin	IL-10	CC320	IgG1	—	IL-10-Blockierung in der Zellkultur
Mouse IgG1 Negative Control: Low Endotoxin	Mouse IgG1 Negative Control	—	IgG1	—	Antikörper-Isotypen-Kontrolle
Mouse anti bovine Interleukin-10	IL-10	CC318	IgG2b	—	Beschichtungsantikörper, ELISA
Mouse anti bovine Interleukin-10: Biotin	IL-10	CC320	IgG1	Biotin	Detektionsantikörper, ELISA
Mouse anti bovine Interferon gamma	IFN- $\gamma$	CC330	IgG1	—	Beschichtungsantikörper, ELISA
Mouse anti bovine Interferon gamma: Biotin	IFN- $\gamma$	CC302	IgG1	Biotin	Detektionsantikörper, ELISA

Tab. 10.9 Auflistung der verwendeten ELISA-Komponenten

Komponente	IL-10	IFN- $\gamma$
Standardlösung	rekombinantes bovines IL-10, 4400 U/ml Moredun Research Institute, Sean Wattegedera, Penicuik, Schottland	lyophilisiertes rekombinantes bovines IFN- $\gamma$ Bezeichnung "Recombinant bovine Interferon Gamma" 275 ng/ml, in 0,7 %iger NaCl-Lösung gelöst AbD Serotec, Düsseldorf
Konjugat	Streptavidin-Konjugat, Meerrettichperoxidase markiert AbD Serotec, Düsseldorf	
Enzymsubstrat	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (TMB) a) Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen b) Invitrogen Corporation Camarillo, Vereinigte Staaten von Amerika	
Stopplösung	1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , eigene Herstellung	

### 10.1.2.7 Primer

Tab. 10.10 Primer-Sequenzen IS900 und IS1245 PCR

Speziesdiagnose	Nachweis von	Primer-Bezeichnung	Quelle	t <sub>a</sub> (°C)	Sequenz	Produkt (bp)
<i>M. avium</i> spp. <i>paratuberculosis</i>	IS900	S204	Englund et al., 1999	60	5'-TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A-3'	563
		S749			5'-CGC GGC ACG GCT CTT GTT-3'	
<i>M. avium</i> spp. <i>hominisuis</i>	IS1245	A1245	Guerrero et al., 1995	60	5'- GCC GCC GAA ACG ATC TAC -3'	425
		B1245			5'-AGG TGG CGT CGA GGA AGA C-3'	

Erläuterungen: t<sub>a</sub> = Annealing-Temperatur, bp = Anzahl der Basenpaare, IS = Insertionssequenz, spp = Spezies



Tab. 10.11 Primer für die Bestimmung der Genexpression verschiedener Zytokine mittels quantitativer RT-real-time PCR (modifiziert nach Appelt, unveröffentlicht)

Primer Nr.	Name	Accession number	t <sub>a</sub> (°C)	Sequenz	Produkt (bp)	Quelle
1	IFN- $\gamma$ F	AY603405	56	TTC CGG TGG ATG ATC TGC	148	Tourais-Esteves et al. 2008
	IFN- $\gamma$ R		58	GAG AAC CAT TAC ATT GAT GCT C		
2	IL-10 F	DQ837159	55	TTT CAA ATG AAG GAC CAA CTG	169	Tourais-Esteves et al. 2008
	IL-10 R		58	GAG TTC ACG TGC TCC TTG AT		
3	TNF $\alpha$ F	D86587	61	GGC TCT CCT GTC TCC CGT	335	Egan et al. 1996/ Schnittger et al. 2000
	TNF $\alpha$ R		58	GTT GGC TAC AAC GTG GGC		
4	TGF $\beta$ F	X76916	60	GAA CTG CTG TGT TCG TCA GC	169	Smeed et al. 2007
	TGF $\beta$ R		60	GGT TGT GCT GGT TGT ACA GG		
5	GAPDH F	AJ431207	60	GGT GAT GCT GGT GCT GAG TA	265	Smeed et al. 2007
	GAPDH R		58	TCA TAA GTC CCT CCA CGA TG		
6	IL-12p40 F	AY603406	58	AAC CTG CAA CTG AGA CCA CT	186	Tourais-Esteves et al. 2008
	IL-12p40 R		56	ATC CTT GTG GCA TGT GAC TT		

Erläuterungen: t<sub>a</sub> = Annealing-Temperatur, bp = Anzahl der Basenpaare, Nr. = Nummer, F = forward, R = reverse, IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, IL = Interleukin, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha

### 10.1.2.8 Puffer, Lösungen, Medien

Tab. 10.12 Rezepte verwendeter Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Rezept
0,75 %ige Middlebrook OADC-Lösung	7,5 g Middlebrook OADC-Supplement Ad 1000 ml Aqua bidest.
1 x PBS	100 ml 10 x PBS Ad 1000 ml Aqua bidest.
10 %iges 2-Propanol	100 ml 2-Propanol Ad 1000 ml Aqua bidest.
10 x PBS (pH 7,4)	80,0 g NaCl 36,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,0 g KCl ad 1000 ml Aqua bidest. (pH mit 1N NaOH einstellen)
70 %iges 2-Propanol	700 ml 2-Propanol Ad 1000 ml Aqua bidest.
1N HCl-Lösung	83,2 ml HCl Ad 1000 ml Aqua bidest.
1N NaOH-Lösung	40,0 g NaOH Ad 1000 ml Aqua bidest.
Beschichtungspuffer (pH 9,5-9,8)	2,15 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> × 10H <sub>2</sub> O 1,45 g NaHCO <sub>3</sub> ad 500 ml Aqua bidest.
Blockierungspuffer (pH 7,4)	100 ml 10 x PBS 5,0 g bovines Serumalbumin (= 0,5 %) ad 1000 ml Aqua bidest.

<b>Puffer/Lösung/Medium</b>	<b>Rezept</b>
Blutagarplatten	35 g Nähragar I 4,0 g Agar-Agar 75 ml Kälberblut Ad 1000 ml Aqua bidest
Hanks-Puffer ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	0,4 g KCl 0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,00 g NaCl 0,35 g NaHCO <sub>3</sub> 0,121 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O 1,00 g D-Glucose Ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,2-7,4, sterilisieren
Heparinlösung (5000 U/ml)	in 100 ml Hanks-Puffer ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
Heparin-Gebrauchslösung (750 U/ml)	Heparinlösung 1: 6,7 in Hanks-Puffer ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>
Herrold's Egg Yolk Medium	4,0 g NaCl 9,0 g Caseinpepton 2,7 g Fleischextrakt "Lab Lemco" 15,0 g Agar-Agar 27 ml Glycerin 5,0 ml Malachitgrünlösung (2 %ig) 100 ml Eigelbsuspension 10,0 mg Amphotericin B 2 × 10 <sup>6</sup> I. E. Polymyxin B 50,0 mg Carbenicillin 10 mg Trimethoprim 4,1 g Natriumpyruvat ad 1000 ml Aqua bidest

<b>Puffer/Lösung/Medium</b>	<b>Rezept</b>
Herrold's Egg Yolk Medium mit Mycobactin	Siehe Herrold's Egg Yolk Medium 2,0 mg Mycobactin J
Middlebrook-Bouillon mit Mycobactin	4,7 g Middlebrook-Bouillon 7H9 2,0 ml Glycerin 100 ml Middlebrook OADC-Supplement 2,0 ml Mycobactin J ad 1000 ml Aqua bidest
Middlebrook-Nährboden mit Mycobactin	19,0 g Middlebrook-Agar 7H10 2,0 ml Glycerin 100 ml Middlebrook OADC-Supplement 2,0 ml Mycobactin J 10 ml Amphotericin B (1 %ig) ad 1000 ml Aqua bidest
RPMI-Zellkulturmedium	RPMI 1640 10 % FKS 1 % Penicillin-Streptomycin 10 mM Hepes-Puffer
Stopplösung	2,66 ml 95 %iger H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 100 ml Aqua bidest.
Verdünnungspuffer (pH 7,4)	100 ml 10 x PBS 5,0 g bovines Serumalbumin (= 0,5 %) 0,5 ml Tween20 (= 0,05 %)
Waschpuffer (pH 7,4)	2000 ml 1 × PBS 1 ml Tween20 (0,05 %)

### 10.1.3 Durchführung der Zytokin-ELISAs

Tab. 10.13 Durchführung der ELISAs für IFN- $\gamma$  und IL-10

Arbeitsschritt	Interleukin – 10	Interferon – gamma
<b>1. Platten- beschichtung</b>	Beschichtungsantikörper CC318 (1 mg/ml): Endkonzentration 2 $\mu$ g/ml	Beschichtungsantikörper CC330 (1 mg/ml): Endkonzentration 1 $\mu$ g/ml
	Antikörper in Beschichtungspuffer verdünnen je 100 $\mu$ l/Well mit Achtkanalpipette auspipettieren Platten abdecken, über Nacht in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubieren Platten waschen	
<b>2. Blockierung unspezifischer Bindungen</b>	je 300 $\mu$ l Blockpuffer/Well mit Mehrkanalpipette auspipettieren Platten abdecken, über Nacht in feuchter Kammer bei 4 °C inkubieren Platten waschen	
<b>3. Auftrag Standard</b>	Verdünnungsreihe wie beschrieben anlegen, je 50 $\mu$ l/Well auftragen	
<b>4. Auftrag Proben</b>	je 50 $\mu$ l/Well der Proben unverdünnt auftragen, pro Tier und Stimulans 3 Wells belegen 1 h Inkubation, abgedeckt bei Raumtemperatur Platten waschen	
<b>5. Auftrag Detektions- antikörper</b>	Detektionsantikörper CC330-Biotin (1 mg/ml) Endkonzentration 1 $\mu$ g/ml	Detektionsantikörper CC302-Biotin (0,5 mg/ml) Endkonzentration 1 $\mu$ g/ml
	Antikörper in Blockpuffer verdünnen je 100 $\mu$ l/Well mit Mehrkanalpipette auspipettieren 1 h Inkubation, abgedeckt bei Raumtemperatur Platten waschen	
<b>6. Auftrag Enzym- konjugat</b>	Streptavidin-Meerrettichperoxidase 1: 10000 in Reagenzienverdünnungspuffer verdünnen und je 100 $\mu$ l/Well auftragen 1 h Inkubation, abgedeckt bei Raumtemperatur Platten waschen	
<b>7. Auftrag Enzysubstrat</b>	je 100 $\mu$ l/Well TMB auftragen und im Dunkeln inkubieren	
	20 min	10 min
<b>8. Zugabe der Stopplösung</b>	je 100 $\mu$ l/Well 1N Schwefelsäure zugeben Messung der Extinktion	

### 10.1.4 Beurteilungskriterien und Graduierung der pathohistologischen Veränderungen, Übersicht über entnommene Gewebeproben

Tab. 10.14 Beurteilungsschlüssel der immunhistochemischen Veränderungen und des Erregergehaltes in den Lokalisationen des Darms sowie der Lymphknoten des Magen-Darm Traktes

Score	Befund
<b>Beurteilung der immunhistochemischen Befunde in den Lokalisationen des Darmes (Gewebeveränderungen und Menge nachgewiesener Mykobakterien)</b>	
0	alle Lokalisationen ohne besonderen Befund
1	folgende Veränderungen an den Peyer'schen Platten des <i>Jejunums</i> und maximal zwei weiteren Lokalisationen: = lymphozytäre Infiltrate (Riesen- und/oder Epitheloidzellen) = fokale pauzibazilläre Infiltrate (Epitheloid- und/oder Riesenzellen)
2	folgende Veränderungen an den Peyer'schen Platten des <i>Jejunums</i> und mehr als zwei weiteren Lokalisationen: = multifokale pauzibazilläre Infiltrate (Epitheloid- und/oder Riesenzellen) = multifokale multibazilläre Infiltrate (Epitheloid- und/oder Riesenzellen) = diffuse multibazilläre Infiltrate (Epitheloid- und/oder Riesenzellen)
<b>Beurteilung der immunhistochemischen Befunde in den Lymphknoten des Magen-Darm-Traktes (Gewebeveränderungen und Menge nachgewiesener Mykobakterien)</b>	
0	alle beprobten Lymphknoten ohne besonderen Befund
1	folgende granulomatöse Veränderungen: = fokale/multifokale pauzibazilläre Infiltrate (Riesen- und/oder Epitheloidzellen) = multifokale/diffuse multibazilläre Infiltrate (Epitheloid- und/oder Riesenzellen) = Granulom(e) und granulomatöse Infiltrate (paузibazillär)
2	Granulom(e) folgender Charakterisierung: = mit ausgedehnter Nekrose, paузibazillär = mit ausgedehnter Nekrose, multibazillär = Lymphknoten vollständig durch Granulom mit ausgedehnter Nekrose ersetzt
<b>Beurteilung des immunhistochemischen Nachweises von Mykobakterien in den Lokalisationen des Darmes</b>	
0	kein immunhistochemischer Nachweis von Mykobakterien
1	wenige bis zahlreiche Mykobakterien im Gewebe nachweisbar
2	massenhaft Mykobakterien im Gewebe nachweisbar
<b>Beurteilung des immunhistochemischen Nachweises von Mykobakterien in den Lymphknoten des Magen-Darm-Traktes</b>	
0	kein immunhistochemischer Nachweis von Mykobakterien
1	wenige bis zahlreiche Mykobakterien im Gewebe nachweisbar
2	massenhaft Mykobakterien im Gewebe nachweisbar

Tab. 10.15 Übersicht über die Probenlokalisationen und die Anzahl der entnommenen Proben pro Lokalisation für die pathohistologischen Untersuchungen und den kulturellen Erregernachweis für jedes Tier

Beprobte Lokalisation	Anzahl der entnommenen Proben pro Tier für die		
	Pathohistologische Untersuchung	Kulturelle Untersuchung	Organsystem
<i>Duodenum</i>	1	1	MD
<i>Jejunum</i>	4	3	MD
<i>Ileum</i>	3	2	MD
<i>Caecum</i>	1		MD
<i>Ileocaecalklappe</i>	1	1	MD
<i>Proximales Colon</i>	1	1	MD
<i>Ansa centralis</i>	1		MD
<i>Distales Colon</i>	1		MD
<i>Rektum</i>	1		MD
<i>Lnn. jejunales</i>	2	3	LS
<i>Lnn. ileocolici</i>	1	1	LS
<i>Lnn. colici</i>	1		LS
<i>Ln. hepaticus</i>	1	1	LS
<i>Ln. inguinalis superficialis</i>	1		LS
<i>Ln. cervicalis superficialis</i>		1	LS
<i>Ln. retropharyngealis</i>	1	1	LS
<i>Peyer'sche Platten des Jejunums</i>	2	1	MD
<i>Tonsille</i>	1	1	EX
<i>Thymus</i>	1		EX
<i>Milz</i>	1	1	EX
<i>Knochenmark</i>	1		EX
<i>Leber</i>	1	1	EX
<i>Pankreas</i>	1		EX
<i>Niere</i>	1	1	EX
<i>Nebenniere</i>	1	1	EX
<i>Lunge</i>	1		EX
<i>Aorta</i>	1		EX
<i>Herz</i>	1		EX
<i>Rumen</i>	1		EX
<i>Abomasum</i>	1		EX

Erläuterungen: MD = Magen-Darm-Trakt, LS = Lymphatisches System, EX = externe Organe

## 10.2 Ergebnisse

### 10.2.1 Ergebnisse der Zytokinbestimmung mittels *in-house* ELISAs

Tab. 10.16 IFN- $\gamma$ -Reaktion der Einzeltiere nach Restimulation von PBMC mit jPPD (4  $\mu$ g/ml) als heat-map dargestellt. Die niedrigsten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen sind grün dargestellt. Mit zunehmender Konzentration wechselt die Farbe des Feldes über gelb zu rot. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Einzelbestimmungen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP).

Wochen p. i.	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
<b>Tiernummer</b>	<b>Kontrollgruppe 1</b>										
1	0.000	0.022	0.000	0.021	0.000	0.020	0.054	0.000	0.069		
2	0.000	0.000	0.000	0.191	0.034	0.000	0.057	0.000	0.031	0.000	0.057
3	0.000	0.000	0.000	0.016	0.050	0.013	0.039	0.180	0.035	0.063	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.021	0.075	0.000	0.034	0.044	0.034
5	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.080	0.040	0.040	0.032	0.025
6	0.000	0.016	0.000	0.023	0.045	0.000	0.066	0.000	0.067	0.000	0.044
<b>Versuchsgruppe 1</b>											
7	0.000	0.107	0.000	0.327	1.404	7.175	1.424	2.734	2.299	0.821	4.449
8	0.000	0.055	0.040	0.359	2.139	14.602	5.389	12.376	2.848	1.797	4.306
9		0.302	0.637	0.941	1.142	1.808	1.500	1.173	1.065	0.180	0.582
10	0.241	0.031	0.065	0.925	1.177	2.821	1.154	0.755	1.596	0.458	0.351
11	0.000	0.109	0.447	2.792	1.965	9.349		17.946	2.523	1.175	2.873
12	0.685	0.025	0.000	0.141	0.918	1.389	2.931	0.748	1.194	0.548	1.359
13	0.382	0.398	3.158	0.586	0.170	1.487	0.422	0.177	0.124	0.304	0.475
<b>Versuchsgruppe 2</b>											
14	0.392	0.113	1.651	0.417	15.191	1.453	1.626	1.398	1.448		
15	0.000	0.180	0.153	0.826	1.412	5.925	4.764	3.063			
16	0.448	2.787	1.120	0.389	0.392	0.402	0.384	0.074			
17	0.000	0.036	1.005	5.132	2.799	1.540	2.734	0.246	0.637		
18	0.276	0.026	0.041	0.000	0.283	0.239	0.412	3.773	3.586	6.694	9.997
19	0.130	0.411	0.431	0.099	0.627	0.108	0.166	0.000	0.049	0.127	0.032
20	0.000	0.018	0.048	0.375	15.128	14.848	7.184	15.121	3.530	0.528	5.196
<b>Kontrollgruppe 2</b>											
21	0.000	0.000	0.026	0.045	0.014	0.043	0.016	0.034	0.000	0.044	0.017
22	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.082	0.037	0.000	0.000	0.000
23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.354	0.034	0.016	0.000	0.017
24	0.000	0.000	0.020	0.014	0.000	0.000	0.071	0.079	0.000	0.000	0.000
25	0.000	0.000	0.015	0.038	0.000	0.100	0.053	0.056	0.000	0.000	0.024
26	0.000	0.000	0.022	0.021	0.035	0.027	0.000	0.050	0.025	0.000	0.019
<b>Versuchsgruppe 3</b>											
27	0.050	0.115	0.769	1.660	5.204	4.647	1.568	1.181	0.415	0.417	0.446
28	0.000	0.051	0.267	0.980	1.478	2.268	3.841	2.471	0.212	0.030	0.000
29	0.061	0.066	0.093	1.066	1.345	3.571	1.712	2.333	0.723	0.273	1.104
30	0.000	0.000	0.025	1.115	2.557	4.593	3.730	2.361	0.281	0.145	0.752
31	0.000	0.120	1.613	1.758	7.524	2.990	2.638	1.148	0.206	0.869	0.647
32	0.054	0.043	1.021	0.519	1.518	1.668	0.596	0.156	0.138	0.086	0.267
<b>Versuchsgruppe 4</b>											
33	0.056	5.313	2.644	3.507	1.201	0.485	0.215	0.558			
34	0.000	0.202	2.393	7.582	5.768	4.498	11.270	3.319	9.522	0.672	1.900
35	0.000	0.000	0.929	1.936	1.309	6.342	2.861	11.211	0.999	0.104	0.778
36	0.047	0.000	1.477	1.260	2.351	2.435	1.558	1.390	0.616	0.280	0.335
37	0.000	1.274	1.024	2.313	8.759	5.536	0.981	0.552	1.865	0.652	1.002
38	0.049	0.645	1.124	0.457	0.355	0.300	0.441	0.193	2.594	0.029	0.684
39	0.051	0.710	2.328	2.164	2.069	2.927	1.415	1.784	0.808	0.907	0.487

Erläuterungen: p. i. = post inoculationem



Tab. 10.17 Mittlere IFN- $\gamma$ -Reaktion in den Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KBE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KBE MAP) von unstimulierten PBMC und PBMC nach einer Restimulation mit jPPD, ConA oder SEB.

Wochen <i>p. i.</i>	Versuchsgruppe 2								Versuchsgruppe 3							
	Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	unstimuliert		jPPD 4 $\mu$ g/ml		ConA, 20 $\mu$ g/ml		SEB, 4 $\mu$ g/ml		unstimuliert		jPPD 4 $\mu$ g/ml		ConA, 20 $\mu$ g/ml		SEB, 4 $\mu$ g/ml	
8	<b>0,000</b>		<b>0,130</b>		<b>0,161</b>		—		<b>0,000</b>		<b>0,025</b>		<b>0,133</b>		<b>0,078</b>	
	0,000	0,000	0,000	0,448	0,000	0,514	—	—	0,000	0,123	0,000	0,061	0,057	0,253	0,046	0,184
12	<b>0,036</b>		<b>0,113</b>		<b>0,185</b>		<b>0,087</b>		<b>0,000</b>		<b>0,059</b>		<b>0,115</b>		<b>0,055</b>	
	0,013	0,230	0,018	2,787	0,098	2,339	0,058	0,115	0,000	0,055	0,000	0,120	0,087	0,134	0,000	0,086
16	<b>0,000</b>		<b>0,431</b>		<b>0,305</b>		<b>0,175</b>		<b>0,032</b>		<b>0,518</b>		<b>0,454</b>		<b>0,159</b>	
	0,000	0,048	0,041	1,651	0,155	1,297	0,102	0,478	0,000	0,074	0,025	1,613	0,028	1,353	0,017	0,714
20	<b>0,014</b>		<b>0,389</b>		<b>0,262</b>		<b>0,322</b>		<b>0,039</b>		<b>1,091</b>		<b>1,161</b>		<b>0,568</b>	
	0,000	0,049	0,000	5,132	0,119	3,374	0,099	4,888	0,000	0,067	0,519	1,758	0,395	1,292	0,123	1,079
24	<b>0,029</b>		<b>1,412</b>		<b>0,815</b>		<b>0,583</b>		<b>0,060</b>		<b>2,038</b>		<b>0,604</b>		<b>0,886</b>	
	0,000	0,080	0,283	15,191	0,250	8,184	0,146	3,843	0,026	0,099	1,345	7,524	0,309	1,368	0,278	1,489
28	<b>0,064</b>		<b>1,453</b>		<b>0,991</b>		<b>0,458</b>		<b>0,040</b>		<b>3,281</b>		<b>0,547</b>		<b>0,920</b>	
	0,041	0,097	0,108	14,848	0,225	2,832	0,054	6,628	0,020	0,047	1,668	4,647	0,221	1,112	0,299	1,803
32	<b>0,041</b>		<b>1,626</b>		<b>1,001</b>		<b>0,518</b>		<b>0,052</b>		<b>2,175</b>		<b>1,087</b>		<b>0,735</b>	
	0,029	0,048	0,166	7,184	0,284	3,509	0,096	2,685	0,027	0,076	0,596	3,841	0,187	8,338	0,154	2,357
36	<b>0,028</b>		<b>1,398</b>		<b>0,505</b>		<b>0,601</b>		<b>0,028</b>		<b>1,757</b>		<b>0,733</b>		<b>0,716</b>	
	0,000	0,153	0,000	15,121	0,376	2,712	0,095	2,580	0,000	0,053	0,156	2,471	0,072	0,948	0,112	1,200
40	<b>0,040</b>		<b>1,448</b>		<b>0,817</b>		<b>0,366</b>		<b>0,029</b>		<b>0,247</b>		<b>1,034</b>		<b>0,384</b>	
	0,000	0,076	0,049	3,586	0,179	1,723	0,028	1,781	0,000	0,112	0,138	0,723	0,375	1,185	0,272	1,089
44	<b>0,038</b>		<b>0,528</b>		<b>0,680</b>		<b>0,581</b>		<b>0,043</b>		<b>0,209</b>		<b>0,644</b>		<b>0,296</b>	
	0,025	0,064	0,127	6,694	0,422	2,817	0,121	5,801	0,000	0,338	0,030	0,869	0,247	5,322	0,137	3,439
48	<b>0,040</b>		<b>5,196</b>		<b>1,894</b>		<b>2,390</b>		<b>0,023</b>		<b>0,547</b>		<b>0,436</b>		<b>0,461</b>	
	0,014	0,056	0,032	9,997	0,176	2,722	0,036	8,427	0,000	0,043	0,000	1,104	0,124	1,788	0,023	0,637

Erläuterungen: ConA = Concanavalin A, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem, SEB = Staphylococcus aureus Enterotoxin B

Tab. 10.18 Mittlere IFN- $\gamma$ -Reaktion in den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und K2 (42. Lebenstag) nach einer PBMC-Restimulation mit jPPD bzw. aPPD

Woche <i>p. i.</i>	Kontrollgruppe 1				Kontrollgruppe 2			
	Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	jPPD 4 $\mu$ g/ml		aPPD 125 IE/ml		jPPD 4 $\mu$ g/ml		aPPD 125 IE/ml	
8	0,000		0,000		0,000		0,022	
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,110
12	0,000		0,020		0,000		0,000	
	0,000	0,022	0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,048
16	0,000		0,046		0,020		0,015	
	0,000	0,000	0,043	0,052	0,000	0,026	0,000	0,053
20	0,019		0,014		0,018		0,000	
	0,000	0,191	0,000	0,021	0,000	0,045	0,000	0,022
24	0,040		0,007		0,007		0,007	
	0,000	0,059	0,000	0,018	0,000	0,067	0,000	0,027
28	0,007		0,020		0,014		0,000	
	0,000	0,021	0,000	0,045	0,000	0,100	0,000	0,017
32	0,062		0,023		0,062		0,010	
	0,039	0,080	0,015	0,040	0,000	0,354	0,000	0,036
36	0,000		0,000		0,044		0,032	
	0,000	0,180	0,000	0,035	0,034	0,079	0,000	0,041
40	0,038		0,016		0,000		0,000	
	0,031	0,069	0,000	0,040	0,000	0,025	0,000	0,018
44	0,032		0,000		0,000		0,000	
	0,000	0,063	0,000	0,021	0,000	0,044	0,000	0,020
48	0,034		0,063		0,017		0,015	
	0,000	0,057	0,000	0,126	0,000	0,024	0,000	0,021

Erläuterungen: a = aviär, IE = Internationale Einheit, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem

Tab. 10.19 Mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentration in der Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit je zwei verschiedenen Konzentrationen jPPD bzw. aPPD.

Wochen <i>p. i.</i>	Versuchsgruppe 2								Versuchsgruppe 3							
	Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	jPPD, 4 $\mu$ g/ml		jPPD, 25 $\mu$ g/ml		aPPD, 125 IE		aPPD, 625 IE		jPPD, 4 $\mu$ g/ml		jPPD, 25 $\mu$ g/ml		aPPD, 125 IE		aPPD, 625 IE	
8	<b>0,130</b>		<b>0,280</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,025</b>		<b>0,051</b>		<b>0,063</b>		<b>0,075</b>	
	0,000	0,448	0,000	0,599	0,000	0,381	0,000	0,372	0,000	0,061	0,000	0,109	0,000	0,079	0,000	0,124
12	<b>0,113</b>		<b>0,111</b>		<b>0,052</b>		<b>0,096</b>		<b>0,059</b>		<b>0,058</b>		<b>0,050</b>		<b>0,052</b>	
	0,018	2,787	0,019	4,286	0,020	2,636	0,021	3,164	0,000	0,120	0,000	0,107	0,000	0,127	0,038	0,100
16	<b>0,431</b>		<b>0,548</b>		<b>0,174</b>		<b>0,369</b>		<b>0,518</b>		<b>0,530</b>		<b>0,325</b>		<b>0,406</b>	
	0,041	1,651	0,045	1,776	0,059	1,032	0,045	0,793	0,025	1,613	0,021	1,535	0,000	1,329	0,000	1,337
20	<b>0,389</b>		<b>0,554</b>		<b>0,193</b>		<b>0,321</b>		<b>1,091</b>		<b>1,226</b>		<b>0,722</b>		<b>1,159</b>	
	0,000	5,132	0,017	3,620	0,016	4,146	0,013	4,953	0,519	1,758	0,696	2,089	0,435	1,609	0,570	2,032
24	<b>1,412</b>		<b>1,764</b>		<b>0,815</b>		<b>0,952</b>		<b>2,038</b>		<b>2,656</b>		<b>1,284</b>		<b>1,666</b>	
	0,283	15,191	0,283	16,700	0,113	14,413	0,092	16,891	1,345	7,524	1,883	7,265	0,317	2,258	0,630	2,597
28	<b>1,453</b>		<b>1,540</b>		<b>0,841</b>		<b>1,336</b>		<b>3,281</b>		<b>3,335</b>		<b>1,616</b>		<b>1,590</b>	
	0,108	14,848	0,415	16,683	0,022	13,183	0,050	21,388	1,668	4,647	1,411	5,079	0,591	1,935	0,810	2,028
32	<b>1,626</b>		<b>3,114</b>		<b>0,583</b>		<b>1,184</b>		<b>2,175</b>		<b>2,457</b>		<b>0,359</b>		<b>0,504</b>	
	0,166	7,184	0,303	9,853	0,032	3,224	0,041	5,582	0,596	3,841	0,768	4,441	0,114	0,803	0,228	1,186
36	<b>1,398</b>		<b>1,779</b>		<b>0,533</b>		<b>1,388</b>		<b>1,757</b>		<b>1,919</b>		<b>0,126</b>		<b>0,380</b>	
	0,000	15,121	0,056	16,449	0,000	12,066	0,000	13,017	0,156	2,471	0,450	3,017	0,000	0,336	0,083	0,893
40	<b>1,448</b>		<b>1,804</b>		<b>0,086</b>		<b>0,219</b>		<b>0,247</b>		<b>0,464</b>		<b>0,025</b>		<b>0,035</b>	
	0,049	3,586	0,095	3,698	0,013	0,446	0,032	0,916	0,138	0,723	0,361	1,011	0,000	0,137	0,014	0,136
44	<b>0,528</b>		<b>0,809</b>		<b>0,041</b>		<b>0,050</b>		<b>0,209</b>		<b>0,631</b>		<b>0,022</b>		<b>0,090</b>	
	0,127	6,694	0,276	9,874	0,018	1,244	0,022	3,045	0,030	0,869	0,142	1,526	0,000	0,084	0,000	0,255
48	<b>5,196</b>		<b>5,477</b>		<b>1,301</b>		<b>2,054</b>		<b>0,547</b>		<b>0,795</b>		<b>0,043</b>		<b>0,053</b>	
	0,032	9,997	0,043	10,342	0,053	2,815	0,080	3,295	0,000	1,104	0,014	1,353	0,000	0,114	0,020	0,216

Erläuterungen: a = aviär, IE = Internationale Einheit, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem

Tab. 10.20 IL-10-Reaktion der Einzeltiere als heat-map dargestellt. Die niedrigsten IL-10-Konzentrationen sind grün dargestellt. Mit zunehmender Konzentration wechselt die Farbe des Feldes über gelb zu rot. Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP).

Wochen p. i.	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
<b>Tiernummer</b>	<b>Kontrollgruppe 1</b>										
1	0,409	6,752	3,007	0,199	0,404	0,115	0,178	0,132	0,182		
2	0,047	3,369	8,775	0,605	0,186	0,268	0,100	0,058	0,095	0,487	0,000
3	0,047	1,416	4,257	0,044	0,059	0,262	0,647	0,050	0,280	0,203	0,215
4	0,217	1,317	3,062	0,397	0,228	0,114	0,555	0,234	0,000	0,074	1,379
5	0,190	0,292	12,784	0,429	0,436	0,263	0,471	0,211	0,185	0,060	0,413
6	0,042	3,397	3,174	0,765	0,088	0,048	0,102	0,033	0,132	0,193	0,000
<b>Versuchsgruppe 1</b>											
7	0,587	8,644	18,971	1,155	2,805	0,923	0,609	0,407	0,281	0,062	0,094
8	0,451	7,010	11,039	2,369	4,391	1,349	2,525	1,069	0,924	0,285	1,627
9		9,210	8,074	1,083	1,277	0,234	0,540	0,230	0,000	0,167	0,778
10	0,080	4,598	7,906	1,089	1,551	0,636	0,186	0,058	0,162	0,283	0,186
11	0,971	4,221	12,073	1,019	2,175	0,824		0,812	0,128	0,067	1,238
12	0,952	13,698	4,910	1,364	1,327	0,275	0,737	0,104	0,000	0,146	0,086
13	0,378	1,511	7,905	0,341	0,081	0,367	0,277	0,023	0,329	0,269	0,113
<b>Versuchsgruppe 2</b>											
14	1,601	3,845	11,273	0,482	1,380	0,046	0,097	0,169	0,836		
15	1,023	4,630	4,292	0,711	0,632	0,552	0,418	3,574			
16	1,104	8,064	4,415	0,331	0,598	0,108	0,238	0,021			
17	0,998	4,101	15,480	1,945	1,086	0,191	0,348	0,252	0,150		
18	1,329	2,843	9,521	1,277	2,162	0,068	0,409	3,677	0,323	0,458	0,698
19	0,188	3,805	5,239	0,106	0,645	0,054	0,207	0,031	0,311	0,383	0,985
20	0,624	5,200	3,577	1,700	2,713	0,749	0,675	0,831	0,680	0,130	1,410
<b>Kontrollgruppe 2</b>											
21	2,389	1,725	0,348	0,188	1,375	0,075	0,171	0,769	0,000	0,339	0,111
22	2,742	1,818	0,484	0,257	0,081	0,709	0,220	0,030	0,148	0,170	0,089
23	0,495	1,686	0,267	0,234	0,914	0,081	0,538	0,347	0,214	0,065	0,117
24	4,522	6,082	0,385	0,164	0,350	0,218	0,239	0,027	0,219	0,610	0,194
25	1,781	3,112	0,292	0,210	1,701	0,059	0,091	1,537	0,021	0,138	0,097
26	9,000	2,152	1,460	0,471	0,280	0,087	0,465	0,020	0,176	0,094	0,060
<b>Versuchsgruppe 3</b>											
27	3,880	5,555	1,395	1,604	2,877	0,757	0,571	1,448	0,222	0,107	0,027
28	4,341	5,107	1,193	0,850	0,494	0,302	0,508	0,028	0,152	0,711	0,000
29	4,526	0,847	0,211	0,492	0,160	0,158	0,163	0,074	0,095	0,185	0,285
30	18,200	1,030	0,407	0,999	0,031	0,445	0,439	0,103	0,027	0,160	0,092
31	3,345	5,564	2,033	0,911	0,563	0,087	0,653	0,394	0,000	0,103	0,256
32	5,203	3,399	1,100	0,539	2,889	0,298	0,585	0,437	0,124	0,100	0,318
<b>Versuchsgruppe 4</b>											
33	3,593	8,094	2,029	1,241	2,853	0,271	0,451	2,199			
34	3,882	2,827	4,020	3,599	4,695	0,760	0,989	0,230	0,000	0,110	0,130
35	1,707	2,085	2,822	6,885	0,434	0,984	1,634	0,153	0,104	0,207	0,074
36	2,437	1,068	0,701	0,238	0,727	0,104	0,421	0,470	0,028	0,000	0,126
37	0,885	6,601	0,159	0,865	0,166	0,624	1,210	0,017	0,422	0,318	0,069
38	0,266	2,444	0,357	0,214	1,191	0,220	0,634	0,193	0,423	0,054	0,109
39	2,282	2,972	1,687	0,419	0,332	0,363	0,342	0,284	0,102	0,122	0,102

Erläuterungen: p. i. = post inoculationem

Tab. 10.21 Mittlere IL-10-Reaktion in der Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KfE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KfE MAP) von unstimulierten PBMC und PBMC nach einer Restimulation mit jPPD, ConA oder SEB.

Wochen <i>p. i.</i>	Versuchsgruppe 2								Versuchsgruppe 3							
	Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	unstimuliert		jPPD, 4µg/ml		ConA, 20 µg/ml		SEB, 4 µg/ml		unstimuliert		jPPD, 4µg/ml		ConA, 20 µg/ml		SEB, 4 µg/ml	
8	<b>0,244</b>		<b>1,023</b>		<b>2,827</b>		—		<b>0,167</b>		<b>4,434</b>		<b>11,248</b>		<b>3,981</b>	
	0,041	0,939	0,188	1,601	0,641	7,683	—	—	0,052	0,316	3,345	18,200	5,218	17,675	0,617	13,591
12	<b>0,352</b>		<b>4,101</b>		<b>8,912</b>		<b>3,935</b>		<b>0,589</b>		<b>4,253</b>		<b>11,515</b>		<b>11,801</b>	
	0,131	1,213	2,843	8,064	3,753	11,836	2,867	5,002	0,358	2,444	0,847	5,564	5,257	22,193	8,539	27,549
16	<b>1,269</b>		<b>5,239</b>		<b>12,923</b>		<b>4,507</b>		<b>0,179</b>		<b>1,147</b>		<b>3,273</b>		<b>2,676</b>	
	0,901	2,066	3,577	15,480	8,897	23,991	1,705	38,712	0,049	0,353	0,211	2,033	0,776	11,101	0,668	8,988
20	<b>0,336</b>		<b>0,711</b>		<b>3,210</b>		<b>4,041</b>		<b>0,161</b>		<b>0,881</b>		<b>2,487</b>		<b>2,743</b>	
	0,070	1,260	0,106	1,945	0,110	9,240	0,127	7,764	0,065	0,434	0,492	1,604	1,607	6,982	1,621	
24	<b>0,194</b>		<b>1,086</b>		<b>1,572</b>		<b>1,995</b>		<b>0,032</b>		<b>0,529</b>		<b>0,875</b>		<b>3,252</b>	
	0,148	0,368	0,598	2,713	0,869	6,575	0,895	14,824	0,000	0,513	0,031	2,889	0,519	3,888	0,861	7,045
28	<b>0,095</b>		<b>0,108</b>		<b>0,331</b>		<b>2,425</b>		<b>0,154</b>		<b>0,300</b>		<b>0,534</b>		<b>1,499</b>	
	0,040	0,592	0,046	0,749	0,183	0,713	0,069	6,870	0,043	0,764	0,087	0,757	0,167	1,185	0,310	9,325
32	<b>0,254</b>		<b>0,348</b>		<b>0,384</b>		<b>1,239</b>		<b>0,294</b>		<b>0,540</b>		<b>0,925</b>		<b>1,985</b>	
	0,090	0,372	0,097	0,675	0,168	0,866	0,730	4,538	0,207	0,571	0,163	0,653	0,545	2,338	0,672	3,128
36	<b>0,015</b>		<b>0,252</b>		<b>0,331</b>		<b>1,669</b>		<b>0,159</b>		<b>0,249</b>		<b>0,520</b>		<b>1,549</b>	
	0,000	0,170	0,021	3,677	0,000	0,480	0,038	5,076	0,000	0,763	0,028	1,448	0,049	1,210	0,059	3,531
40	<b>0,030</b>		<b>0,323</b>		<b>0,326</b>		<b>1,642</b>		<b>0,098</b>		<b>0,110</b>		<b>0,477</b>		<b>1,404</b>	
	0,000	0,534	0,150	0,836	0,257	0,488	0,360	3,167	0,000	1,106	0,000	0,222	0,371	0,850	0,399	4,009
44	<b>0,196</b>		<b>0,383</b>		<b>0,419</b>		<b>1,412</b>		<b>0,122</b>		<b>0,134</b>		<b>0,456</b>		<b>0,909</b>	
	0,159	0,704	0,130	0,458	0,081	0,504	0,618	1,673	0,000	0,407	0,100	0,711	0,000	0,884	0,000	4,239
48	<b>0,176</b>		<b>0,985</b>		<b>1,068</b>		<b>2,179</b>		<b>0,088</b>		<b>0,174</b>		<b>0,868</b>		<b>1,426</b>	
	0,024	0,433	0,698	1,410	0,996	1,592	0,262	2,678	0,000	0,858	0,000	0,318	0,073	1,663	0,000	3,854

Erläuterungen: ConA = Concanavalin A, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem, SEB = Staphylococcus aureus Enterotoxin B

Tab. 10.22 Mittlere IL-10-Reaktion in den Gruppen K1(3. Lebenstag) und K2 (42. Lebenstag) nach einer PBMC-Restimulation mit jPPD bzw. aPPD

Wochen <i>p. i.</i>	Kontrollgruppe 1				Kontrollgruppe 2			
	Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	jPPD 4µg/ml		aPPD 125 IE		jPPD 4µg/ml		aPPD 125 IE	
8	<b>0,119</b>		<b>0,117</b>		<b>2,566</b>		<b>0,388</b>	
	0,042	0,409	0,043	0,381	0,495	9,000	0,154	1,309
12	<b>2,393</b>		<b>1,719</b>		<b>1,985</b>		<b>1,077</b>	
	0,292	6,752	0,102	8,168	1,686	6,082	0,799	2,386
16	<b>3,716</b>		<b>2,031</b>		<b>0,367</b>		<b>0,325</b>	
	3,007	12,784	0,861	8,501	0,267	1,460	0,189	1,039
20	<b>0,413</b>		<b>0,136</b>		<b>0,222</b>		<b>0,183</b>	
	0,044	0,765	0,054	0,808	0,164	0,471	0,102	0,225
24	<b>0,207</b>		<b>0,126</b>		<b>0,632</b>		<b>0,130</b>	
	0,059	0,436	0,063	0,287	0,081	1,701	0,028	0,357
28	<b>0,189</b>		<b>0,132</b>		<b>0,084</b>		<b>0,166</b>	
	0,048	0,268	0,046	0,345	0,059	0,709	0,050	1,257
32	<b>0,325</b>		<b>0,077</b>		<b>0,230</b>		<b>0,496</b>	
	0,100	0,647	0,040	0,201	0,091	0,538	0,137	1,088
36	<b>0,095</b>		<b>0,173</b>		<b>0,189</b>		<b>0,377</b>	
	0,033	0,234	0,124	1,989	0,020	1,537	0,037	0,884
40	<b>0,157</b>		<b>0,476</b>		<b>0,162</b>		<b>0,306</b>	
	0,000	0,280	0,117	1,201	0,000	0,219	0,232	0,565
44	<b>0,193</b>		<b>0,293</b>		<b>0,154</b>		<b>0,117</b>	
	0,060	0,487	0,041	1,296	0,065	0,610	0,072	3,536
48	<b>0,215</b>		<b>0,469</b>		<b>0,104</b>		<b>0,144</b>	
	0,000	1,379	0,091	1,944	0,060	0,194	0,094	0,283

Erläuterungen: a = aviär, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem

Tab. 10.23 Mittlere IL-10-Konzentration in den Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit je zwei verschiedenen Konzentrationen jPPD bzw. aPPD.

Wochen <i>p. i.</i>	Versuchsgruppe 2								Versuchsgruppe 3							
	Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
	jPPD, 4µg/ml		jPPD, 25 µg/ml		aPPD, 125 IE		aPPD, 625 IE		jPPD, 4µg/ml		jPPD, 25 µg/ml		aPPD, 125 IE		aPPD, 625 IE	
8	<b>1,023</b>		<b>1,191</b>		<b>1,089</b>		<b>1,094</b>		<b>4,434</b>		<b>6,271</b>		<b>3,902</b>		<b>6,277</b>	
	0,188	1,601	0,257	2,326	0,114	1,246	0,179	1,534	3,345	18,200	5,155	9,966	2,362	7,130	0,349	8,792
12	<b>4,101</b>		<b>8,001</b>		<b>3,859</b>		<b>4,197</b>		<b>4,253</b>		<b>4,945</b>		<b>3,552</b>		<b>3,160</b>	
	2,843	8,064	3,751	12,350	2,105	6,498	2,763	8,086	0,847	5,564	0,996	7,913	0,661	5,645	2,194	6,143
16	<b>5,239</b>		<b>8,366</b>		<b>4,246</b>		<b>5,602</b>		<b>1,147</b>		<b>1,349</b>		<b>1,045</b>		<b>0,948</b>	
	3,577	15,480	5,075	15,392	2,333	12,835	3,302	14,313	0,211	2,033	0,309	2,764	0,143	1,789	0,125	1,850
20	<b>0,711</b>		<b>1,267</b>		<b>0,474</b>		<b>0,586</b>		<b>0,881</b>		<b>1,059</b>		<b>0,632</b>		<b>0,821</b>	
	0,106	1,945	0,183	3,527	0,096	1,603	0,128	1,965	0,492	1,604	0,863	2,276	0,382	1,484	0,522	2,158
24	<b>1,086</b>		<b>1,644</b>		<b>1,278</b>		<b>0,635</b>		<b>0,529</b>		<b>0,701</b>		<b>0,299</b>		<b>0,289</b>	
	0,598	2,713	0,538	3,398	0,446	2,105	0,322	1,521	0,031	2,889	0,000	2,844	0,079	1,413	0,156	1,741
28	<b>0,108</b>		<b>0,345</b>		<b>0,162</b>		<b>0,166</b>		<b>0,300</b>		<b>0,410</b>		<b>0,148</b>		<b>0,322</b>	
	0,046	0,749	0,117	0,842	0,043	0,573	0,056	0,631	0,087	0,757	0,102	0,895	0,079	0,786	0,133	1,671
32	<b>0,348</b>		<b>0,531</b>		<b>0,190</b>		<b>0,188</b>		<b>0,540</b>		<b>0,711</b>		<b>0,812</b>		<b>0,628</b>	
	0,097	0,675	0,185	0,637	0,062	0,371	0,067	0,439	0,163	0,653	0,389	1,166	0,171	1,336	0,547	1,407
36	<b>0,252</b>		<b>0,915</b>		<b>0,247</b>		<b>0,183</b>		<b>0,249</b>		<b>0,328</b>		<b>0,173</b>		<b>0,299</b>	
	0,021	3,677	0,018	3,223	0,015	2,516	0,015	5,876	0,028	1,448	0,082	0,617	0,015	0,312	0,117	0,388
40	<b>0,323</b>		<b>0,675</b>		<b>0,427</b>		<b>0,442</b>		<b>0,110</b>		<b>0,155</b>		<b>0,112</b>		<b>0,176</b>	
	0,150	0,836	0,251	1,073	0,041	0,982	0,068	1,092	0,000	0,222	0,000	0,462	0,000	0,503	0,089	0,602
44	<b>0,383</b>		<b>0,415</b>		<b>0,404</b>		<b>0,574</b>		<b>0,134</b>		<b>0,181</b>		<b>0,097</b>		<b>0,176</b>	
	0,130	0,458	0,232	0,645	0,276	1,042	0,346	0,841	0,100	0,711	0,049	0,299	0,000	0,165	0,000	0,786
48	<b>0,985</b>		<b>1,328</b>		<b>1,285</b>		<b>1,429</b>		<b>0,174</b>		<b>0,268</b>		<b>0,171</b>		<b>0,173</b>	
	0,698	1,410	0,777	1,634	0,733	3,044	0,925	2,794	0,000	0,318	0,066	1,112	0,000	1,232	0,000	1,280

Erläuterungen: a = aviär, jPPD = Johnin purified protein derivate, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem

## 10.2.2 Expressionsbestimmung verschiedener Zytokine mittels real-time PCR

Tab. 10.24 Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IFN- $\gamma$  mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen.

Zytokin	Wochen <i>p. i.</i>		16		28		40		48	
	Tier- gruppe	Stimulans	Median		Median		Median		Median	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
IFN- $\gamma$	K1 früh	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>1,389</b>		<b>0,995</b>		<b>0,773</b>		<b>0,839</b>	
			1,150	5,769	0,901	1,952	0,608	0,981	0,567	1,093
		aPPD, 125 IE/ml	<b>1,092</b>		<b>0,852</b>		<b>0,770</b>		<b>0,639</b>	
			0,489	2,003	0,490	0,922	0,398	0,855	0,375	1,291
	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	K2 spät	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>89,036</b>		<b>21,775</b>		<b>18,142</b>		<b>28,970</b>	
			73,605	148,731	11,050	52,530	13,538	23,571	22,420	46,805
		aPPD, 125 IE/ml	<b>2,616</b>		<b>0,808</b>		<b>0,646</b>		<b>0,442</b>	
			1,402	41,143	0,344	3,298	0,112	3,639	0,205	0,552
	unstimuliert	<b>5,817</b>		<b>1,264</b>		<b>0,617</b>		<b>0,469</b>		
		0,632	37,984	0,583	1,713	0,378	4,923	0,283	1,529	
	V1 früh geringe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	<b>72,408</b>		<b>59,650</b>		<b>20,006</b>		<b>30,419</b>	
			0,980	184,184	57,276	63,044	13,310	21,998	5,724	31,695
	V2 früh hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>27,510</b>		<b>115,439</b>		<b>93,073</b>		<b>126,309</b>	
			0,023	123,985	57,712	630,222	0,014	219,557	36,557	208,901
		aPPD, 125 IE/ml	<b>7,336</b>		<b>179,330</b>		<b>35,265</b>		<b>44,308</b>	
			0,032	27,021	64,465	681,685	15,508	92,494	7,738	89,713
	V3 spät geringe Dosis	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	<b>88,055</b>		<b>40,206</b>		<b>31,050</b>		<b>42,882</b>	
			3,473	136,359	21,659	232,566	14,770	48,522	23,274	136,900
	V4 spät hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>43,161</b>		<b>151,351</b>		<b>75,381</b>		<b>114,215</b>	
			1,157	311,481	57,192	235,961	13,949	136,813	1,231	227,198
		aPPD, 125 IE/ml	<b>10,592</b>		<b>54,965</b>		<b>33,665</b>		<b>183,500</b>	
			0,348	330,342	39,156	134,345	6,724	60,606	0,215	366,785
V5 spät hohe Dosis	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	<b>16,625</b>		<b>17,710</b>		<b>54,259</b>		<b>61,048</b>		
		16,359	32,742	1,118	25,821	17,202	91,316	0,235	121,860	
V6 spät hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>358,406</b>		<b>216,658</b>		<b>24,376</b>		<b>161,387</b>		
		127,742	412,985	70,822	374,091	5,138	28,957	30,815	291,959	
	aPPD, 125 IE/ml	<b>371,327</b>		<b>205,299</b>		<b>6,161</b>		<b>22,069</b>		
		332,659	603,142	24,118	236,538	5,795	7,083	9,030	54,136	
V7 spät hohe Dosis	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	<b>81,145</b>		<b>99,600</b>		<b>16,178</b>		<b>20,895</b>		
		13,220	178,380	12,535	296,144	15,306	79,830	20,439	316,097	
V8 spät hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	<b>300,215</b>		<b>125,066</b>		<b>109,106</b>		<b>39,962</b>		
		145,258	788,486	64,453	196,812	29,866	194,577	28,167	69,724	
	aPPD, 125 IE/ml	<b>382,792</b>		<b>123,876</b>		<b>32,519</b>		<b>13,790</b>		
		202,429	546,761	35,487	397,258	7,339	63,800	7,333	25,647	
unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 $\mu$ g/ml	<b>53,798</b>		<b>38,596</b>		<b>35,610</b>		<b>26,714</b>			
	41,381	131,410	36,511	73,936	33,768	62,056	20,072	57,702		

Erläuterungen Tab. 10.24 bis Tab. 10.28: a = aviär, ConA = Concanavalin A, Ct = threshold cycle, IE = Internationale Einheit, IL = Interleukin, IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, jPPD = Johnin purified protein derivate, K = Kontrollgruppe, SEB = Staphylococcus aureus Enterotoxin B, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha, V = Versuchsgruppe



Tab. 10.25 Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IL-10 mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen.

Zytokin	Woche <i>n</i> p. i.		16		28		40		48	
	Tier- gruppe	Stimulans	Median		Median		Median		Median	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
IL-10	K1 früh	jPPD, 4 µg/ml	0,833		1,475		0,908		0,977	
			0,571	1,042	0,561	17,958	0,720	1,720	0,470	1,728
		aPPD, 125 IE/ml	0,880		1,200		1,375		1,414	
			0,622	1,203	0,766	4,954	0,697	2,250	0,718	2,053
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	1,867		2,151		2,978		2,303		
		1,501	2,929	1,019	3,257	2,623	4,826	0,670	6,624	
	K2 spät	jPPD, 4 µg/ml	0,576		0,619		0,578		0,733	
			0,158	0,618	0,414	0,986	0,368	0,751	0,665	2,925
		aPPD, 125 IE/ml	0,446		0,881		0,746		0,628	
			0,361	1,057	0,647	1,081	0,608	1,538	0,602	5,364
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	0,844		2,087		1,461		1,080		
		0,589	2,258	0,826	6,801	0,494	3,250	0,895	2,042	
	V1 früh geringe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	1,336		0,259		0,680		0,524	
			1,005	2,157	0,186	1,124	0,419	2,276	0,315	0,855
		aPPD, 125 IE/ml	1,297		0,355		1,140		0,693	
			0,523	4,110	0,294	0,672	0,931	1,262	0,368	1,436
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	3,347		0,705		1,922		1,565		
		1,370	4,619	0,470	2,032	1,270	2,367	0,209	3,268	
	V2 früh hohe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	0,806		0,168		0,322		1,110	
			0,488	1,336	0,103	0,552	0,180	0,361	0,080	2,140
		aPPD, 125 IE/ml	0,678		0,198		0,366		0,834	
			0,400	1,346	0,108	0,428	0,347	0,456	0,258	1,409
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 µg/ml	0,910		0,567		1,162		1,740			
	0,589	1,603	0,275	1,430	0,991	1,941	0,327	3,152		
V3 spät geringe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	0,430		0,439		0,595		1,030		
		0,268	2,074	0,315	0,645	0,286	1,081	0,476	1,063	
	aPPD, 125 IE/ml	0,659		0,270		0,633		0,638		
		0,463	2,298	0,231	0,756	0,359	1,348	0,453	1,450	
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 µg/ml	1,696		1,347		1,602		0,994			
	0,371	3,705	0,681	4,239	0,812	2,282	0,300	3,598		
V4 spät hohe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	0,251		0,629		0,227		0,509		
		0,226	0,763	0,201	1,048	0,134	1,103	0,414	0,858	
	aPPD, 125 IE/ml	0,471		0,464		0,268		0,427		
		0,237	0,550	0,163	0,551	0,159	0,330	0,293	1,000	
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 µg/ml	0,691		1,062		0,746		1,128			
	0,456	1,417	0,529	5,443	0,306	2,332	0,441	1,350		

Erläuterungen: siehe Tab. 10.24

Tab. 10.26 Ergebnisse der Expressionsbestimmung von TNF $\alpha$  mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen.

Zytokin	Woche n. i.		16		28		40		48	
	Tier- gruppe	Stimulans	Median		Median		Median		Median	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
TNF $\alpha$	K1 früh	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	1,109		1,052		3,238		0,889	
			0,843	1,768	0,377	32,225	0,936	21,608	0,415	1,142
		aPPD, 125 IE/ml	1,477		1,542		2,651		1,112	
			0,828	3,106	1,126	8,871	1,485	21,426	0,853	1,230
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	6,002		5,981		9,164		8,722		
		4,985	13,979	1,241	10,413	6,745	223,183	7,278	11,884	
	K2 spät	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	1,255		0,657		1,524		1,711	
			0,518	28,140	0,268	2,046	0,315	1,904	0,449	1,912
		aPPD, 125 IE/ml	1,552		0,979		1,973		1,688	
			1,053	27,879	0,680	1,228	1,348	3,036	0,965	7,563
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	6,263		4,831		11,889		6,871		
		0,665	17,532	2,483	6,300	5,070	23,783	6,051	9,999	
	V1 früh geringe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	5,349		1,589		3,835		4,986	
			3,254	7,606	1,383	1,917	0,119	9,680	3,321	11,124
		aPPD, 125 IE/ml	5,729		2,204		3,816		5,408	
			5,271	13,070	1,410	3,356	1,767	7,150	2,428	7,410
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	10,344		0,981		3,963		5,374		
		4,593	19,112	0,299	1,291	1,188	4,859	4,303	8,179	
	V2 früh hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	4,782		5,906		3,578		1,291	
			0,777	28,140	2,657	11,191	3,255	9,757	1,086	1,496
		aPPD, 125 IE/ml	4,508		3,312		3,304		0,754	
			1,730	27,879	2,622	5,242	3,084	5,220	0,406	1,101
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 $\mu$ g/ml	6,876		2,291		4,830		0,764			
	1,893	17,532	0,673	5,630	3,608	6,976	0,516	1,011		
V3 spät geringe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	2,588		7,811		4,756		3,553		
		1,666	16,498	5,812	9,989	1,191	6,376	2,493	7,851	
	aPPD, 125 IE/ml	3,300		5,368		3,039		6,197		
		1,880	21,261	3,520	8,607	2,213	3,565	3,562	7,799	
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 $\mu$ g/ml	1,375		6,090		6,564		5,734			
	1,269	24,882	4,150	9,122	4,135	11,652	0,477	7,128		
V4 spät hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	5,973		8,899		6,786		8,650		
		1,171	15,408	2,115	57,814	3,512	25,773	2,200	19,612	
	aPPD, 125 IE/ml	6,188		3,676		4,165		7,802		
		1,505	15,394	1,666	54,416	3,442	7,820	1,422	18,840	
unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 $\mu$ g/ml	2,756		4,482		5,025		8,782			
	2,558	3,482	0,936	19,535	4,043	7,116	2,857	16,604		

Erläuterungen: siehe Tab. 10.24

Tab. 10.27 Ergebnisse der Expressionsbestimmung von TGF $\beta$  mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen

Zytokin	Wochen <i>p. i.</i>		16		28		40		48	
	Tier- gruppe	Stimulans	Median		Median		Median		Median	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
TGF $\beta$	K1 früh	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	0,673		0,823		0,854		1,189	
			0,301	0,769	0,696	11,909	0,649	1,073	0,424	2,011
		aPPD, 125 IE/ml	1,057		0,804		0,784		0,712	
			0,832	1,357	0,072	1,409	0,721	0,867	0,559	0,826
		unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	2,393		0,910		1,377		1,250	
			1,758	2,867	0,714	1,232	0,937	2,086	0,877	2,029
	K2 spät	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	0,653		0,622		0,678		0,495	
			0,257	1,277	0,485	1,682	0,591	0,985	0,384	0,845
		aPPD, 125 IE/ml	0,806		0,654		0,780		0,494	
			0,070	2,411	0,513	1,294	0,447	0,912	0,420	1,380
		unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	1,326		1,058		0,774		0,691	
			0,986	2,808	0,481	1,476	0,698	0,977	0,668	1,502
	V1 früh geringe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	1,543		0,540		2,649		1,779	
			0,844	2,342	0,289	2,374	0,423	2,952	1,018	4,347
		aPPD, 125 IE/ml	3,219		0,957		1,868		1,329	
			2,386	4,142	0,777	2,970	1,558	2,431	0,666	2,995
		unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	3,035		0,534		1,123		1,955	
			1,697	4,244	0,481	1,189	0,814	59,900	0,934	4,298
	V2 früh hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	1,632		1,293		2,261		2,049	
			0,648	2,159	0,977	2,165	2,067	12,047	1,792	2,306
		aPPD, 125 IE/ml	2,540		0,833		1,600		1,934	
			1,049	2,964	0,666	1,131	1,321	8,819	0,459	3,408
		unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000	
			—	—	—	—	—	—	—	—
		SEB, 4 $\mu$ g/ml	1,662		0,751		0,984		0,750	
			0,474	2,291	0,197	1,636	0,631	9,721	0,487	1,013
V3 spät geringe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	0,878		1,641		0,848		2,195		
		0,373	2,304	0,684	1,984	0,449	2,230	1,361	3,029	
	aPPD, 125 IE/ml	1,679		0,915		1,134		1,468		
		0,586	3,663	0,744	1,804	0,737	1,532	1,423	2,480	
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	0,638		0,852		1,071		1,448		
		0,490	2,859	0,465	1,494	0,359	2,349	0,965	2,213	
V4 spät hohe Dosis	jPPD, 4 $\mu$ g/ml	0,772		1,722		1,482		1,941		
		0,569	1,758	0,416	5,934	1,226	10,632	1,287	4,486	
	aPPD, 125 IE/ml	1,187		1,559		0,979		1,450		
		0,756	1,734	0,735	2,734	0,610	1,391	1,303	2,505	
	unstimuliert	1,000		1,000		1,000		1,000		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 $\mu$ g/ml	0,864		0,769		1,222		2,089		
		0,649	2,490	0,161	1,634	1,068	1,289	1,217	4,027	

Erläuterungen: siehe Tab. 10.24

Tab. 10.28 Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IL-12p40 mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen

Zytokin	Wochen p. i.		16		28		40		48	
	Tiergruppe	Stimulans	Median		Median		Median		Median	
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
IL-12p40	K1 früh	jPPD, 4 µg/ml	<b>0,762</b>		<b>1,026</b>		<b>1,033</b>		<b>0,746</b>	
			0,494	1,142	0,716	32,353	0,779	1,582	0,420	1,482
		aPPD, 125 IE/ml	<b>1,126</b>		<b>1,777</b>		<b>0,978</b>		<b>0,747</b>	
			0,801	2,773	0,973	20,227	0,660	1,439	0,469	0,970
	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	<b>0,662</b>		<b>0,634</b>		<b>0,682</b>		<b>0,397</b>		
		0,557	0,749	0,406	1,645	0,510	0,738	0,370	0,647	
	K2 spät	jPPD, 4 µg/ml	<b>0,755</b>		<b>0,712</b>		<b>2,342</b>		<b>0,451</b>	
			0,355	0,848	0,528	0,949	0,434	63,780	0,339	0,624
		aPPD, 125 IE/ml	<b>0,572</b>		<b>0,847</b>		<b>1,490</b>		<b>0,672</b>	
			0,514	3,095	0,542	0,932	0,522	127,732	0,509	1,340
	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	<b>0,495</b>		<b>0,351</b>		<b>1,188</b>		<b>0,317</b>		
		0,305	2,357	0,274	0,584	0,557	60,545	0,287	0,464	
	V1 früh geringe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	<b>0,758</b>		<b>0,494</b>		<b>0,833</b>		<b>0,539</b>	
			0,288	1,117	0,453	0,863	0,637	1,303	0,467	0,608
		aPPD, 125 IE/ml	<b>0,778</b>		<b>0,628</b>		<b>0,719</b>		<b>0,499</b>	
			0,252	1,359	0,265	1,200	0,575	0,742	0,426	0,567
	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	<b>0,571</b>		<b>0,390</b>		<b>0,666</b>		<b>0,389</b>		
		0,222	0,919	0,248	1,102	0,040	0,831	0,329	0,454	
	V2 früh hohe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	<b>0,443</b>		<b>0,629</b>		<b>0,585</b>		<b>2,695</b>	
			0,015	0,848	0,458	0,971	0,523	0,690	1,587	3,803
		aPPD, 125 IE/ml	<b>0,582</b>		<b>0,544</b>		<b>0,531</b>		<b>1,259</b>	
			0,425	3,095	0,326	1,229	0,425	0,728	0,900	1,618
	unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		
		—	—	—	—	—	—	—	—	
	SEB, 4 µg/ml	<b>0,341</b>		<b>0,592</b>		<b>0,454</b>		<b>0,609</b>		
		0,002	2,357	0,263	1,126	0,327	0,689	0,429	0,788	
V3 spät geringe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	<b>0,479</b>		<b>0,555</b>		<b>0,467</b>		<b>0,782</b>		
		0,407	0,966	0,394	0,766	0,233	3,214	0,739	0,824	
	aPPD, 125 IE/ml	<b>0,658</b>		<b>0,427</b>		<b>0,438</b>		<b>0,609</b>		
		0,505	1,039	0,332	0,617	0,147	3,209	0,537	0,678	
unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 µg/ml	<b>0,601</b>		<b>0,439</b>		<b>0,458</b>		<b>0,358</b>			
	0,379	0,775	0,198	0,469	0,224	0,543	0,329	0,507		
V4 spät hohe Dosis	jPPD, 4 µg/ml	<b>1,023</b>		<b>0,868</b>		<b>0,569</b>		<b>0,777</b>		
		0,814	26,734	0,613	2,702	0,452	3,484	0,609	0,863	
	aPPD, 125 IE/ml	<b>0,870</b>		<b>0,654</b>		<b>0,361</b>		<b>0,549</b>		
		0,417	1,037	0,351	0,931	0,135	0,747	0,357	1,412	
unstimuliert	<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>		<b>1,000</b>			
	—	—	—	—	—	—	—	—		
SEB, 4 µg/ml	<b>0,542</b>		<b>0,480</b>		<b>0,573</b>		<b>0,544</b>			
	0,345	0,648	0,251	0,784	0,401	0,613	0,342	1,005		

Erläuterungen: siehe Tab. 10.24

### 10.2.3 Ergebnisse der Antikörperkonzentrationsbestimmung

Tab. 10.29 Qualitative und quantitative Bestimmung der Antikörperreaktion der Einzeltiere

Tier- gruppe	Tier- nummer	Wochen p. i.										
		8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
K1 früh	1	4,837	5,284	27,387	81,941	33,760	30,570	11,128	8,880	17,321		
	2	5,970	3,325	4,887	7,851	-4,852	-1,282	-3,397	2,595	-3,006	2,079	3,658
	3	9,201	8,222	4,488	6,595	9,703	6,944	3,397	-6,231	-1,913	9,007	6,272
	4	2,539	1,023	5,967	11,455	5,662	10,054	-0,445	-7,715	7,967	10,739	11,498
	5	6,107	3,636	2,010	12,129	1,709	8,696	-2,522	3,962	6,005	16,975	35,018
	6	5,586	3,870	1,307	6,030	-2,426	-0,427	-0,816	-5,638	-5,191	6,813	2,439
V1 früh, geringe Dosis	7	4,171	7,159	146,608	600,673	495,833	599,864	569,140	470,082	532,563	546,997	571,803
	8	1,451	2,102	2,387	223,720	469,765	673,777	652,522	537,022	508,430	394,803	353,279
	9	18,839	10,762	193,296	335,678	514,960	402,457	528,669	483,383	437,295	494,573	528,572
	10	3,833	1,451	17,500	318,593	561,725	407,052	435,598	388,130	249,590	218,361	175,958
	11	4,050	3,409	148,932	576,146	483,867	659,104	636,350	557,513	579,214	594,919	660,984
	12	3,998	1,270	6,761	111,997	475,203	436,005	568,614	475,074	271,039	246,651	177,701
V2 früh, hohe Dosis	13	3,177	3,990	2,614	7,161	1,078	-1,068	-4,348	-7,122	0,273	7,159	14,286
	14	2,793	25,998	159,773	223,367	335,175	222,543	235,870	209,199	96,448		
	15	4,474	26,931	196,922	487,331	403,205	559,782	535,312	417,760			
	16	1,874	2,329	2,198	-1,887	-0,320	-2,582	1,632	4,098	10,623		
	17	3,205	41,136	270,000	559,165	436,218	554,212	476,261	362,432	313,164		
	18	19,003	13,543	11,818	17,714	269,003	345,513	501,902	558,161	410,656	535,566	660,279
K2 spät	19	8,543	5,200	83,750	106,910	200,404	208,974	243,070	193,027	110,929	168,706	156,272
	20	2,963	3,069	24,875	428,302	471,795	600,544	599,555	-0,546	416,859	372,056	446,885
	21	4,489	3,329	-0,539	2,351	-0,272	-6,380	-2,595	6,582	13,240	10,164	5,930
	22	8,125	7,098	-1,348	-1,923	-6,522	-8,012	-5,192	4,965	10,802	2,131	2,404
	23	6,136	4,648	1,752	-0,427	-3,533	-3,561	-3,006	4,850	14,111	4,590	1,924
	24	9,261	7,412	-2,561	9,509	5,299	4,006	4,098	6,467	8,885	7,049	-0,481
V3 spät, geringe Dosis	25	5,795	4,272	3,504	1,709	0,951	0,594	1,639	5,312	11,498	15,245	0,000
	26	4,773	4,083	-0,808	-1,816	-1,495	-6,973	-4,781	0,346	6,446	-1,639	-3,365
	27	8,069	145,540	570,620	513,782	680,163	657,715	586,612	612,009	681,185	534,590	583,013
	28	5,625	4,711	-0,269	286,859	493,886	516,617	436,065	426,906	421,951	267,213	221,795
	29	1,591	5,214	93,261	216,667	260,055	220,475	127,322	101,501	84,669	48,361	38,301
	30	0,568	5,905	4,178	191,987	403,532	319,882	153,962	151,501	131,010	91,967	46,955
V4 spät, hohe Dosis	31	4,830	10,050	481,806	463,034	615,490	609,198	524,727	528,176	532,056	416,885	467,468
	32	4,602	7,286	352,695	333,760	305,163	248,368	159,017	139,030	115,679	96,065	71,635
	33	9,375	7,098	28,571	67,201	104,619	94,956	96,038	108,891			
	34	3,296	42,211	560,242	472,222	591,984	574,777	482,104	520,323	568,292	554,918	542,789
	35	8,694	9,297	342,318	312,820	454,755	504,747	384,427	362,586	338,328	292,295	259,615
	36	2,273	3,015	224,124	402,243	593,343	612,760	525,956	503,695	536,934	474,263	388,622
V4 spät, hohe Dosis	37	7,784	18,404	266,981	360,150	482,609	483,680	313,388	306,813	137,108	124,590	66,667
	38	5,170	10,741	8,895	3,312	11,142	15,282	0,410	0,231	10,279	5,410	0,321
	39	2,159	39,762	146,496	172,223	211,549	144,362	111,748	53,811	116,028	71,147	35,897

Erläuterungen: Reaktionen, die als negativ zu werten waren (Cut-off des Herstellers) entsprechen weißen Feldern, fragliche Reaktionen sind durch schwarze Felder mit weißer Schrift und positive Reaktionen durch graue Felder symbolisiert. Befand sich ein Tier zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr im Versuch ist das entsprechende Feld schraffiert. K = Kontrollgruppe, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

### 10.2.4 Darstellung der Zusammenhänge zwischen pathologischen Befunden, Erregernachweis im Kot und den Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand

Tab. 10.30 Einteilung der Versuchstiere in Gruppen entsprechend der ihnen zugeordneten Scores in Abhängigkeit von den pathologischen und immunhistochemischen Befunden

Gewebeveränderungen							
Darm				Lymphknoten des Darmes			
Gruppe	Anzahl Tiere	Tier-gruppe	Tiernummer	Gruppe	Anzahl Tiere	Tier-gruppe	Tiernummer
S0	7	V1	8; 10	S0	4	V1	13
		V2	19; 20			V2	
		V3	32			V3	
		V4	37; 39			V4	33; 38; 39
S1	13	V1	12; 13	S1	1	V1	32
		V2	14; 16; 17			V2	
		V3	27 - 30; 31			V3	
		V4	33; 36; 38			V4	
S2	7	V1	7; 9; 11	S2	22	V1	7 - 12
		V2	15; 18			V2	14 - 20
		V3				V3	27 - 31
		V4	34; 35			V4	34 - 37
Mykobakteriennachweis							
Darm				Lymphknoten des Darmes			
Gruppe	Anzahl Tiere	Tier-gruppe	Tiernummer	Gruppe	Anzahl Tiere	Tier-gruppe	Tiernummer
S0	23	V1	8; 10; 12; 13	S0	20	V1	10; 12; 13
		V2	14 - 20			V2	14; 16 - 19
		V3	29 - 32			V3	27 - 32
		V4	33; 34; 36 - 39			V4	33; 34; 35; 37 - 39
S1	3	V1	9; 11	S1	6	V1	8; 9; 11
		V2				V2	15; 20
		V3				V3	
		V4	35			V4	36
S2	1	V1	7	S2	1	V1	7
		V2				V2	
		V3				V3	
		V4				V4	

Erläuterungen: S = Score

### 10.2.5 Zytokinsekretion nach PBMC-Restimulation mit vier rekombinanten MAP-Proteinen

Tab. 10.31 IFN- $\gamma$ -Sekretion nach Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen in den einzelnen Tiergruppen im Versuchsverlauf.

Tiergruppe	Wochen p. i.	IFN - $\gamma$													
		unstimuliert		jPPD, 4 $\mu$ g/ml		M1272c		M1204		M2077		M3481		LacZ	
		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
V1 früh geringe Dosis	20	<b>0,000</b>		<b>0,586</b>		<b>0,020</b>		<b>0,013</b>		<b>0,016</b>		<b>0,020</b>		<b>0,035</b>	
		0,000	0,021	0,141	2,792	0,000	0,045	0,000	0,024	0,000	0,026	0,000	0,030	0,020	0,036
	32	<b>0,018</b>		<b>1,462</b>		<b>0,023</b>		<b>0,015</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,013</b>	
		0,000	0,057	0,422	5,389	0,000	0,038	0,000	0,044	0,000	0,023	0,000	0,036	0,000	0,096
	44	<b>0,046</b>		<b>0,548</b>		<b>0,017</b>		<b>0,000</b>		<b>0,014</b>		<b>0,014</b>		<b>0,025</b>	
		0,000	0,187	0,180	1,797	0,000	0,024	0,000	0,026	0,000	0,033	0,000	0,025	0,013	0,075
V2 früh hohe Dosis	20	<b>0,014</b>		<b>0,389</b>		<b>0,025</b>		<b>0,019</b>		<b>0,017</b>		<b>0,023</b>		<b>0,045</b>	
		0,000	0,049	0,000	5,132	0,000	0,085	0,000	0,076	0,000	0,061	0,000	0,098	0,034	0,066
	32	<b>0,041</b>		<b>1,626</b>		<b>0,020</b>		<b>0,015</b>		<b>0,013</b>		<b>0,014</b>		<b>0,019</b>	
		0,029	0,048	0,166	7,184	0,000	0,749	0,000	0,027	0,000	0,022	0,000	0,022	0,000	0,029
	44	<b>0,038</b>		<b>0,528</b>		<b>0,019</b>		<b>0,000</b>		<b>0,015</b>		<b>0,018</b>		<b>0,049</b>	
		0,025	0,064	0,127	6,694	0,000	0,276	0,000	0,020	0,014	0,036	0,014	0,039	0,029	0,060
V3 spät geringe Dosis	20	<b>0,039</b>		<b>1,091</b>		<b>0,018</b>		<b>0,015</b>		<b>0,019</b>		<b>0,020</b>		<b>0,023</b>	
		0,000	0,067	0,519	1,758	0,000	0,028	0,000	0,025	0,000	0,029	0,000	0,024	0,023	0,027
	32	<b>0,052</b>		<b>2,175</b>		<b>0,019</b>		<b>0,020</b>		<b>0,010</b>		<b>0,026</b>		<b>0,000</b>	
		0,027	0,076	0,596	3,841	0,000	0,045	0,000	0,041	0,000	0,047	0,000	0,044	0,000	0,045
	44	<b>0,043</b>		<b>0,209</b>		<b>0,009</b>		<b>0,017</b>		<b>0,012</b>		<b>0,000</b>		<b>0,011</b>	
		0,000	0,338	0,030	0,869	0,000	0,095	0,000	0,171	0,000	0,143	0,000	0,212	0,000	0,124
V4 spät hohe Dosis	20	<b>0,014</b>		<b>2,164</b>		<b>0,026</b>		<b>0,000</b>		<b>0,019</b>		<b>0,019</b>		<b>0,038</b>	
		0,000	0,028	0,457	7,582	0,000	0,133	0,000	0,013	0,000	0,054	0,000	0,033	0,000	0,098
	32	<b>0,046</b>		<b>1,415</b>		<b>0,023</b>		<b>0,017</b>		<b>0,016</b>		<b>0,027</b>		<b>0,016</b>	
		0,026	0,070	0,215	11,270	0,013	0,646	0,000	0,048	0,000	0,053	0,000	0,085	0,000	0,089
	44	<b>0,027</b>		<b>0,466</b>		<b>0,010</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,015</b>		<b>0,007</b>	
		0,000	0,204	0,029	0,907	0,000	0,058	0,000	0,018	0,000	0,019	0,000	0,040	0,000	0,021
K1 früh	20	<b>0,000</b>		<b>0,019</b>		<b>0,013</b>		<b>0,000</b>		<b>0,010</b>		<b>0,019</b>		<b>0,030</b>	
		0,000	0,026	0,000	0,191	0,000	0,027	0,000	0,014	0,000	0,061	0,000	0,146	0,019	0,071
	32	<b>0,028</b>		<b>0,062</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	
		0,016	0,039	0,039	0,080	0,000	0,061	0,000	0,017	0,000	0,030	0,000	0,014	0,000	0,000
	44	<b>0,023</b>		<b>0,032</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	
		0,000	0,070	0,000	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017
K2 spät	20	<b>0,017</b>		<b>0,018</b>		<b>0,022</b>		<b>0,013</b>		<b>0,008</b>		<b>0,026</b>		<b>0,047</b>	
		0,000	0,041	0,000	0,045	0,000	0,066	0,000	0,083	0,000	0,085	0,000	0,113	0,039	0,072
	32	<b>0,037</b>		<b>0,062</b>		<b>0,018</b>		<b>0,016</b>		<b>0,016</b>		<b>0,018</b>		<b>0,000</b>	
		0,015	0,048	0,000	0,354	0,014	0,025	0,000	0,019	0,000	0,020	0,015	0,040	0,000	0,030
	44	<b>0,037</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>	
		0,000	0,198	0,000	0,044	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000

Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, K = Kontrollgruppe, LacZ = unspezifische Vektorkontrolle, M = rekombinantes MAP-Protein, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe

Tab. 10.32 IL-10-Sekretion nach Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen in den einzelnen Tiergruppen im Versuchsverlauf.

Tiergruppe	Wochen p. i.	IL-10													
		unstimuliert		jPPD, 4µg/ml		M1272c		M1204		M2077		M3481		LacZ	
		Median		Median		Median		Median		Median		Median		Median	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
V1 früh geringe Dosis	20	<b>0,111</b>		<b>1,089</b>		<b>2,314</b>		<b>1,894</b>		<b>2,014</b>		<b>2,041</b>		<b>1,368</b>	
		0,079	0,716	0,341	2,369	1,175	5,202	1,073	4,663	1,031	4,609	1,199	5,206	0,584	2,407
	32	<b>0,227</b>		<b>0,575</b>		<b>1,206</b>		<b>1,136</b>		<b>1,360</b>		<b>1,337</b>		<b>1,228</b>	
		0,119	0,797	0,186	2,525	0,213	5,208	0,178	6,335	0,161	6,824	0,228	5,768	0,149	2,970
	44	<b>0,080</b>		<b>0,167</b>		<b>0,441</b>		<b>0,492</b>		<b>0,435</b>		<b>0,413</b>		<b>0,159</b>	
		0,000	0,170	0,062	0,285	0,186	0,955	0,189	0,942	0,222	0,874	0,160	0,899	0,125	0,650
V2 früh hohe Dosis	20	<b>0,336</b>		<b>0,711</b>		<b>1,490</b>		<b>1,362</b>		<b>1,302</b>		<b>1,307</b>		<b>1,144</b>	
		0,070	1,260	0,106	1,945	0,293	4,141	0,132	4,225	0,121	4,139	0,151	4,252	0,000	3,759
	32	<b>0,254</b>		<b>0,348</b>		<b>0,716</b>		<b>0,692</b>		<b>0,809</b>		<b>0,678</b>		<b>0,471</b>	
		0,090	0,372	0,097	0,675	0,297	1,336	0,298	1,289	0,317	1,436	0,293	1,196	0,201	1,434
	44	<b>0,196</b>		<b>0,383</b>		<b>0,458</b>		<b>0,477</b>		<b>0,475</b>		<b>0,510</b>		<b>0,360</b>	
		0,159	0,704	0,130	0,458	0,382	1,307	0,474	0,863	0,425	1,359	0,340	1,369	0,223	0,788
V3 spät geringe Dosis	20	<b>0,161</b>		<b>0,881</b>		<b>1,791</b>		<b>1,485</b>		<b>1,954</b>		<b>2,638</b>		<b>1,329</b>	
		0,065	0,434	0,492	1,604	1,085	4,362	1,078	4,452	1,164	4,057	1,054	4,563	1,151	1,916
	32	<b>0,294</b>		<b>0,540</b>		<b>0,676</b>		<b>0,681</b>		<b>0,687</b>		<b>0,728</b>		<b>0,884</b>	
		0,207	0,571	0,163	0,653	0,429	1,842	0,412	2,370	0,316	3,094	0,515	2,373	0,235	1,668
	44	<b>0,122</b>		<b>0,134</b>		<b>0,164</b>		<b>0,144</b>		<b>0,165</b>		<b>0,128</b>		<b>0,060</b>	
		0,000	0,407	0,100	0,711	0,000	0,314	0,000	0,675	0,000	0,479	0,000	0,833	0,000	0,214
V4 spät hohe Dosis	20	<b>0,120</b>		<b>0,865</b>		<b>1,309</b>		<b>1,160</b>		<b>1,049</b>		<b>1,314</b>		<b>3,544</b>	
		0,094	0,209	0,214	6,885	0,425	18,256	0,388	15,646	0,468	16,553	0,409	18,225	0,391	9,327
	32	<b>0,563</b>		<b>0,634</b>		<b>0,798</b>		<b>0,800</b>		<b>1,100</b>		<b>0,910</b>		<b>0,544</b>	
		0,288	0,793	0,342	1,634	0,239	1,312	0,159	1,268	0,027	1,400	0,295	1,513	0,022	1,392
	44	<b>0,230</b>		<b>0,116</b>		<b>0,198</b>		<b>0,116</b>		<b>0,103</b>		<b>0,169</b>		<b>0,111</b>	
		0,000	1,158	0,000	0,318	0,088	0,711	0,068	0,542	0,058	0,529	0,000	0,535	0,000	0,559
K1 früh	20	<b>0,443</b>		<b>0,413</b>		<b>2,408</b>		<b>2,480</b>		<b>2,359</b>		<b>2,573</b>		<b>1,408</b>	
		0,068	0,720	0,044	0,765	0,653	4,094	1,081	4,097	0,751	3,978	1,189	4,292	0,354	2,140
	32	<b>0,186</b>		<b>0,325</b>		<b>0,783</b>		<b>0,690</b>		<b>0,826</b>		<b>0,634</b>		<b>0,554</b>	
		0,113	0,291	0,100	0,647	0,232	2,075	0,254	1,847	0,292	2,303	0,267	2,005	0,188	1,359
	44	<b>0,135</b>		<b>0,193</b>		<b>0,403</b>		<b>0,322</b>		<b>0,370</b>		<b>0,260</b>		<b>0,119</b>	
		0,048	0,218	0,060	0,487	0,187	0,489	0,165	0,690	0,048	0,713	0,097	0,356	0,076	0,870
K2 spät	20	<b>0,135</b>		<b>0,222</b>		<b>0,995</b>		<b>1,250</b>		<b>1,147</b>		<b>1,157</b>		<b>1,204</b>	
		0,036	0,184	0,164	0,471	0,531	1,864	0,483	2,190	0,280	2,037	0,413	2,331	0,854	1,448
	32	<b>0,280</b>		<b>0,230</b>		<b>0,547</b>		<b>0,691</b>		<b>0,661</b>		<b>0,717</b>		<b>0,591</b>	
		0,167	0,721	0,091	0,538	0,285	2,235	0,243	1,960	0,289	1,711	0,297	1,515	0,201	1,309
	44	<b>0,348</b>		<b>0,154</b>		<b>0,220</b>		<b>0,263</b>		<b>0,205</b>		<b>0,164</b>		<b>0,031</b>	
		0,139	0,876	0,065	0,610	0,117	4,165	0,089	4,363	0,128	4,373	0,114	3,722	0,000	3,921

Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, K = Kontrollgruppe, LacZ = unspezifische Vektorkontrolle, M = rekombinantes MAP-Protein, Max = Maximum, Min = Minimum, p.i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe



### 10.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Schematische Darstellung des postulierten „klassischen“ Modells zum Verlauf der zellulären, und humoralen Immunantwort sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot im Infektionsverlauf bei Paratuberkulose (modifiziert nach Begg et al., 2011).....	17
Abb. 4.1 Gruppeneinteilung, Aufstellungsregime und Inokulationsschema der Versuchstiere. Erläuterungen: BFM = Bakterienfeuchtmasse, KbE = Koloniebildende Einheiten, PBS = phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat Buffered Saline).....	45
Abb. 5.1 Entwicklung der Ausscheidung von MAP im Kot über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind a) die Gruppe V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP), b) die Gruppe V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP), c) die Gruppe V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) und d) die Gruppe V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP). Erläuterungen: p. i. = post inoculationem, WI MAP [Kot] = Wachstumsindex von <i>Mycobacterium avium</i> subspecies paratuberculosis, Nachweis aus dem Kot.....	71
Abb. 5.2 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IFN-γ-Sekretion der PBMC von Kontrolltieren (K). Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag) und b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag). Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem.....	73
Abb. 5.3 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IFN-γ-Sekretion der PBMC von MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP). Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem.....	74
Abb. 5.4 Unterschiede in der IFN-γ-Konzentration zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) bzw. zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit Concanavalin A, (20 µg/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe.....	75
Abb. 5.5 Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen in der IFN-γ-Konzentration nach Restimulation mit den Positivkontrollen Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) und <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe.....	76
Abb. 5.6 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IL-10-Sekretion der PBMC der Kontrolltiere. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag). In der Gruppe K1 wurde SEB erst ab der zwölften Woche p. i. als Restimulans eingesetzt. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit).....	77
Abb. 5.7 Einfluss der Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20 µg/ml) bzw. <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B (SEB, 4 µg/ml) auf die IL-10-Sekretion der PBMC MAP-inokulierter Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP). In den Gruppen V1 und V2 wurde SEB erst ab der zwölften Woche p. i. als Stimulans eingesetzt. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit).....	78

- Abb. 5.8 Unterschiede in der IL-10-Konzentration zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit Concanavalin A (ConA, 20  $\mu$ g/ml). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe ..... 79
- Abb. 5.9 Konzentrationsabhängiger Effekt von jPPD auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1(3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Teilabbildungen. Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p i. = post inoculationem..... 80
- Abb. 5.10 Konzentrationsabhängiger Effekt von aPPD auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1 (3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) V4. (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Teilabbildungen. Erläuterungen: aPPD = aviäres purified protein derivate, IE = Internationale Einheit, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem..... 81
- Abb. 5.11 Konzentrationsabhängiger Effekt von jPPD auf die IL-10-Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind a) die Gruppe K1(3. Lebenstag) und b) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)..... 82
- Abb. 5.12 Konzentrationsabhängiger Effekt von aPPD auf die IL-10-Sekretion der PBMC von Kontroll- bzw. MAP-inokulierten Ziegen. Dargestellt sind a) die Gruppe K1(3. Lebenstag) und b) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: aPPD = aviäres purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)..... 83
- Abb. 5.13 Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Sekretion nach der Restimulation von PBMC a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) mit jPPD (4  $\mu$ g/ml), sowie mit aPPD (125 I. E./ml). Erläuterungen: a = aviär, jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem..... 84
- Abb. 5.14 Unterschiede in der IL-10-Sekretion nach der Restimulation von PBMC a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) mit jPPD (4  $\mu$ g/ml), sowie mit aPPD (125 I. E./ml). Erläuterungen: a = aviär, IE = Internationale Einheit, jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit)..... 85
- Abb. 5.15 Gruppenunterschiede in der IFN- $\gamma$ -Reaktion nach Restimulation der PBMC mit jPPD a) Vergleich der Gruppen K1 (3. Lebenstag), V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. b)Vergleich der Gruppen K2 (42. Lebenstag), V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe..... 86
- Abb. 5.16 Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Konzentration der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE) und b) den Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe..... 87

- Abb. 5.17 Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) den Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe..... 87
- Abb. 5.18 Unterschiede in der IL-10-Sekretion von jPPD-restimulierten PBMC zwischen a) den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) sowie zwischen b) den Gruppen K2 (42. Lebenstag) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) bzw. V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe..... 88
- Abb. 5.19 Unterschiede in der IL-10-Konzentration der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE) und b) den Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE). Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe ..... 89
- Abb. 5.20 Unterschiede in der IL-10-Sekretion der Gruppen a) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) den Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit), V = Versuchsgruppe..... 90
- Abb. 5.21 Unterschiede in der IL-10-Sekretion von unstimulierten PBMC zwischen a) den Gruppen K1 und V1 bzw. V2 sowie zwischen b) den Gruppen K2 und V3 bzw. V4..... 91
- Abb. 5.22 Vergleich der Genexpression verschiedener immunmodulatorischer Zytokine durch jPPD-restimulierte PBMC als Verhältnis zu unstimulierten Zellen. Dargestellt sind die Gruppenmediane der logarithmierten RQ-Wert der Gruppen a) K1 (3. Lebenstag), b) K2 (42. Lebenstag), c) V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), e) V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Streuungsmaß: 95 %iges Konfidenzintervall. Erläuterungen: BZP = Beprobungszeitpunkt, IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, IL = Interleukin, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha..... 95
- Abb. 5.23 Vergleich der Expression von a) Interferon-gamma, b) Interleukin -10, c) Transforming growth factor beta, d) Interleukin-12p40 und e) Tumor necrosis factor alpha durch jPPD-restimulierte PBMC zwischen den verschiedenen Tiergruppen. Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe..... 97
- Abb. 5.24 Unterschiede zwischen den Antikörperreaktionen (als Verhältnis der Antikörperkonzentration in der Probe zu der der Positivkontrolle, S/P-Werte) der Kontroll- und der Versuchsgruppen. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und b) der Gruppen V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: K = Kontrollgruppe, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe .. 98
- Abb. 5.25 Antikörperreaktion der MAP-inokulierten Tiere in Abhängigkeit vom Lebensalter der Ziegen zum Zeitpunkt der Inokulation (als Verhältnis der Antikörperkonzentration in der Probe zu der der Positivkontrolle, S/P-Werte). Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppen V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) der Gruppen V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, V = Versuchsgruppe..... 99
- Abb. 5.26 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Ausdehnung und dem Schweregrad der

- Gewebeveränderungen am Darm (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezüchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit) 103
- Abb. 5.27 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Ausdehnung und dem Schweregrad der Gewebeveränderungen in den Lymphknoten des Darmes (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezüchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit) ..... 104
- Abb. 5.28 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Verteilung des Mykobakteriennachweises und der erfassten semiquantitativen Menge des Erregers im Darm (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezüchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit)..... 106
- Abb. 5.29 Verlauf a) der Erregerausscheidung, b) der Antikörperbildung, c) der IFN- $\gamma$ -Reaktion und d) der Sekretionsstärke von IL-10 in Abhängigkeit von der Verteilung des Mykobakteriennachweises und der erfassten semiquantitativen Menge des Erregers in den Lymphknoten des Darmes (Score 0 bis Score 2). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem,  $S$  = Score,  $WI$  = Wachstumsindex von MAP (angezüchtet aus Kotproben),  $U$  = Einheit (unit) ..... 108
- Abb. 5.30 Vergleich der IFN- $\gamma$ -Sekretion jPPD-restimulierter PBMC, denen ein IL-10-Neutralisationsantikörper (CC320) oder ein IgG-Isotyp-Kontrollantikörper zugesetzt worden war mit solchen, ohne Antikörperzusatz. Dargestellt sind die Ergebnisse aus den Gruppen a) K1 (3. Lebenstag) und b) K2 (42. Lebenstag). In den Wochen 20, 32 und 44  $p. i.$  wurde keine IL-10-Neutralisation durchgeführt, die fehlenden Werte sind nicht dargestellt. Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem ..... 109
- Abb. 5.31 Vergleich der IFN- $\gamma$ -Sekretion jPPD-restimulierter PBMC, denen ein IL-10-Neutralisationsantikörper (CC320) oder ein IgG-Isotyp-Kontrollantikörper zugesetzt worden war mit solchen, ohne Antikörperzusatz. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), b) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP), c) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und d) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). In den Wochen 20, 32 und 44  $p. i.$  wurde keine IL-10-Neutralisation durchgeführt, die fehlenden Werte sind nicht dargestellt. Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem..... 111
- Abb. 5.32 Darstellung der Genexpression verschiedener Zytokine im Vergleich jPPD-restimulierter PBMC zu unstimulierten Zellen der Gruppen K1 und K2 (3. bzw. 42. Lebenstag, obere Reihe links bzw. rechts), der Gruppen V1 und V2 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  bzw.  $4 \times 10^9$  KbE MAP, mittlere Reihe links bzw. rechts) und der Gruppen V3 und V4 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  bzw.  $4 \times 10^9$  KbE MAP, untere Reihe links bzw. rechts) im Farbprofil. Erläuterungen: IFN- $\gamma$  = Interferon-gamma, IL = Interleukin,  $p. i.$  = post inoculationem, TGF $\beta$  = Transforming growth factor beta, TNF $\alpha$  = Tumor necrosis factor alpha..... 113
- Abb. 5.33 Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC die mit jeweils verschiedenen rekombinanten MAP-Proteinen oder der unspezifischen Vektorkontrolle LacZ restimuliert worden waren. Exemplarisch ausgewählt wurden a) die Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) und b) die Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen:  $p$  = Signifikanzniveau,  $p. i.$  = post inoculationem..... 114
- Abb. 5.34 Signifikante Unterschiede zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion von mit rekombinanten MAP-Proteinen restimulierten PBMC verglichen mit der von unstimulierten und jPPD-restimulierten PBMC. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag) c) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) e) der Gruppe V3

- (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem ..... 116
- Abb. 5.35 Unterschiede in der IL-10-Konzentration in Zellkulturüberständen von PBMC die mit jeweils verschiedenen rekombinanten MAP-Proteinen oder der unspezifischen Vektorkontrolle LacZ restimuliert worden waren. Exemplarisch ausgewählt wurden a) die Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und b) die Gruppe K2 (42. Lebenstag). Dargestellt sind signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Proteinen und LacZ sowie zwischen den einzelnen Proteinen. Erläuterungen: p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem ... 117
- Abb. 5.36 Signifikante Unterschiede in der IL-10-Sekretion von mit rekombinanten MAP-Proteinen restimulierten PBMC verglichen mit der von unstimulierten und jPPD-restimulierten PBMC. Dargestellt sind die Ergebnisse a) der Gruppe K1 (3. Lebenstag), b) der Gruppe K2 (42. Lebenstag), c) der Gruppe V1 (3. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP), d) der Gruppe V2 (3. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP) e) der Gruppe V3 (42. Lebenstag,  $2 \times 10^9$  KbE MAP) und f) der Gruppe V4 (42. Lebenstag,  $4 \times 10^9$  KbE MAP). Erläuterungen: jPPD = Johnin purified protein derivate, p = Signifikanzniveau, p. i. = post inoculationem, U = Einheit (unit) ..... 118
- Abb. 6.1 Individuelle Reaktionsprofile der IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion im Infektionsverlauf der Paratuberkulose (modifiziert nach Begg et al., 2011): IFN- $\gamma$ -Reaktion ohne Antikörperbildung (links), parallel auftretende IFN- $\gamma$ - und Antikörperreaktion (rechts.) Nicht dargestellt ist das „klassische“ Modell..... 154

## 10.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 2.1 Auswahl und Charakterisierung pro- und antiinflammatorisch wirkender Zytokine. (modifiziert nach Schütt und Bröker, 2006 sowie Kirchner et al. 1994).</i>	9
<i>Tab. 2.2 Einteilung der pathohistologischen Veränderungen bei der Paratuberkulose nach dem Schweregrad (modifiziert nach Buergelt et al., 1978 und Brady et al., 2008).</i>	21
<i>Tab. 2.3 Übersicht über die Erkrankungsstadien der Paratuberkulose beim Rind (modifiziert nach Whitlock und Buergelt, 1996).</i>	22
<i>Tab. 2.4 Anforderungen an einen idealen Test für die Paratuberkulose und deren Erfüllung durch die derzeit verfügbaren diagnostischen Verfahren</i>	24
<i>Tab. 2.5 Ausgewählte Studien zur Untersuchung der Wirkung verschiedener diagnostischer Antigenkandidaten auf die zelluläre Immunreaktion bei der Paratuberkulose</i>	34
<i>Tab. 2.6 Übersicht über caprine Langzeitmodelle für die Paratuberkulose zur Untersuchung der Immunantwort (modifiziert nach Hines et al., 2007a und Begg und Whittington, 2007).</i>	41
<i>Tab. 5.1 Übersicht über die vorzeitig aus der Studie ausgeschiedenen Versuchstiere, ihren Todeszeitpunkt, die Todesursache und die Todesart</i>	63
<i>Tab. 5.2 Pathologische Scores der Gewebeveränderungen und des immunhistologischen Mykobakteriennachweises in den entnommenen Proben aus Darm und Lymphknoten des Darmes für die einzelnen Ziegen</i>	65
<i>Tab. 5.3 Kultureller MAP-Nachweis in den beprobten Lokalisationen des Darmes (WI).</i>	67
<i>Tab. 5.4 Kultureller MAP-Nachweis in den beprobten Lokalisationen des lymphatischen Systems (WI).</i>	68
<i>Tab. 5.5 Wachstumsindex (WI) nach der Anzüchtung von MAP aus Kotproben.</i>	70
<i>Tab. 5.6 Darstellung der Korrelationskoeffizienten nach Spearman und des Signifikanzniveaus für die Beziehungen zwischen IFN-<math>\gamma</math>-, IL-10- und Antikörperreaktion sowie der MAP-Ausscheidung mit dem Kot. ....</i>	100
<i>Tab. 6.1 Erfüllung der Modellkriterien nach Hines et al. (2007a) bei der Etablierung des Langzeitinfektionsmodells an der Thüringer Wald Ziege</i>	121
<i>Tab. 6.2. Übersicht über die verwendeten Inokulationsdosen in ausgewählten Tiermodellen für die Paratuberkulose. Die Inokulation in den aufgeführten Modellen erfolgte jeweils oral.</i>	123
<i>Tab. 10.1 Charakterisierung der Einzeltiere und Auswahl der zu untersuchenden Ziegen für die real-time PCR</i>	230
<i>Tab. 10.2 Mikrobiologische Charakterisierung und entsprechende Befunde der Tiere zum Zeitpunkt der Einstellung</i>	231
<i>Tab. 10.3 Geräte und Gebrauchsgegenstände</i>	232
<i>Tab. 10.4 Verbrauchs- und Gebrauchsgegenstände</i>	234
<i>Tab. 10.5 Chemikalien und Reagenzien</i>	237
<i>Tab. 10.6 Kits und Fertiglösungen</i>	239
<i>Tab. 10.7 Verwendete Reagenzien für die Zellisolation</i>	240
<i>Tab. 10.8. Verwendete monoklonale anti-bovine Antikörper aus der Maus</i>	241
<i>Tab. 10.9 Auflistung der verwendeten ELISA-Komponenten</i>	242
<i>Tab. 10.10 Primer-Sequenzen IS900 und IS1245 PCR</i>	242
<i>Tab. 10.11 Primer für die Bestimmung der Genexpression verschiedener Zytokine mittels quantitativer RT-real-time PCR (modifiziert nach Appelt, unveröffentlicht)</i>	243

<i>Tab. 10.12</i> Rezepte verwendeter Puffer, Lösungen und Medien .....	244
<i>Tab. 10.13</i> Durchführung der ELISAs für IFN- $\gamma$ und IL-10.....	247
<i>Tab. 10.14</i> Beurteilungsschlüssel der immunhistochemischen Veränderungen und des Erregergehaltes in den Lokalisationen des Darms sowie der Lymphknoten des Magen-Darm Traktes .....	248
<i>Tab. 10.15</i> Übersicht über die Probenlokalisationen und die Anzahl der entnommenen Proben pro Lokalisation für die pathohistologischen Untersuchungen und den kulturellen Erregernachweis für jedes Tier .....	249
<i>Tab. 10.16</i> IFN- $\gamma$ -Reaktion der Einzeltiere nach Restimulation von PBMC mit jPPD (4 $\mu$ g/ml) als heat-map dargestellt. Die niedrigsten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen sind grün dargestellt. Mit zunehmender Konzentration wechselt die Farbe des Feldes über gelb zu rot. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Einzelbestimmungen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppen V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP), V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP), V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP). .....	250
<i>Tab. 10.17</i> Mittlere IFN- $\gamma$ -Reaktion in den Gruppen V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) von unstimulierten PBMC und PBMC nach einer Restimulation mit jPPD, ConA oder SEB. ....	251
<i>Tab. 10.18</i> Mittlere IFN- $\gamma$ -Reaktion in den Gruppen K1 (3. Lebenstag) und K2 (42. Lebenstag) nach einer PBMC-Restimulation mit jPPD bzw. aPPD .....	252
<i>Tab. 10.19</i> Mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Gruppen V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit je zwei verschiedenen Konzentrationen jPPD bzw. aPPD.....	253
<i>Tab. 10.20</i> IL-10-Reaktion der Einzeltiere als heat-map dargestellt. Die niedrigsten IL-10-Konzentrationen sind grün dargestellt. Mit zunehmender Konzentration wechselt die Farbe des Feldes über gelb zu rot. Dargestellt sind die Ergebnisse der Gruppen V1 (3. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP), V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP), V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) und V4 (42. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP).....	254
<i>Tab. 10.21</i> Mittlere IL-10-Reaktion in den Gruppen V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) von unstimulierten PBMC und PBMC nach einer Restimulation mit jPPD, ConA oder SEB. ....	255
<i>Tab. 10.22</i> Mittlere IL-10-Reaktion in den Gruppen K1(3. Lebenstag) und K2 (42. Lebenstag) nach einer PBMC-Restimulation mit jPPD bzw. aPPD .....	256
<i>Tab. 10.23</i> Mittlere IL-10-Konzentration in den Gruppen V2 (3. Lebenstag, $4 \times 10^9$ KbE MAP) und V3 (42. Lebenstag, $2 \times 10^9$ KbE MAP) nach PBMC-Restimulation mit je zwei verschiedenen Konzentrationen jPPD bzw. aPPD.....	257
<i>Tab. 10.24</i> Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IFN- $\gamma$ mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen. ....	258
<i>Tab. 10.25</i> Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IL-10 mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen. ....	259
<i>Tab. 10.26</i> Ergebnisse der Expressionsbestimmung von TNF $\alpha$ mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen. ....	260
<i>Tab. 10.27</i> Ergebnisse der Expressionsbestimmung von TGF $\beta$ mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen. ....	261
<i>Tab. 10.28</i> Ergebnisse der Expressionsbestimmung von IL-12p40 mittels real-time PCR innerhalb der Tiergruppen.....	262
<i>Tab. 10.29</i> Qualitative und quantitative Bestimmung der Antikörperreaktion der Einzeltiere.....	263

---

<i>Tab. 10.30 Einteilung der Versuchstiere in Gruppen entsprechend der ihnen zugeordneten Scores in Abhängigkeit von den pathologischen und immunhistochemischen Befunden.....</i>	<i>264</i>
<i>Tab. 10.31 IFN-<math>\gamma</math> -Sekretion nach Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen in den einzelnen Tiergruppen im Versuchsverlauf.....</i>	<i>265</i>
<i>Tab. 10.32 IL-10-Sekretion nach Restimulation mit rekombinanten MAP-Proteinen in den einzelnen Tiergruppen im Versuchsverlauf.....</i>	<i>266</i>



## 11 Publikationsverzeichnis

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin wurden Teile dieser Arbeit bereits vorab veröffentlicht:**

### Vorträge:

#### **Soschinka A. (2009)**

Orale Infektion von Ziegenlämmern mit *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*. Untersuchungen zur Ausprägung der zellulären Immunantwort. Wissenschaftliches Seminar FLI Jena, 18.11.2009, Jena

#### **Soschinka A., Burkert B., Meyer M., Köhler H. (2010)**

Induktion von Antikörpern und spezifischen, IFN- $\gamma$ -bildenden Immunzellen bei Ziegen nach Infektion mit *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 22.-24.06.2010, Jena

#### **Soschinka A., Meyer M., Reinhold P., Möbius P., Liebler-Tenorio E. (2010)**

Experimental animal model – MAP infection of goats. H. Köhler, Meeting des Projektkonsortiums ZooMAP, 02.11.2010, Kassel

#### **Soschinka A. (2011)**

Analyse der humoralen und zellulären Immunantwort von Ziegen nach experimenteller Inokulation mit *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). Wissenschaftliches Seminar FLI Jena, 15. Juni 2011, Jena

#### **Soschinka A., Meyer M., Reinhold P., Möbius P., Liebler-Tenorio E. (2011)**

Experimental oral infection of goats with MAP – Relation between immune profile and histopathological score. H. Köhler, Meeting des Projektkonsortiums ZooMAP, 02.11.2011, Kassel

#### **Köhler H., Meyer M., Soschinka A., Reinhold P., Möbius P., Liebler-Tenorio E. (2012)**

Characterization of an experimental goat model of Paratuberculosis. 11th International Colloquium on Paratuberculosis, 05.-10. Februar 2012, Sydney, Australien.

**Soschinka A., Meyer M., Liebler-Tenorio M. E., Köhler H. (2012)**

Zusammenhang zwischen Immunprofil und histopathologischen Veränderungen bei experimenteller Infektion von Ziegen mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. 8. Stendaler Symposium, 09.05.2012 – 11.05.2012, Stendal

**Köhler H., Soschinka A., Meyer M., Reinhold P., Möbius P., Liebler-Tenorio E. (2012)**

Untersuchungen zur Pathogenese von Paratuberkulose bei Jungziegen. Tagung der DVG-Fachgruppe „Krankheiten kleiner Wiederkäuer“, 22.-23.05.2012, Göhren

**Köhler H., Soschinka A., Walter G., Meyer M., Krüger Ch., Möbius P., Reinhold P., Liebler-Tenorio E. (2013)**

Infektionsmodell für die Paratuberkulose bei Ziegen: bakteriologische und immunologische Befunde. 5. Arbeitstagung zu Mykobakterieninfektionen, 29.-30.01.2013, Jena.

**Köhler H., Soschinka A., Walter G., Meyer M., Krüger C., Möbius P., Reinhold P., Liebler-Tenorio E. (2014)**

Untersuchungen zur Pathogenese der Paratuberkulose im Ziegenmodell. Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 26.-28. Mai 2014, Freising

**Köhler H., Soschinka A., Walter G., Meyer M., Krüger C., Möbius P., Reinhold P., Liebler-Tenorio E. (2014)**

Experimentelles Paratuberkulose-Modell bei Ziegen. Gibt es Zusammenhänge zwischen *in-vivo* Reaktionen und postmortalen Befunden? Wissenschaftliches Seminar des FLI, der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“ und der DGHM-Fachgruppe „Zoonosen“, 11.11.2014, Jena.

**Veröffentlichungen****Soschinka A., Burkert B., Meyer M., Köhler H. (2010)**

Induktion von Antikörpern und spezifischen, IFN- $\gamma$ -bildenden Immunzellen bei Ziegen mit *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP). Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 22.-24.06.2010, Jena, Tagungsband Seite 19

**Köhler H., Meyer M., Soschinka A., Reinhold P., Möbius P., Liebler-Tenorio E. (2012)**

Characterization of an experimental goatmodel of Paratuberculosis. Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis, 05.-10. Februar 2012, Sydney, Australien, p. 213.

**Köhler H., Soschinka A., Walter G., Meyer M., Krüger C., Möbius P., Reinhold P., Liebler-Tenorio E. (2014)**

Untersuchungen zur Pathogenese der Paratuberkulose im Ziegenmodell. Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 26.-28. Mai 2014, Freising. Tagungsband S. 51-52.

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

Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. BMC Vet Res 11:74. DOI 10.1186/s12917-015-0381-1.

**Posterbeiträge****Soschinka A., Burkert B., Köhler H. (2010)**

IFN- $\gamma$ - and antibody responses of goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* vary with the age at and the dose of infection. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 22.-25.09.2010, Leipzig

**Soschinka A., Burkert B., Meyer M., Köhler H. (2010)**

Induction of specific Interferon-gamma secreting immune cells and antibodies in goats after experimental infection with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP). National Symposium on Zoonoses Research 2010, 07.-08.10.2010, Berlin

## 12 Danksagung

*Um ein Kind zu erziehen, braucht es ein ganzes Dorf.  
(Afrikanisches Sprichwort)*

Mit einer Dissertation verhält es sich ähnlich und deshalb gilt mein Dank allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben. Ich bedanke mich insbesondere bei

...Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold für die Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit, für die konstruktive Kritik und die rasche Bearbeitung des umfangreichen Werkes.

...Frau Dr. Heike Köhler für die Bereitstellung des Themas, die Konzeption des Projektes und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit in Jena. Ich habe viel aus den fachlichen Diskussionen und den Einblicken in Ihren wissenschaftlichen Alltag mitgenommen und bin dankbar für die Unterstützung, die Sie mir gerade in der Endphase der Arbeit trotz eigenen großen Arbeitspensums entgegengebracht haben. Einfach „Danke!“.

...beim FLI für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung des Projektes.

...dem Verbund der Tierseuchenkassen aus Baden-Württemberg, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz und Thüringen für die Bereitstellung finanzieller Mittel für dieses Forschungsvorhaben.

...Herrn Prof. Dr. Christian Menge für die ehrliche und konstruktive Kritik und die spannenden fachlichen Diskussionen.

...Frau Angela Kather für die gründliche Einarbeitung in das Projekt und Frau Beate Appelt für die Etablierung der real-time PCR und die Bearbeitung eines Teils der Proben.

...Frau Beate Burkert. Ich danke dir nicht nur für die Bearbeitung der Serumproben sondern auch für dein Ohr, dein Herz und die vielen Gedanken um meine Arbeit. Ohne dich wäre ich manchmal verzweifelt.

...Danny Michel, Sandy Werner und Uta Brommer für die Bearbeitung und Auswertung der Kulturproben aus Kot und Gewebe sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 220 für die kollegiale Zusammenarbeit, die Rücksichtnahme und manch fröhliche Stunde.

...Dr. Karsten Donat. Du bist für mich zu einem Mentor auf meinem Weg geworden und ich bin stolz, dass ich für dein Team arbeiten durfte. Danke für die Forderung und Förderung, den „anderen“ Blick auf die Paratuberkulose, den Glauben an meine Fähigkeiten und die vielen nachdrücklichen Erkundigungen nach dem Stand dieses Projektes!

...Solveig Zabel, Katharina Kerner, Carola Ostermann, Ines Ziegenmeyer und Florian Ziemen. Ihr seid diejenigen, die mit Geduld das Gejammer ertragen und mit Nachdruck Ihren Glauben an mich deutlich gemacht haben. Danke!

...Michael „Micha“ Kunz fürs Mut machen diese Arbeit anzufangen und die Gewissheit trotz allem auf dem richtigen Weg zu sein.

...meinen Chefs und Kollegen der Tierärztlichen GmbH Hagenow und der Tierarztpraxis Lübtheen für das Ertragen meiner Gemütszustände in der letzten Phase dieser Arbeit und die Berücksichtigung der besonderen Umstände im Dienstplan.

...meinen Eltern und meinem Bruder. Ich entschuldige mich für all die Sorgen, schlaflosen Nächte und zerrauten Haare, die euch euer Töchterchen/Schwesterchen bereitet hat. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich bin und ich bin unendlich dankbar, euch als Familie im Rücken zu haben. Komme was wolle.

...,„meinen Jenensern“ Johanna Nieter, Gudrun Walter, Katharina Sobotta, Isabel Fritsch, Steffi Wilsky, Markus Vaas, Susi Illing, Katharina Schlotter und den Mitarbeitern des Thüringer Rindergesundheitsdienstes - es war eine großartige Zeit!

## 13 Selbstständigkeitserklärung

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

Hagenow, den 28.09.2015

Anneka Soschinka