

**Entwicklung und Anwendung poly- und monoklonaler Antikörper zum
Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis***

von Elena Nicole Kamilla Feltl

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

**Entwicklung und Anwendung poly- und monoklonaler Antikörper zum
Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis***

von Elena Nicole Kamilla Feltl

aus München

München 2019

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

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Mitbetreuung durch: Dr. Richard Dietrich

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	3
2.1	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> (MAP)	3
2.1.1	Definition und Geschichte der Paratuberkulose	3
2.1.2	Taxonomie und Eigenschaften	4
2.1.3	Stammdifferenzierung.....	6
2.1.4	Wirtsspektrum	6
2.1.5	Infektionswege	7
2.1.6	Krankheitsverlauf und Symptomatik	7
2.1.7	Immunologische Reaktion	10
2.1.8	MAP und Morbus Crohn.....	11
2.1.9	Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen	12
2.2	Nachweisverfahren	14
2.2.1	Kultureller Nachweis	15
2.2.2	Antikörperbasierte Nachweisverfahren	16
2.2.3	Molekularbiologischer Nachweis	17
III.	Material und Methoden	19
3.1	Materialien und Geräte	19
3.1.1	Reagenzien	19
3.1.2	Lösungen und Puffer.....	20
3.1.3	Immunreagenzien	21
3.1.4	Nährmedien	22
3.1.5	Geräte	23
3.1.6	Sonstige Materialien	23
3.2	Methodik	24
3.2.1	Etablierung einer Mykobakterien-Stammbibliothek	24

3.2.1.1	Kultivierung der Mykobakterien Stämme.....	25
3.2.2	Generierung von Hybridomzelllinien	27
3.2.3	EIA-Verfahren.....	28
3.2.4	Immunfluoreszenz	29
3.2.5	SDS-PAGE und Immunoblot	29
3.2.6	Immunomagnetische Separation	31
3.2.7	Immunaффinitäts-Chromatographie (IAC).....	32
IV.	Ergebnisse	33
4.1	Herstellung von MAP-Präparationen	33
4.1.1	Herstellung der Immunogene	33
4.1.2	Antigen-Präparationen für EIAs.....	34
4.2	Polyklonale Kaninchenantiseren.....	34
4.2.1	Immunisierung der Kaninchen	34
4.2.2	Bestimmung der Antikörper-Titer	35
4.2.3	Überprüfung der Reaktivität.....	38
4.2.4	Relative Antikörperaffinität	40
4.2.5	Intra-Genus Reaktivität	43
4.2.6	Indirekte Immunfluoreszenz	44
4.2.7	Immunoblot.....	45
4.2.8	Charakterisierung der detektierten Antigene.....	46
4.2.9	Einsetzbarkeit zur immunomagnetischen Separation von MAP-Zellen.....	49
4.3	Monoklonale Antikörper	51
4.3.1	Immunisierung von Mäusen.....	51
4.3.2	Generierung der Antikörper	52
4.3.3	Antigen-Spezifität.....	53
4.3.4	Bestimmung der Intra-Spezies Reaktivität.....	55
4.3.5	Überprüfung der Spezifität.....	58

4.3.6	Lokalisation der Zielantigene	59
4.3.7	Immunfluoreszenz	64
4.3.8	Anreicherung der Zielantigene mittels Immunaффinitätschromatographie	65
V.	Diskussion	68
VI.	Zusammenfassung	78
VII.	Summary	79
VIII.	Literaturverzeichnis	80
IX.	Abbildungsverzeichnis.....	88
X.	Tabellenverzeichnis	91
XI.	Danksagung.....	92

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Albumin/Dextrose/Katalase-Zusatz
A.dest	Aqua destillata
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
F	Schwenkradius
FCS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich Löffler Institut
HEYM Agar	Herrold's egg yolk agar
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
Hsp	Heat shock protein
IMB	Immunomagnetische Beads
IMS	Immunomagnetische Separation
mAk	monoklonale Antikörper
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
M7H9	Middlebrook 7H9- Medium
M7H10	Middlebrook 7H10- Medium
OADC	Ölsäure/Albumin/Dextrose/Katalase-Zusatz (oleic acid/albumin/dextrose/catalase enrichment)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
ZKÜ	Zellkulturüberstand

I. Einleitung

Die Paratuberkulose ist eine bakteriell bedingte Infektionskrankheit der Wiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine sich über Jahre erstreckende Inkubationszeit, gefolgt von chronischem, therapieresistenten Durchfall, welcher zu einer starken Abmagerung der Tiere bis hin zu deren Tod führt.

Die Infektion mit MAP führt dabei zum einen zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten für den Landwirt, zum anderen steht MAP aber auch immer wieder im Verdacht an Morbus Crohn, einer chronisch, entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, beteiligt zu sein. Diese Hypothese basiert darauf, dass MAP zum einen mittels PCR im Darm Morbus Crohn erkrankter Patienten nachgewiesen werden konnte (Autschbach et al., 2005) und zum anderen lebende MAP auch in konventionell pasteurisierten Milchproben detektiert werden konnten (Benedictus et al., 1987, Grant et al., 2002, Feller et al., 2007).

Goldstandard in der klinischen Diagnostik der Paratuberkulose ist derzeit die kulturelle Anzucht des Erregers auf speziellen Nährmedien. Dieses Nachweisverfahren ist jedoch auf Grund des hohen zeitlichen Aufwandes, der intermittierenden Erregerausscheidung, sowie den damit verbundenen hohen Kosten nur bedingt diagnostisch einsetzbar. Eine weitere Möglichkeit im Rahmen der Diagnostik stellt der Nachweis MAP-spezifischer Antikörper in Serum bzw. Milch der betroffenen Tiere dar. Das dabei eingesetzte ELISA-Verfahren weist jedoch nur eine Testsensitivität von 40-50 % auf (Fry et al., 2008). Insbesondere Tiere im frühen Stadium der subklinischen Infektion werden jedoch nicht ausreichend erfasst (Rossiter and Burhans, 1996, Stabel et al., 2002).

Da eine Kontamination von Lebensmitteln, insbesondere von Milch, mit MAP in landwirtschaftlichen Betrieben nicht ausgeschlossen werden kann und von daher prinzipiell auch die Möglichkeit besteht, dass lebende MAP in wärmebehandelten Produkten wie Konsummilch auftreten, ist im Hinblick auf einen effizienten Verbraucherschutz die Entwicklung schneller, sensitiver und spezifischer Nachweisverfahren für die Keime von grundlegender Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch die Entwicklung und Charakterisierung poly- und monoklonaler, MAP-spezifischer Antikörper die Grundlagen für die Etablierung entsprechender Verfahren gelegt werden.

Diese Arbeit wurde durch das IGF-Forschungsvorhaben AiF 18388 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

II. Literaturübersicht

2.1 *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)

2.1.1 Definition und Geschichte der Paratuberkulose

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) wurde erstmals 1895 von Johne und Frothingham beschrieben und gilt als Erreger einer als Paratuberkulose bezeichneten chronisch-granulomatösen Enteritis des Rindes (Johne and Frothingham, 1895). Bei ihrer Entdeckung wurde die Erkrankung zunächst als eine "eigentümliche Form der Tuberkulose" bezeichnet.

Bang (1906) postulierte, dass es sich bei dieser Erkrankung nicht um eine Form der Tuberkulose, sondern eine eigenständige Erkrankung handelt und betitelte sie als Pseudotuberkulose oder "JOHNEsche Erkrankung" (Johne's disease) (Clarke, 1997). Einige Zeit später wurde der Name Paratuberkulose geprägt und das bis dahin noch als *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* bezeichnete Bakterium das erste Mal für experimentelle Zwecke kultiviert (Marek, 1910, Twort, 1912). Erst später wurde MAP auf Grund seiner genetischen Verwandtschaft als Subspezies dem *Mycobacterium avium*-Komplex zugeordnet und wird seitdem als *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bezeichnet (Hurley et al., 1988, Saxegaard et al., 1988, Yoshimura and Graham, 1988).

2.1.2 Taxonomie und Eigenschaften

Bei dem Erreger MAP handelt es sich um ein gram-positives, säurefestes Stäbchen von einer Größe im Bereich zwischen 0,5-1,5 µm (Cocito et al., 1994), das taxonomisch gesehen innerhalb der Klasse der Actinobakterien, in der Familie der *Mycobacteriaceae* zur Gattung *Mycobacterium* zählt (Rolle et al., 2002). Mykobakterien sind nicht sporenbildend, obligat aerob und vermehren sich primär intrazellulär (Schrauder et al., 2003). Sie zeichnen sich des Weiteren durch ihre Alkohol- und Säurefestigkeit aus (Shinnick and Good, 1994). Diese basiert unter anderem darauf, dass die Zellwand der Mykobakterien aus Peptidoglycan-Arabinogalactan-Polymeren besteht, an die Mykolsäuren (Abb. 1), die zu den längsten natürlich vorkommenden Fettsäuren zählen, kovalent gebunden sind (Brennan and Nikaido, 1995). Auf Grund dieser speziellen Zellwandstruktur können Mykobakterien mittels Ziehl-Neelsen Färbung gut von anderen Bakterien differenziert werden (Van et al., 2008).

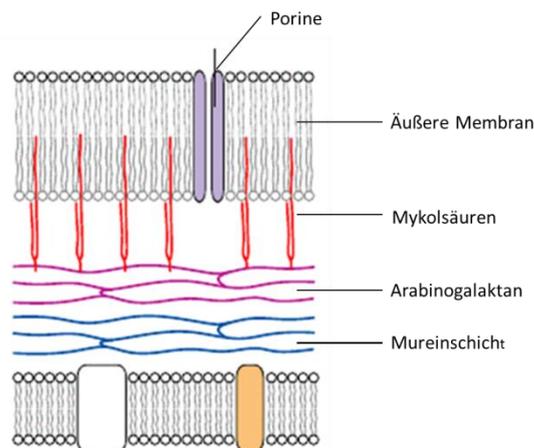


Abbildung 1: Aufbau der Zellwand von Mykobakterien. Die Mureinschicht ist umgeben von Arabinogalaktan, einem Polysaccharid, an das langkettige Fettsäuren (Mykolsäuren) gebunden sind. Diese sorgen für eine stabile Verankerung der wachsartigen äußeren Membran (modifiziert nach [http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/Antimicrobial Chemotherapy.html](http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/Antimicrobial%20Chemotherapy.html), letzter Zugriff 01/19)

Unabhängig von taxonomischen, biochemischen bzw. genetischen Kriterien können Mykobakterien auf Grund ihrer Wachstumsgeschwindigkeit in Nährmedien in zwei Gruppen unterteilt werden. Man unterscheidet die schnellwachsenden (Wachstum auf Festmedium < 7 Tage bis Kolonien makroskopisch sichtbar sind), meist human-pathogenen, von den langsam wachsenden Keimen (Wachstum auf Festmedium > 7 Tage), die meist einen pathogenen Charakter aufweisen (Shinnick and Good, 1994). Der *Mycobacterium avium*-Komplex, zu welchem auch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* zählt, gehört zu der Gruppe der atypischen, langsam wachsenden Mykobakterien (Schrauder et al., 2003).

Insgesamt umfasst die Gattung *Mycobacterium* 198 Spezies und 14 Subspezies (LPSN; letzter Stand 03/2019). *Mycobacterium avium* wird derzeit in vier Subspezies unterteilt, wobei diese eine unterschiedliche Wirtsspezifität aufweisen und als Krankheitserreger sowohl beim Tier, als auch beim Menschen eine Rolle spielen. Neben *M. avium* ssp. *paratuberculosis* werden auch *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominissuis* und *M. avium* ssp. *silvaticum* unterschieden (Whitman et al., 2012).

Allen Mykobakterien, wie auch einem Großteil anderer Bakterien, ist dabei zu eigen, dass sie für ihr Wachstum auf eine organische Eisenquelle angewiesen sind. Der Transport des Eisens ist dabei an Siderophore gekoppelt, welche von den Bakterien selbst gebildet werden können (Cocito et al., 1994). Hierbei handelt sich um niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht von < 2000 Dalton und einer hohen Affinität für Fe^{3+} (Stelmaszyk, 2014). Bei Mykobakterien spielen insbesondere zwei Siderophore eine größere Rolle. Zum einen das extrazelluläre Exochelin, welches als Transporter für das aus der Wirtszelle gebundene Eisen fungiert und zum anderen das deutlich lipophilere Mycobactin, welches es dem Bakterium ermöglicht das gebundene Eisen durch die stark hydrophobe Zellwand zu transportieren (Gobin and Horwitz, 1996, De Voss et al., 2000, Wang et al., 2016).

Die meisten MAP-Stämme synthetisieren jedoch kein nachweisbares Mycobactin und sind daher bei der kulturellen Anzucht auf den Zusatz von Mykobaktin J angewiesen (Lambrecht and Collins, 1992). *In vivo* vermehrt sich MAP hingegen auch Mycobactin-unabhängig. Dies kann auf die Fähigkeit zur Bildung von Exochelin zurückgeführt werden, welches es dem Bakterium ermöglicht der Wirtszelle, meist Makrophagen, Eisen zu entziehen und für die eigene Energieversorgung zu nutzen (Lambrecht and Collins, 1992). Die Möglichkeit in Makrophagen unbeschadet zu persistieren, scheint dabei darauf zurückzuführen zu sein, dass MAP die Phagosomenreifung im Makrophagen inhibiert und

sich somit der enzymatischen Zersetzung entziehen kann (Hostetter et al., 2003). Auch in der Umwelt kann MAP über einen längeren Zeitraum persistieren, ist aber nicht in der Lage sich zu teilen oder zu vermehren (Collins, 2003a). In verschiedenen Untersuchungen wurde die hohe Tenazität von MAP dokumentiert, beispielsweise war MAP auch noch nach neun bis vierzehn Monaten in Wasser überlebensfähig (Lovell et al., 1944, Larsen et al., 1956). In Kot kann MAP abhängig von äußeren Faktoren wie Kälte, Trockenheit und Sonneneinstrahlung zwischen 152 und 246 Tagen überlebensfähig bleiben (Lovell et al., 1944).

2.1.3 Stammdifferenzierung

Basierend auf genotypischen und phänotypischen Eigenschaften kann MAP in zwei große Gruppen, den Rindertyp (MAP-C bzw. MAP-Typ II) und den Schaftyp (MAP-S bzw. MAP-Typ-I/III) unterteilt werden. MAP-Typ I und III zeigen deutliche Übereinstimmungen in der Ausprägung phänotypischer Merkmale, aber auch der Wahl des Wirtes (Stevenson, 2010). Sie bilden meist pigmentierte, glatte, gleichförmige Kolonien auf, wohingegen MAP-Typ II nicht-pigmentierte, raue uneinheitliche Kolonien bildet. Der Rindertyp ist in Deutschland am häufigsten vertreten. Er konnte jedoch nicht nur bei Rindern, sondern auch Ziegen, Schafen und freilebendem Rotwild isoliert werden. Der Schaftyp, MAP-Typ-III, betrifft vornehmlich Schafe und kleine Wiederkäuer. Er wurde in Deutschland bisher bei acht Schafen aber auch zwei Rindern nachgewiesen (https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00008949/TGJB_2016_2017-12-19.pdf, letzter Zugriff 03/19).

2.1.4 Wirtsspektrum

Die Paratuberkulose ist eine Erkrankung, die vornehmlich Haus- und Wildwiederkäuer betrifft. Es können aber auch andere Haustierspezies betroffen sein, bei denen es allerdings zu keiner klinischen Manifestation der Erkrankung kommt und die dadurch zu asymptomatischen Ausscheidern werden (Chiodini et al., 1984a, Klee, 2002, Garcia and Shaloo, 2015). MAP konnte jedoch auch in Kot- und Organproben anderer Tiere wie Füchse, Krähen, Ratten, Waldmäusen, Wildkaninchen, Hasen und Dachsen nachgewiesen werden (Beard et al., 2001).

Der Nachweis von MAP bei einer mit starker Diarrhoe einhergehenden klinischen Erkrankung eines Pferdes wurde bislang nur von Rankin (1956) beschrieben. Nach dem Tod des Tieres konnten dabei die für MAP typischen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut festgestellt werden.

2.1.5 Infektionswege

Die meisten klinischen Fälle der Paratuberkulose treten zwischen dem dritten und sechsten Lebensjahr auf und zeichnen sich durch intermittierende oder chronische Diarrhoe, gefolgt von Gewichtsverlust und starker Abmagerung bis hin zum Tod der Tiere aus. Dabei kann die Infektion mit MAP sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen (Olsen et al., 2002).

Die Erstinfektion erfolgt meist schon im Kälberalter, in erster Linie faecal-oral oder durch die Aufnahme des Kolostrums und führt in der Folge zu einer Besiedelung des Darms (Clarke, 1997, Benedictus et al., 2008, Khol et al., 2017). Kälber bis zu einem Alter von einem Jahr zeigen dabei eine besondere Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit MAP (Mortier et al., 2015). Der Erreger passiert nach oraler Aufnahme den Darm und gelangt ins Ileum, wo er von den dort befindlichen M-Zellen aus dem Darmlumen in das darunter liegende Subepithel befördert wird (Momotani et al., 1988, Liang et al., 2016). Des Weiteren kann auch eine kongenitale Infektion des noch ungeborenen Kalbes erfolgen. In einer Studie waren 9 % der Feten subklinisch infizierter Muttertiere und 39 % klinisch manifester Tiere ebenfalls mit MAP infiziert. Die Wahrscheinlichkeit einer in-utero-Infektion war dabei zum einen abhängig von der Herdenprävalenz, aber auch dem Verhältnis subklinisch zu klinisch infizierter Tiere einer Herde (Whittington and Windsor, 2009). Zusätzlich zu einer Erregerübertragung durch Kot oder Milch, wurde auch eine Übertragung durch Sperma beschrieben (Sweeney, 1996). Die Erregerausscheidung mittels Kot steht jedoch nach wie vor im Vordergrund.

2.1.6 Krankheitsverlauf und Symptomatik

Die durch *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* hervorgerufene Paratuberkulose oder Johne's Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine lange Inkubationszeit von bis zu zehn Jahren, geringer Inzidenz und hoher Letalität. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung vor allem durch therapieresistenten Durchfall, starke

Abmagerung und einen Rückgang der Milchleistung (Klee, 1987, Garcia and Shalloo, 2015).

Es werden vier Verlaufsstadien der Erkrankung unterscheiden (Whitlock, 1991), wobei die Einstufung auf den Kriterien Schweregrad der klinischen Symptomatik, Stadium der Erregerausscheidung und diagnostische Nachweisbarkeit der Erkrankung basiert (Tab. 1). Untersuchungen von Whitlock (1992) weisen darauf hin, dass auf jedes Tier mit klinischen Symptomen noch 25 weitere Tiere des gleichen Betriebes kommen, die ebenfalls mit MAP infiziert sind. Nur bei 15 – 25 % dieser Tiere kann die Infektion mittels kulturellem Erreger-Nachweis aus Kotproben detektiert werden (Gilmour et al., 1965). Die klinisch manifesten Tiere stellen somit nur die Spitze des Eisbergs dar (Whitlock and Buergelt, 1996). Tiere, die das klinische Stadium der Paratuberkulose erreicht haben, scheiden mehr als 10^8 MAP/g Kot aus. Bei einer durchschnittlichen Kotmenge von 30 kg Kot/Tag/Tier werden somit ca. 3×10^{12} MAP/Tag ausgeschieden (https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/files/ZooMAP-Goethe_kurz.pdf, letzter Zugriff 01/19).

Tabelle 1: Die vier Stadien der Paratuberkulose-Erkrankung (modifiziert nach Whitlock 1996)

I	<i>Die stille Infektion</i>	Tritt bei Kälbern, Jungvieh aber auch adulten Tieren auf. In diesem Stadium zeigen sich keine Zeichen der Erkrankung. Auch infizierte Kälber bleiben gegenüber Herdengenossen nicht in Gewichtszunahme und Größenwachstum zurück. Einzig ein Erregernachweis in den Geweben infizierter Tiere dient hier als Nachweis der Infektion.
II	<i>Die subklinische Infektion</i>	Es sind vor allem adulte Tiere Überträger und Träger der Erkrankung. Diese sind unter Umständen mittels Antikörpernachweis als positiv detektierbar, zeigen jedoch noch keine Zeichen einer klinischen Erkrankung. Der kulturelle Kotnachweis kann eventuell zu einem negativen Ergebnis führen, da diese Tiere zum Teil nur geringe Mengen des Erregers ausscheiden, jedoch zu einer Kontamination der Umwelt beitragen können. Nur 15-25% der erkrankten Tiere können mittels Kotnachweis identifiziert werden.
III	<i>Die klinisch manifeste Erkrankung</i>	Hier zeigen sich erste Zeichen der Erkrankung wie Gewichtsverlust, Rückgang der Futteraufnahme oder Veränderungen der Kotkonsistenz mit intermittierendem Durchfall. Bei einem Großteil dieser Tiere tritt innerhalb der nächsten 3-4 Monate Stadium IV auf. Die Veränderungen des Blutbildes die mit MAP assoziiert sind, sind zu diesem Zeitpunkt bereits nachweisbar, jedoch noch nicht ausreichend spezifisch für diagnostische Tests.
IV	<i>Die fortgeschrittene klinische Erkrankung</i>	In diesem Stadium zeigen sich bereits deutliche Zeichen der Erkrankung mit zunehmender Schwäche und Lethargie. Auf Grund der Hypoproteinämie, verursacht durch großflächige Läsionen der Darmschleimhaut, kann es zur Bildung intermandibulärer Ödeme kommen (Tiwari, VanLeeuwen et al. 2006). Das finale Stadium der Erkrankung ist gekennzeichnet durch Kachexie und stark wässrige Diarrhoe bis hin zum Tod der erkrankten Tiere.

Typische, durch Paratuberkulose hervorgerufene, pathologische Veränderungen des Darms stellen granulomatöse Enteritis mit regionaler Lymphadenitis, Verdickungen der ilealen Darmwand, Dilatation des Darmlumens und Furchungen der Mucosa einhergehend mit unterschiedlichen Formen der Pigmentierung dar. Des Weiteren scheint eine Infektion mit MAP auch zu einer überschießenden Zellproliferation des Endothels zu führen. Die ileale Serosa weist zudem für gewöhnlich ein ödematisiert granulomatöses Erscheinungsbild auf. Häufig kann auch eine Verdickung und Ödematisierung der mesenterialen und ileocaecalen Lymphknoten beobachtet werden (Clarke and Little, 1996, Liang et al., 2016). Neben Veränderungen an Darm und Lymphknoten geht eine Erkrankung auch mit Veränderungen des Blutbildes einher. Im fortgeschrittenen Stadium zeigt sich, wie bereits oben erwähnt, eine deutliche Hypoproteinämie (Fecteau et al., 2010). Tiere mit geringer Erreger-Ausscheidung (low shedder) zeigten die geringste Reduktion, wohingegen Tiere mit stark erhöhter Erregerausscheidung (high shedder) die höchste Reduktion des Totalprotein-Wertes aufwiesen (Grant, 2010, Donat et al., 2014).

2.1.7 Immunologische Reaktion

Im subklinisch infizierten Stadium der Erkrankung entwickeln sich häufig intestinale Läsionen diffus granulomatöser Natur, die meist auf das Ileum und die Ileocöcalklappe begrenzt sind. Bei diesen persistent infizierten Tieren sind MAP intrazellulär in intestinalen Makrophagen nachweisbar, der Erreger provoziert zudem eine Immun- und Entzündungsreaktion im Gewebe des Wirtstieres (Clarke, 1997, Everman et al., 2015).

Das Immunsystem des infizierten Wirtstieres reagiert auf die infizierten Makrophagen mit einer Ausschüttung aktivierter $\gamma\delta$ T-Zellen, CD4+T Zellen und cytolytischer CD8+ T-Zellen, welche mit den infizierten Makrophagen interagieren. Die aggressive T-Zell vermittelte Immunantwort ist dabei gekennzeichnet durch eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie γ -Interferon (IFN- γ), Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-6 und IL-2, die bei der für MAP typischen, chronischen Verlaufsform letztlich wieder zu einer Schädigung der Epithelzellen des Darms führt. In der späten subklinischen Phase einer Paratuberkulose-Infektion geht die proinflammatorische Typ1-Antwort meist verloren, es überwiegt dann vor allem die Typ2-Immunantwort. In dieser Phase können dann auch höhere Titer an MAP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Hart and Young, 1991, Whitlock and Buergelt, 1996, Stabel, 2000, Coussens, 2001).

Nach klinischer Manifestation der Erkrankung wiesen die Tiere hingegen meist deutlich reduzierte IgG-Titer auf (Koets et al., 2001).

2.1.8 MAP und Morbus Crohn

Als mögliche Ursache des beim Menschen auftretenden Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Erkrankung des Darms, wird seit einigen Jahren eine Infektion mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* diskutiert. Auch beim Morbus Crohn stehen wie bei der bovinen Paratuberkulose Symptome wie lang andauernde Durchfälle, Abmagerung, abdominale Schmerzen und Gewichtsverlust im Vordergrund (Hoffmann et al., 2008). In der Darmwand der Patienten zeigen sich histologische Zeichen einer Immunreaktion wie Infiltration durch Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten. Die Zahl der Plasmazellen kann dabei um das 12-fache, die Anzahl der IgG-produzierenden Plasmazellen um das 60-fache erhöht sein (Baklien and Brandtzaeg, 1976, Fahrländer et al., 1979). Die bei Morbus Crohn auftretenden Läsionen beschränken sich dabei nicht immer ausschließlich auf den Darm, sondern können auch in Mund, Larynx, Ösophagus, Magen oder Haut auftreten (Kirsner and Shorter, 1982). Die Hypothese, dass es sich bei Morbus Crohn um eine Zoonose handelt, basierte zuallererst auf der sehr ähnlichen Symptomatik der beiden Erkrankungen, fand dann aber größere Verbreitung nachdem Untersuchungen pasteurisierter Milch gezeigt hatten, dass MAP durch kommerzielle Pasteurisierungsverfahren nicht immer vollständig abgetötet wird. So konnten Grant et al. (2002) zeigen, dass in 1,8 % der untersuchten, nach herkömmlichen Verfahren pasteurisierten Milchproben noch kulturell anzüchtbare MAP-Zellen nachzuweisen sind. Weitere Indizien für einen Zusammenhang wurden bei der Untersuchung von Darmsegmenten an Morbus Crohn erkrankter Patienten gefunden. In 92 % der Proben konnte MAP nachgewiesen werden (Bull et al., 2003). Auch in einer früheren Untersuchung wurde MAP bereits aus dem Darm Morbus Crohn erkrankter Patienten isoliert (McFadden et al., 1987). Nach Inokulation von Mäusen mit den angereicherten MAP, entwickelten die Tiere Granulome an den mesenterialen Lymphknoten, sowie Leber und Milz (Chiodini et al., 1984b).

In einer weiteren Studie wurden Blutproben von Morbus Crohn Patienten und Patienten mit ulzerativer Colitis sowohl kulturell, als auch mittels PCR auf MAP untersucht und mit Blutproben von Patienten ohne inflammatorische Darmerkrankungen verglichen.

MAP konnte mittels PCR in 46 % der an Morbus Crohn erkrankten, 45 % der an ulzerativer Colitis erkrankten und 20 % der gesunden Patienten nachgewiesen werden. Kulturell ließ sich MAP hingegen nur in Proben erkrankter Patienten nachweisen (Naser et al., 2004).

2.1.9 Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen

Die Rinder-Paratuberkulose ist in Deutschland eine meldepflichtige Erkrankung (<https://www.buzer.de/gesetz/7035/index.htm>, letzter Zugriff 03/18) von der ca. 350 Fälle jährlich bekannt werden. Durch die lange Inkubationszeit ohne Krankheitssymptomatik wird eine frühzeitige Diagnostik erschwert. Nur durch eine Paratuberkulose-freie Kälberaufzucht scheint eine Kontrolle der Erkrankung möglich, da Kälber bis zum ersten Lebensjahr eine besondere Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit MAP aufweisen. Das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft rät dazu, dabei vor allem auf eine hygienische Abkalbung zu achten. Hier ist in erster Linie entscheidend, dass Kälber nicht mit kontaminiertem Kot in Kontakt kommen (Collins, 2003a), welcher das größte Risiko einer Infektion mit MAP darstellt. Aber auch die Verwendung MAP-freien Kolostrums stellt einen wichtigen Aspekt bei der Aufzucht gesunder Kälber dar (https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tiergesundheit/Tierseuchen/Paratuberkulose_Ratgeber.pdf, letzter Zugriff 02/2019). In einer Studie aus dem Jahr 2017 wurden kommerziell erhältliche Milchaustauscher mehrerer Firmen mittels kultureller Anzucht und PCR auf MAP getestet, in keinem der untersuchten Produkte konnte der Erreger nachgewiesen werden. Die Verwendung von Milchaustauschern in der Kälberaufzucht könnte somit ebenfalls zu einer reduzierten Aufnahme von MAP in infizierten Betrieben beitragen (Khol et al., 2017).

Ein einige Jahre kommerziell angebotener Impfstoff erfüllte hingegen die Erwartungen nicht, ein vollständiger Schutz vor Ansteckung konnte damit nicht gewährleistet werden (Chiodini et al., 1984a, Cocito et al., 1994, Dijkhuizen et al., 1994, Körmendy, 1994, Wentink et al., 1994). In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurde überprüft ob eine Vakzination infizierter Rinder mit Präparationen abgetöteter MAP-Keime zu einer verringerten fäkalen Ausscheidung des Erregers führen würde. Dies war allerdings nicht der Fall (Kalis et al., 2001). Eine im Jahr 2006 durchgeführte Studie zur Immunisierung mit dem rekombinanten MAP-Protein Hsp (Heat shock protein) 70 zeigte, dass in den immunisierten Tieren zum einen eine Hsp 70 spezifische Antikörperantwort, zum anderen

auch eine verminderte Erregerausscheidung in den zwei, auf die Immunisierung folgenden, Jahren beobachtet werden konnte (Koets et al., 2006, Santema et al., 2011). Bis heute gibt es jedoch keine Vakzination, die die Tiere zuverlässig vor einer Infektion mit MAP schützt.

Dass grundsätzlich eine effiziente Bekämpfung dieser Tierseuche möglich ist, zeigt das Beispiel Schweden, das auf Grund restriktiver Bekämpfungsmaßnahmen als annähernd Paratuberkulose-frei gilt (Herdenprävalenz ca. 0,5 %). Bestände mit positiven Ergebnissen in serologischen oder kulturellen Untersuchungen werden dabei vollständig der Schlachtung zugeführt (HOLMSTROM, 2005, Frössling et al., 2013).

In Niedersachsen gilt seit dem 1. November 2017 zur Eindämmung der Paratuberkulose eine jährliche Untersuchungspflicht für Milchvieh. Die Niedersächsische Verordnung zum Schutz der Rinder gegen die Paratuberkulose sieht dabei eine jährliche, serologische Untersuchung auf Antikörper gegen MAP aller über 24 Monate alten Zuchtrinder vor. Die Beprobung erfolgt in Form von Sammelmilchproben bzw. Einzelmilch- oder Blutproben. Im Falle positiver oder fraglicher Ergebnisse, muss eine Einzeltierbeprobung stattfinden. Im Anschluss an ein positives Untersuchungsergebnis ist der Landwirt verpflichtet, in Zusammenarbeit mit einem Veterinär Maßnahmen zur Verhinderung einer weiteren Ausbreitung der Erkrankung zu ergreifen (https://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/startseite/meldepflichtige_tierkrankheiten/paratuberkulose/paratuberkulose-bei-rindern-159251.html, letzter Zugriff 01/2019). In anderen Bundesländern gibt es hingegen freiwillige Bekämpfungsprogramme zur Eindämmung der Paratuberkulose. Dazu zählen beispielsweise Thüringen, Rheinland-Pfalz oder Nordrhein-Westfalen. In Thüringen werden hierzu alle über 24 Monate alten Rinder der teilnehmenden Betriebe serologisch auf Antikörper gegen MAP untersucht. Positiv getestete Tiere sollen dann umgehend aus den Betrieben entfernt werden (https://www.thueringen.de/imperia/md/content/tmsfg/abteilung5/ref51/3eprogramm_zur_bek__mpfung_der_paratuberkulose_in_den_rinderbest__nden_in_th__ringen.pdf, letzter Zugriff 12/2018). In Rheinland-Pfalz beprobt der Rindergesundheitsdienst freiwillig teilnehmende Betriebe alle sechs Monate mittels Sockentupfer. Für positiv getestete Betriebe wird dann ein betriebsspezifisches Hygieneprogramm erarbeitet (<http://www.dlr.rlp.de/Internet/global/themen.nsf/0/9815724A3CB5D2AFC1257FF0004977D4?OpenDocument>, letzter Zugriff 11/19).

Eine aktuelle Darstellung der in ganz Deutschland im Jahr 2017 gemeldeten Paratuberkulose Fälle kann dem Jahresbericht des Friedrich-Löffler Institutes (FLI) entnommen werden (Abb. 2)

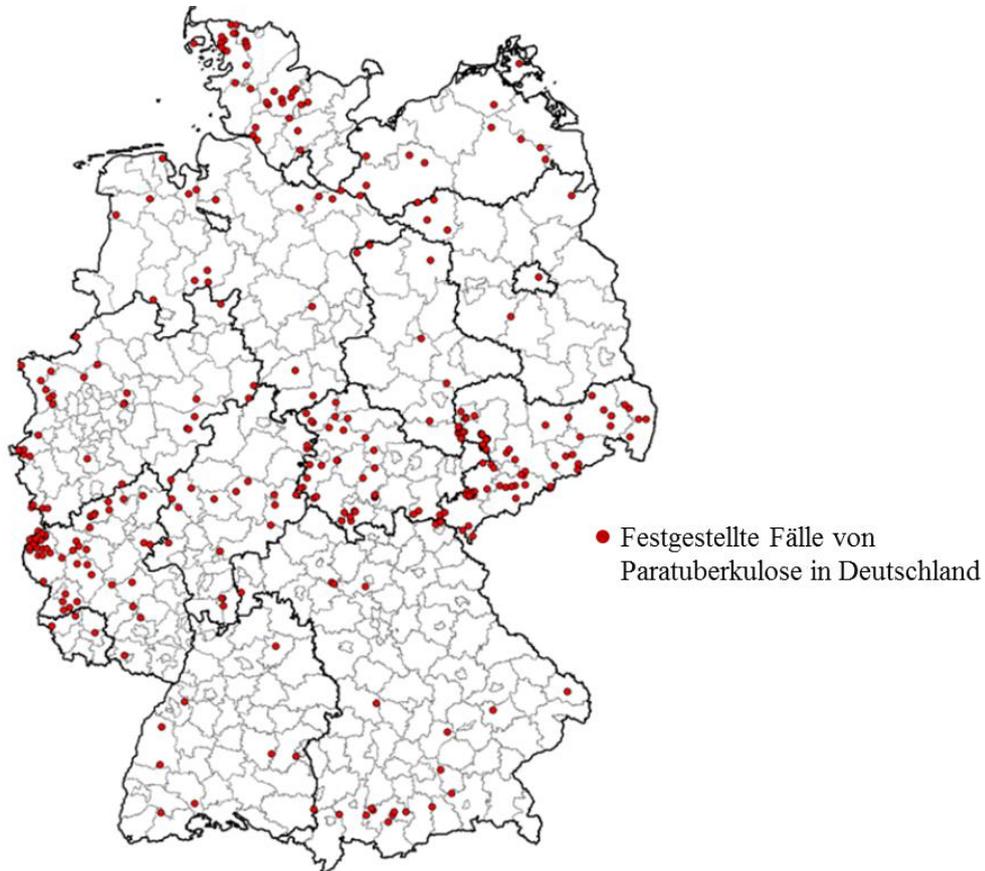


Abbildung 2: Regionale Verteilung der in Deutschland gemeldeten Paratuberkulose Fälle im Jahr 2017 (modifiziert nach Tiergesundheitsjahresbericht 2017 FLI

https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00019033/TGJB_2017_K.pdf, letzter Zugriff 01/19)

2.2 Nachweisverfahren

Die Herausforderung der MAP-Diagnostik liegt vor allem in der Identifizierung der noch nicht klinisch manifest infizierten Tiere, Sensitivität und Spezifität der derzeit eingesetzten Testverfahren stoßen dabei allerdings an ihre Grenzen (Wells et al., 2006). Für den Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* stehen sowohl direkte, als auch indirekte Testverfahren zur Verfügung. Als Goldstandard gilt jedoch nach wie vor der kulturelle Nachweis des Erregers (Clark et al., 2008).

Aber auch Antikörper-basierte Nachweisverfahren wie ELISA, Immunoblot und Immunfluoreszenz kommen zum Einsatz (Collins, 2003b, Nielsen, 2008).

2.2.1 Kultureller Nachweis

Die Detektion von MAP mittels kultureller Anzucht aus Kot stellt bis heute das am häufigsten verwendete Verfahren dar (Whittington, 2010). Der kulturelle Nachweis aus Kotproben gilt dabei - im Gegensatz zu vielen PCR-Verfahren - als 100 % spezifisch, die Testsensitivität liegt allerdings nur bei ca. 60 % (Collins, 2003b, Collins et al., 2006). Auf dem am häufigsten zur Anzucht verwendeten HEYM-Schrägagar (Herrold's egg yolk Medium) bildet MAP unpigmentierte (Cocito et al., 1994), typischerweise kleine, glatte, feuchte und konvexe Kolonien. Bis zur Formung sichtbarer Kolonien auf Festagar können dabei zwischen fünf und zehn Wochen oder mehr vergehen (Merkal and Curran, 1974). Unter *in vitro* Bedingungen wird für das Wachstum von MAP ein Zusatz von Mykobaktin J benötigt, da MAP nicht in der Lage ist, dieses selbst zu synthetisieren (Wang et al., 2016). Neben dem häufig zur kulturellen Anzucht verwendeten HEYM-Schrägagar, wurde aber auch eine Kultivierung von MAP in Mykobaktin J-haltigem Middlebrook 7H9-Flüssigmedium beschrieben (Whipple et al., 1991).

Für eine positive kulturelle Anzucht ist zunächst eine Dekontamination der Kotproben notwendig. Die amtliche Methodensammlung des Friedrich-Löffler Instituts (FLI) rät hierfür zur Verwendung einer 0,75 %igen N-Hexadecylpyridiniumchlorid-Lösung (HPC) (https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00005327/TK18_Paratuberkulose_2014929.pdf, letzter Zugriff 11/2018). Nach erfolgreicher Kultivierung auf HEYM-Agar muss eine Bestätigungsuntersuchung erfolgen. Das FLI verweist hier zum einen auf den Nachweis des für MAP, im Gegensatz zu anderen Mykobakterien, typischen Mykobaktin-abhängigen Wachstums in Kulturen, aber auch auf spezifische PCR-Verfahren. Die Überprüfung der Mykobaktin-Abhängigkeit kann dabei, entsprechend den Vorgaben des FLI, auch bereits mit der Primärkultur erfolgen. Hierfür werden die Proben sowohl auf Mykobaktin J-haltigem, als auch Mykobaktin-freiem Nährmedium angezchtet.

2.2.2 Antikörperbasierte Nachweisverfahren

Die derzeit für die Diagnostik der Paratuberkulose kommerziell erhältlichen Nachweissysteme (z.B. ID Screen® Paratuberculosis Indirect, IDEXX MAP Ab Test, CATTLETYPE MAP Ab ELISA-Testkit) beruhen auf dem Nachweis von gegen MAP gerichteten Serum-Antikörpern. Das dabei in diesen Testverfahren eingesetzte Nachweisverfahren, der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), stellt ein häufig verwendetes analytisches Werkzeug in der Detektion und Quantifizierung spezifischer Antigene und Antikörper dar. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper Bindung, welches es ermöglicht auch kleinste Mengen eines Antigens, wie z.B. Proteine und Peptide in einer flüssigen Probe nachzuweisen. Bei den meisten kommerziellen Testkits werden die Seren vor der Untersuchung mit Antigenen von *M. phlei* präadsorbiert. Damit sollen eventuell vorhandene Antikörper gegen saprophytäre, apathogene Mykobakterien entfernt und so die Spezifität des Nachweises erhöht werden. Die Testverfahren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität (bis zu 99 %) aus, allerdings liegt - wie oben bereits erwähnt - die Sensitivität der Testsysteme oft nur in einem Bereich von 30 - 40 % (Fry et al., 2008). Auch in einer vom FLI durchgeführten Untersuchung wurde bei Überprüfung von Rinderseren nur eine Sensitivität im Bereich von 58 % ermittelt. Die Spezifität der überprüften Testsysteme lag auch hier auf einem sehr hohen Niveau von über 98 %. Bei Verwendung von Milchproben zur Detektion MAP-spezifischer Antikörper konnten meist vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Auch hier lag die Sensitivität in einem Bereich von 54 – 62,2 % und war somit nur geringfügig schlechter als für die verwendeten Serumproben. Die ermittelte Spezifität lag in einem Bereich von 97 – 99 % (https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IMP/Information_NRL_Paratuberkulose.pdf, letzter Zugriff 03/19).

Zum direkten Erregernachweis wurden in den letzten Jahren neben dem kulturellen Verfahren auch eine ganze Reihe alternativer Ansätze überprüft. Eine große Rolle spielt hierbei die Entwicklung monoklonaler bzw. rekombinanter im Idealfall MAP-spezifischer Antikörper (Mutharia et al., 1997, Berger et al., 2006, Bannantine et al., 2007b, O'Brien et al., 2016). Insbesondere die Arbeitsgruppe um J. Bannantine beschrieb in einer Vielzahl von Studien entsprechende Ansätze, wobei gegen eine breite Palette von membranständigen bzw. cytoplasmatischen Proteinen monoklonale Antikörper entwickelt wurden.

Eine im Jahr 2018 veröffentlichte Studie (Bannantine et al., 2018) befasste sich mit der genauen Charakterisierung der über einen Zeitraum von mehr als einem Jahrzehnt etablierten monoklonalen Antikörper gegen MAP. Zur Generierung der Antikörper waren sowohl ganze MAP-Zellen, MAP-Extrakte als auch rekombinante Proteine für die Immunisierung verwendet worden. Letztlich wurde im Laufe dieser Studien nur ein monoklonaler Antikörper identifiziert (Bannantine et al., 2011) der hochspezifisch für MAP war und keine Kreuzreaktivität mit anderen Mykobakterien-Spezies zeigte. Potentielle Einsatzgebiete für die Antikörper liegen zum einen in der Grundlagenforschung (wie z.B. Expression von verschiedenen Proteinen in verschiedenen Infektionsphasen), aber auch in der Entwicklung neuer bzw. Verbesserung bestehender Diagnostika. So können monoklonale Antikörper beispielsweise dazu eingesetzt werden, die Qualität der bei den derzeitigen MAP-Antikörper Nachweisen als Antigen verwendeten MAP-Zelllysaten zu überprüfen bzw. zu optimieren (Bannantine et al., 2018). Ein zweites vielfach beschriebenes Einsatzgebiet ist die Antikörper-basierte Anreicherung von MAP aus Faeces bzw. Milch (Berger et al., 2006, O'Brien et al., 2016). Erstmals beschrieben wurde ein entsprechender Ansatz von Grant et al. (1998). Zur immunomagnetischen Separation und Anreicherung von MAP-Zellen aus unterschiedlichen Matrices (PBS und Milch) wurden mit polyklonalem Kaninchenantiserum gekoppelte paramagnetische Beads hergestellt und mit künstlich kontaminierten Milchproben inkubiert. Die Rückgewinnungsraten lagen hierbei im Bereich von 30 – 40 % (Grant et al., 1998). Unter Verwendung der gleichen Antiseren entwickelten Khare et al. (2004) ein modifiziertes IMS-Verfahren und waren so in Kombination mit einem real-time PCR Verfahren in der Lage, weniger als 10 MAP-Keime pro ml Milch innerhalb eines Arbeitstages nachzuweisen.

2.2.3 Molekularbiologischer Nachweis

Seit einigen Jahren wird auch die PCR (Polymerasekettenreaktion) zur Diagnose der Paratuberkulose eingesetzt. Eine wichtige Rolle spielte dabei die Entdeckung der DNA-Insertionssequenz *IS900*, einer 1451-1453 bp großen chromosomalen Sequenz, welche in 14 - 18 Kopien vorliegt (Green et al., 1989, Stephan, 2007). Millar et al. (1996) wiesen mittels dieser Sequenz MAP das erste Mal in der Matrix Milch nach. Die in der Milch enthaltenen Inhibitoren wirkten sich allerdings negativ auf die Sensitivität aus (Millar et al., 1996). Des Weiteren konnten *IS900* Elemente auch in anderen Mykobakterienstämmen

wie beispielsweise *Mycobacterium scrofulaceum* und *Mycobacterium cookii* nachgewiesen werden, was zu falsch-positiven Ergebnissen führte (Cousins et al., 1999, Naser et al., 1999, Englund et al., 2002). Die von Tasara und Stephan beschriebene Methode zum Nachweis von MAP mittels des F57 Gens weist hingegen eine hohe Spezifität wie auch Sensitivität auf (Tasara and Stephan, 2005). Beim Target handelt es sich um eine aus 620 bp bestehende DNA-Sequenz, die bisher nur im Genom von MAP nachgewiesen werden konnte. In einer anderen vorhergehenden Studie wurde hingegen IS MAV2 als alternatives Target zum spezifischen MAP-Nachweis propagiert (Shin et al., 2004). Dies konnte jedoch in anderen Untersuchungen, bei denen verschiedene PCR-Verfahren verglichen und anhand von MAP-Feldisolaten validiert wurden, nicht bestätigt werden (Möbius et al., 2008).

III. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Reagenzien

Aktivierete Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Roche, 11 428 861 001
Aminopterin	Sigma-Aldrich, A5159-10VL
Bindungspuffer	Bio-Rad GmbH, 153-6151
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, A7030-100G
Casein	Sigma-Aldrich, C8654-500G
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, 04693124001
Cocktail Tabletten	
Dulbecco's MEM	Biochrom GmbH, F 0435
Fetales Kälberserum	Capricorn, FBS-11A
Freundsches Adjuvans, inkomplett	Sigma-Aldrich, F5506
Gibco® HT Supplement	Thermo Fisher Scientific, 11067030
L-Glutamin (220mM)	Biochrom GmbH, K 0282
Natriumpyruvat	Biochrom GmbH, L 0473
PBS Dulbeco	Biochrom GmbH, L 1825
Ponceau S	Sigma-Aldrich, P7170
Proteinase K	Roth, 7528.1
Sigma Adjuvant System®	Sigma-Aldrich, S6322
StabilZyme® HRP Conjugate Stabilizer	SurModics, SZ02.1000

Alle anderen, nicht eigens aufgeführten Reagenzien wurden in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck KGaA bzw. Oxoid bezogen.

3.1.2 Lösungen und Puffer

Enzymimmuntest (EIA)

Absättigungslösung	PBS mit Zusatz von 3 % (g/v) Casein
Bicarbonatpuffer (pH 9,6)	1,59 g Na ₂ CO ₃ , 2,93 g NaHCO ₃ , 1 l A. dest.
Citratpuffer	44,3 g Citronensäure-Monohydrat, 800 ml A. dest., mittels KOH (1 mol/l) auf pH 3,95 einstellen, anschließend 336 µl H ₂ O ₂ zufügen
Stopp-Lösung	H ₂ SO ₄ (1 mol/l)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; pH 7,3)	6,79 g NaCl, 1,47 g Na ₂ HPO ₄ , 0,43 g KH ₂ PO ₄ , 1 l A. dest.
Probenverdünnungspuffer	PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20
Chromogen-/Substratlösung	1 Teil TMB, 20 Teile Citratpuffer
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB-Lösung)	45 ml Methanol, 5 ml Aceton, 252 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Verdünnungslösung für Enzymkonjugate	PBS mit Zusatz von 1 % (g/v) Casein
Waschlösung	8,55 g NaCl, 0,25 ml Tween 20, 1 l A. dest.

Immunoblot

Absättigungslösung	100 ml PBS, 3 g Casein, 25 µl Tween 20
Anodenpuffer I	37,2 g Trizma Base, 200 ml Methanol, 1 l A. dest.
Anodenpuffer II	3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, 1 l A. dest.
Kathodenpuffer	5,24 g 6-Amino-n-Caprinsäure, 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, 1 l A. dest.
Waschlösung	PBS mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween 20

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bromphenolblau-Lösung	0,3 % (w/v) Bromphenolblau in A. dest.
Tris/HCl-Puffer	0,73 g Tris, 100 ml A. dest., mit HCl (1 mol/l) auf pH 8,0 einstellen
SDS-Puffer	0,2 g EDTA, 15 g SDS, 200 ml Tris/HCl-Puffer

Immunomagnetische Separation (IMS)

Waschpuffer	Phosphatpuffer (steril) mit Zusatz von 0,1 % BSA und 2 mM EDTA (pH7,4)
Tweenhaltige Waschlösung	Phosphatpuffer (steril) mit Zusatz von 0,05 % Tween 20
Phosphatpuffer (20 mmol)	Lösung A: 2,12 g Na ₂ HPO ₄ auf 750 ml A. dest., Lösung B: 2,04 g KH ₂ PO ₄ auf 750 ml A. dest., Lösung A durch Zugabe von Lösung B auf pH 7,0 einstellen

Immunaффinitätschromatographie

Elutionspuffer (0,1 mol/l, pH 2,5)	2,25 g Glycin auf 300 ml A.dest.; mit HCl (0,2 mol/l) auf pH 2,5 einstellen
PBS/NaN ₃	PBS mit Zusatz von 0,1 % NaN ₃
Tris/HCl-Puffer (0,1 mol/l, pH 8,0)	24,2 g Tris-Base auf 2 l A. dest.; mit HCl (5 mol/l) auf pH 8,0 einstellen

3.1.3 Immunreagenzien

Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen, A11029
Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse IgG,IgM (H+L)	Invitrogen, A 10684
Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, A11034
Goat anti-Rabbit IgM Secondary Antibody (HRP)	Novus Biologicals, NB7174
HRP Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Peroxidase)	Vector, PI-1000
Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP	Dako, P0161
Polyclonal Swine anti-Rabbit Ig-HRP	Dako, P0217
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L)	Jackson Immunoresearch, 115-035-044

3.1.4 Nährmedien

Feste Nährmedien für Mykobakterien inklusive Medienzusätze

Columbia-Agar mit Schafblut plus (Blutagar)	Oxoid, PB 5039A
Herrold's Egg Yolk Agar mit Mykobaktin (HEYM-Agar)	Becton Dickinson, 222232
Löwenstein-Jensen Schrägagar	Thermo Scientific, TV 5112C
M7H10-Agar	Becton Dickinson, 262710
Mykobaktin J	IDvet MYCO
OADC Enrichment	Becton Dickinson, 211-886

Herstellung M7H10-Nährmedium

19 g M7H10-Pulver im Erlenmeyerkolben abwiegen, 5 ml Glycerin zugeben und mit 900 ml A. dest. auffüllen. Unter Rühren aufkochen lassen. Anschließend bei 121 °C für 10 Minuten autoklavieren und nach Abkühlen auf 55 °C 100 ml OADC-Enrichment unter sterilen Bedingungen zufügen. Den Inhalt eines Fläschchens Mykobaktin J mit 2 x 2 ml 95 % Ethanol lösen und zugeben. Je 25 ml des Mediums in Petrischalen füllen und aushärten lassen.

Flüssige Nährmedien für Mykobakterien inklusive Medienzusätze

ADC Enrichment	Becton Dickinson, 211887
M7H9	Becton Dickinson, 271330
Mykobaktin J	IDvet MYCO

Herstellung M7H9-Nährmedium

4,7 g M7H9-Pulver in einen Erlenmeyerkolben einwiegen, 2 ml Glycerin zugeben und mit 900 ml A. dest. auffüllen. Anschließend für 10 Minuten bei 121 °C autoklavieren. Nach dem Abkühlen 100 ml ADC Enrichment zufügen. Den Inhalt eines Fläschchens Mykobaktin J mit 2 x 2 ml 95 %igem Ethanol lösen und zugeben.

3.1.5 Geräte

Chemilumineszenz Imager UVP ChemStudio	Analytik Jena
Immunfluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence
Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise	Tecan
NovaBlot Multiphor II	GE Healthcare
Photometer Specord 200 Plus	Analytik Jena

3.1.6 Sonstige Materialien

Electrode Paper Novablot	GE Healthcare, 80-1106-19
Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	Life Technologies, 11203D
Immobilon-P Transfermembran 0,45 µm	Millipore, IPVH304F0
Mikrotiterplatten, 96 Loch	Nunc, 439454
Mobicol "classic" 1 ml Columns	Molecular Biotechnology, M 1002
PhastGel Probenauftragskämme 8/1 µl	GE Healthcare, 18-1618-01
PhastGel Gradient 10-15	GE Healthcare, 17-0540-01
PhastGel SDS Pufferstreifen	GE Healthcare, 17-0516-0
CNBr aktivierte Sepharose® 4B	GE Healthcare, 17-0430-01
Zählkammer, Sondertiefe 0,01 mm	VWR

3.2 Methodik

3.2.1 Etablierung einer Mykobakterien-Stammbibliothek

Für die Etablierung einer Mykobakterien-Stammbibliothek wurden Stämme unterschiedlichen Ursprungs eingesetzt. Zum einen wurden bereits am Lehrstuhl vorhandene *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Stämme der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verwendet zum anderen Isolate, die durch Frau Dr. H. Köhler, Friedrich-Löffler Institut (Jena), zur Verfügung gestellt wurden (Tab. 2). Für die unterschiedlichen Fragestellungen erfolgte die Kultivierung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* entweder auf Mykobaktin-haltigem Herrold's Egg Yolk Schrägagar (HEYM-Agar) bzw. in M7H9-Flüssigmedium (Middlebrook 7H9 unter Zusatz von Mykobaktin J und ADC Enrichment). Zur Anreicherung wurden die Stämme bei 37 °C über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen inkubiert.

Tabelle 2: Im Laufe der vorliegenden Arbeit verwendete MAP-Isolate. Alle Stämme wurden standardmäßig auf HEYM-Agar bzw. in M7H9-Flüssigmedium kultiviert.

Stamm/Isolat	Isoliert aus	Herkunft	Stamm/Isolat	Isoliert aus	Herkunft
03A1961	Rind	FLI	10MA2530	Rind	FLI
05A1742	Rind	FLI	12MA0282	Damwild	FLI
06A0056	Rind	FLI	12MA1579	Sockentupfer	FLI
06A0170	Rind	FLI	12MA1581	Sockentupfer	FLI
06A0815	Rotwild	FLI	12MA1583	Sockentupfer	FLI
06A1279	Zwergziege	FLI	15MA0740	Bison	FLI
07A0102	Rind	FLI	16MA0492	Ziege	FLI
07A999	Rind	FLI	DSM 44133	Kotprobe Rind	DSMZ
08MA0563	Rind	FLI	DSM 44135	Kotprobe Rind	DSMZ
10MA2004	Rind	FLI	MS-4	k.A.	JLU

¹ Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Usleber, Justus-Liebig-Universität Gießen

² Zur Verfügung gestellt von Dr. H. Köhler, Friedrich-Löffler Institut Jena

k.A.: keine Angaben

Bei der Überprüfung der Intra-Genus Reaktivität der hergestellten polyklonalen Seren bzw. monoklonalen Antikörper (mAk) wurden zudem Referenzstämme diverser schnellwachsender Mykobakterien eingesetzt (Tab. 3).

Tabelle 3: Für die Überprüfung der Intra-Genus Reaktivität der gewonnenen Antikörper verwendete Mykobakterien

Name	Stamm/Isolat	Isoliert aus
<i>M. asiaticum</i>	DSM 44297	Affe
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	DSM 44156	Hühnerleber
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	DSM 44175	Ringeltaube
<i>M. celatum</i>	DSM 44243	Menschlicher Speichel
<i>M. intracellulare</i>	DSM 43223	-
<i>M. scrofulaceum</i>	DSM 43992	Lymphknoten eines Kindes
<i>M. smegmatis</i>	DSM 43756	-
<i>M. terrae</i>	DSM 43227	Menschlicher Speichel
BCG	LMS	*

* Der Bakterienstamm *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) stammt ursprünglich aus dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel und wurde von Prof. Dr. M. Gareis, Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, zur Verfügung gestellt.

3.2.1.1 Kultivierung der Mykobakterien Stämme

Für die Subkultivierung der MAP-Stämme auf frischen HEYM-Agar wurde mittels abgeflammter Öse eine Bakterienkolonie entnommen und diese großflächig auf dem Schrägagar ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutraum. Nach ca. vier Wochen konnte ein flächiger Bakterienrasen erreicht werden (Abb. 3). Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Kulturen regelmäßig auf Blutagar ausgestrichen und über mehrere Tage bei 37 °C inkubiert.

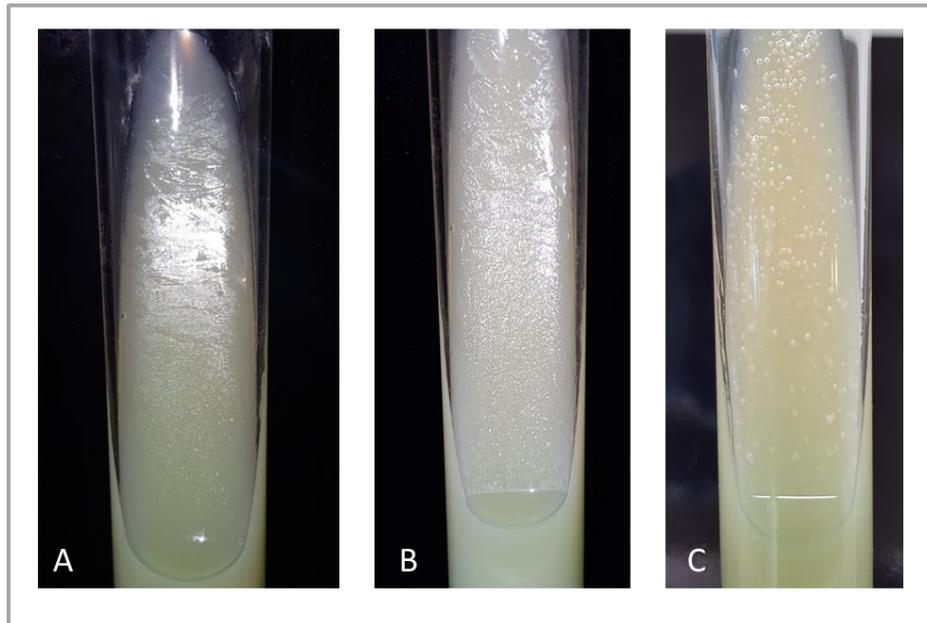


Abbildung 3: Kultivierung von MAP auf HEYM-Agar. (A) Koloniebildung nach 2 Wochen, (B) vier Wochen (C) acht Wochen. Inkubation bei 37 °C

Um Material für die Überprüfung der monoklonalen Antikörper und polyklonalen Antisera zu gewinnen, wurden die auf HEYM-Agar kultivierten Stämme in flüssiges M7H9-Medium überimpft. Dazu wurden die Bakterien zunächst mittels Glaspipette mit 1 ml PBS vom Schrägagar abgespült und anschließend in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde das gewonnene Bakterienpellet in 1 ml PBS resuspendiert und mittels Zählkammer eine Zellzahlbestimmung vorgenommen. Anschließend wurden 20 ml des Mykobaktin J-haltigen M7H9 Mediums mit ca. 1×10^4 KbE des jeweiligen MAP-Stammes inokuliert. In Vorversuchen zeigte sich allerdings, dass unter diesen Anzuchtbedingungen eine ausgeprägte Aggregatbildung bei den eingesetzten MAP-Stämmen auftrat. Um eine homogene Bakteriensuspension zu erhalten, wurde den Ansätzen daher Tween 80 in unterschiedlicher Konzentrationen zugesetzt. Eine Konzentration von 0,3 % (v/v) erwies sich dabei als optimal (Mayer, 2018). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C als Schüttelkultur über mehrere Wochen. Nach etwa zwei Wochen konnte makroskopisch eine deutliche Trübung des Mediums festgestellt werden, nach ca. vier Wochen Bebrütungszeit lag die Zellzahl bei üblicherweise ca. 1×10^9 KbE/ml (Abb.4).

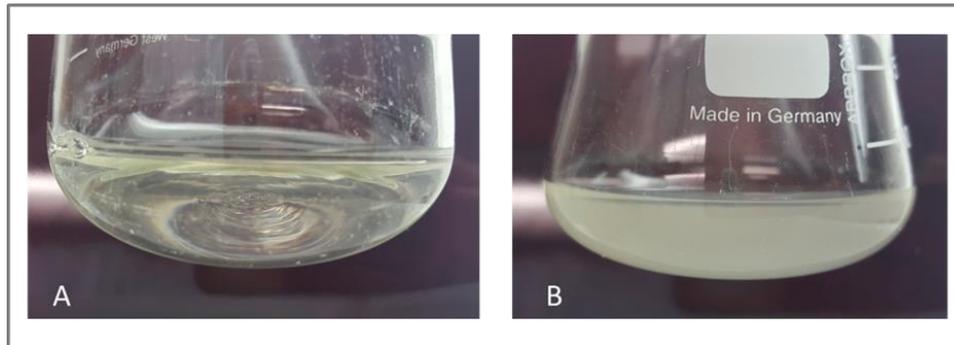


Abbildung 4: Kultivierung von MAP in Middlebrook 7H9 Medium. (A) Frisch inokuliertes M7H9 Medium ohne Trübung, (B) deutliche Trübung durch Bakterienwachstum nach ca. 3 Wochen.

Die Kultivierung der in Tab. 3 aufgeführten Mykobakterien-Spezies erfolgte zum einen auf Löwenstein-Jensen Schrägagar, zum anderen in M7H9-Flüssigmedium. Die Inkubationsdauer bei 37 °C betrug hier, im Gegensatz zu den *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Stämmen, in der Regel nur eine Woche.

3.2.2 Generierung von Hybridomzelllinien

Für die Generierung monoklonaler Antikörper gegen MAP-Zellen wurde die Hybridomtechnik verwendet. Diese beruht auf der Fusion Antikörper-produzierender B-Zellen mit immortalen Myelomzellen. Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß § 10a des Tierschutzgesetzes angezeigt und unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-0-47-2015 genehmigt.

Nach Immunisierung und mehrfacher Restimulierung mit dem entsprechenden Immunogen wurden axilläre Lymphknoten und Milzen der immunisierten Tiere unter sterilen Bedingungen entnommen und mit murinen Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 durch Zugabe von Polyethylenglykol 1500 fusioniert. Die dabei generierten Hybridomzellen wurden anschließend in Zellkulturmedium aufgenommen und auf mit ca. 2500 murinen Peritonealmakrophagen beschichteten Mikrotiterplatten für 10 d bei 37 °C in einem Begasungsbrutschrank (7 % CO₂) kultiviert. Nach 10 d wurden die Zellkulturüberstände (ZKÜ) zur Überprüfung auf MAP-spezifische Antikörper mittels indirektem EIA getestet. Positiv getestete Zelllinien wurden anschließend mittels dreimaliger Endpunktverdünnung

kloniert und vermehrt. Nach umfangreicher Charakterisierung der generierten Antikörper wurden ausgewählte Zelllinien mittels CELLLine™ CL 1.000 massenproduziert.

3.2.3 EIA-Verfahren

Das Verfahren des EIA beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Beim indirekten EIA wurden Mikrotiterplatten mit dem Antigen beschichtet. Im Anschluss erfolgt die Zugabe der zu testenden Antiseren bzw. Zellkulturüberstände. Durch Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers und anschließender Reaktion mit einem Substrat, erfolgt der quantitative Nachweis der Antigen-Antikörper Bindung.

Entsprechend des jeweiligen Versuchsablaufs wurden verschiedene MAP- und Mykobakterien-Präparationen zur Beschichtung der Mikrotiterplatte eingesetzt. Zur Bestimmung der Antikörperaffinität wurden serielle Verdünnungsreihen der Bakterienpräparationen, verdünnt in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) angelegt, für die Ermittlung des Antikörpertiters wurden hingegen konstante Konzentrationen der verdünnten Bakterienpräparationen verwendet (100 µl/Kavität). Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert und die Beschichtung am Folgetag abgesaugt. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden die Mikrotiterplatten anschließend mit 3 % Casein/PBS für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler inkubiert (150 µl/Kavität) und anschließend dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt wurden Antikörperhaltige Zellkulturüberstände (ZKÜ), monoklonale Antikörper (mAK) oder polyklonale Antiseren aufgetragen. Dabei wurden die Antikörper entweder in gleichbleibender Konzentration zur Bestimmung der Antikörperaffinität, oder als Verdünnungsreihe in PBS (Antikörpertiterbestimmung) eingesetzt (100 µl/Kavität). Es folgte eine Inkubation für eine Stunde mit anschließendem viermaligem Waschen. Im nächsten Schritt wurden die mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) markierten Sekundärantikörper, verdünnt in 1 % Casein/PBS, zugegeben (100 µl/Kavität) und die Mikrotiterplatten erneut für eine Stunde inkubiert. Nach anschließendem Waschen (5x) wurde die Chromogen/Substratlösung aufgetragen (100 µl/Kavität), die Platten 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend die Enzymreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (100 µl/Kavität) gestoppt. Zur Auswertung wurde die Extinktion bei 450 nm am ELISA-Reader ermittelt.

3.2.4 Immunfluoreszenz

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde überprüft, ob die zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper bzw. polyklonalen Kaninchenantisera mit Oberflächen-assoziierten Antigenen der MAP-Keime reagieren, wobei an MAP-Zellen gebundene Primärantikörper mittels fluoreszenz-markierter Sekundärantikörper nachgewiesen wurden.

Verwendet wurden zum einen lebende, als auch autoklavierte bzw. durch Einwirkung von Gamma-Strahlung inaktivierte MAP-Präparationen, die eingesetzten Zellzahlen lagen in einem Bereich von 1×10^9 - $2,5 \times 10^9$ MAP/ml. Die lebenden MAP-Zellen wurden aus einer M7H9-Flüssiganzucht, die autoklavierten und bestrahlten Keime aus den bereits in PBS vorliegenden Präparationen entnommen und bei $6.000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in PBS mit Zusatz von 1 % Tween 20 resuspendiert. Anschließend wurde das Kaninchenantiserum in einer 1:50 Verdünnung bzw. die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände in einer 1:5 Verdünnung zugefügt, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei RT im Intellimix [Schwenkradius (F) 60, Geschwindigkeit (rpm) 27]. Nach erneutem Zentrifugieren und Entfernen des Überstandes wie oben beschrieben, wurde das Bakterien-Pellet in 250 μ l PBS aufgenommen und 1 μ l des fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers (Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) bzw. Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG, IgM (H+L)) zugegeben. Es folgte erneut eine 30 minütige Inkubation im Dunkeln auf dem Intellimix. Nach einem weiteren Zentrifugations- und Waschschrift wurde das entstandene Pellet schließlich in 250 μ l PBS resuspendiert, ein Aliquot von 3 μ l auf einen Objektträger aufgetragen und dieses im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

3.2.5 SDS-PAGE und Immunoblot

Eine genauere Charakterisierung der Reaktivität der generierten mAk bzw. polyklonalen Antisera (Maus bzw. Kaninchen) erfolgte mittels Immunoblot. Nach Auffaltung der bakteriellen Proteine mittels SDS und anschließender Auftrennung entsprechend der Molekülgröße mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine im Blotting-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Für die SDS-PAGE wurden neben zellfreien Überständen der Bakterienkulturen auch Präparationen von lebenden, in M7H9 kultivierten MAP-Zellen (Zellzahl ca. 1×10^9 MAP/ml) bzw. autoklavierte MAP eingesetzt. Die

Bakteriensuspensionen wurden hierfür zunächst zentrifugiert, die Überstände abgenommen, 20 μ l mit 10 μ l SDS-Puffer und 3 μ l Bromphenolblau versetzt und anschließend bei 99 °C für 10 min im Thermomix erhitzt. Das nach dem Zentrifugieren entstandene Pellet wurde in 30 μ l SDS-Puffer resuspendiert und ebenfalls im Thermomix erhitzt (99 °C, 10 min). Vor dem Auftrag auf das SDS-PAGE Gel wurden die Präparationen erneut zentrifugiert (5.000 x g, 5 min).

Für die Auftrennung der proteinhaltigen Überstände wurden im nächsten Schritt je 1,3 μ l der Probe auf das Gradienten-Polyacrylamidgel (10 – 15 %) aufgetragen und für ca. 25 min bei 250 V, 10 mA, 3 W, 65 Vh und 15 °C mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Semidry-Blotting Verfahren wurden die aufgetrennten Proteine in einer NovaBlot Multiphor II Blottingkammer vom Polyacrylamidgel auf eine Immobilon P-Membran überführt (1 h, 600 V, 17 mA, 30 W). Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mittels Ponceau-S Lösung reversibel angefärbt und die Eichproteinbanden markiert. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung freier Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C in 3 %iger Casein/PBS-Lösung mit Zusatz von 0,025 % Tween 20 inkubiert.

Am Folgetag wurden die zu testenden Primärantikörper (polyklonale Kaninchenantiseren bzw. monoklonalen Antikörper in Form von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen) verdünnt in Blockierungspuffer auf die Membran aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen (3 x 10 min) auf dem Taumelschüttler entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit enzymmarkierten Sekundärantikörpern (Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP 1:2.000 bzw. HRP Goat Anti-Rabbit IgG Antibody 1:2.000) verdünnt in 1 % Casein/PBS mit Zusatz von 0,025 % Tween 20, gefolgt von einem erneuten dreistufigen Waschschrift. Zur Detektion gebundener Antikörper wurde die Membran nach dem Waschen für ca. 3 min im Dunkeln mit SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate inkubiert und die entstandene Chemilumineszenz mittels Imager dokumentiert.

3.2.6 Immunomagnetische Separation

Die immunomagnetische Separation (IMS) ist eine Methode zur selektiven Anreicherung von Bakterien. Dabei werden zwei Trennprinzipien verfolgt. Zunächst findet eine Kopplung spezifischer, gegen ein Zielantigen gerichteter Antikörper an die Oberfläche paramagnetischer Mikropartikel statt. Durch die anschließende Inkubation mit den Bakterien kommt es zu einer selektiven Antigen-Antikörperbindung, bei der die Bakterien an die paramagnetischen Partikel gebunden werden. Nicht gebundene Bakterien werden mit den Waschschrritten entfernt. Durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes können die magnetischen Beads, die zuvor homogen in Lösung vorlagen, aus der vorliegenden Suspension separiert und gebundene Bakterien anschließend mittels kulturellen oder molekularbiologischen Nachweisverfahren detektiert werden (Ivnitski et al., 1999, Howe and Harding, 2000, Langer, 2012). Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Vorgehensweisen orientieren sich an dem von Grant et al. (1998) beschriebenen Ansatz zur Isolation von MAP aus Milch unter Verwendung der IMS.

Für die Immobilisation von Antikörpern an die magnetischen Beads wurde gefälltes Kaninchenantiserum (16 µg Protein in 50 µl sterilem PBS) mit Dynabeads ($6 - 7 \times 10^8$ Beads/ml; ~10 mg/ml) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur, sowie anschließend für 24 h bei 4 °C unter leichten Kipp- und Drehbewegungen im Intellimixer inkubiert (F 60, rpm 7). Durch Aktivierung des Magnetfeldes wurden die Beads aus dem Ansatz entfernt. Die Antikörper-beladenen Beads wurden anschließend noch viermal mit jeweils 1 ml sterilem Waschpuffer gewaschen, um eventuell unspezifisch gebundene Serumbestandteile zu entfernen. Die gewaschenen Beads wurden schließlich in 200 µl sterilem PBS resuspendiert.

Zur immunomagnetischen Separation von MAP-Zellen aus fettarmer Milch (Fettgehalt 0,1 %), bzw. sterilem PBS wurde 1 ml der Probenflüssigkeit mit 10 µl der so vorbehandelten Dynabeads versetzt. Nach Inkubation der Ansätze für 1 h Stunde im Intellimixer (F99, rpm 6) wurden die Beads magnetisch separiert und anschließend zweimal mit 1 ml PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Magnetbeads in einem Volumen von 200 µl PBS/Tween aufgenommen. Gebundene MAP wurden mikrobiologisch nach Anreicherung auf M7H10-Nährböden nachgewiesen (Bebrütung für 4 Wochen bei 37 °C)

3.2.7 Immunaffinitäts-Chromatographie (IAC)

Zur Anreicherung der mit den mAks reaktiven MAP-Proteine wurde die IAC eingesetzt. Dazu wurden gereinigte Antikörper nach Anleitung des Herstellers kovalent an ein Trägermaterial (CNBr-aktivierte Sepharose 4b) gekoppelt, eingesetzt wurden hierfür 16 mg mAks und 1 g Gelmatrix (entspricht 3,5 ml gequollenem Gel).

Zur Überprüfung der Antigenbindungskapazität wurden 300 µl des gekoppelten Gels in eine Mini-Säule (MoBiTec) überführt und anschließend mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden steril-filtrierte Überstände von in M7H9-Bouillon kultivierten MAP-Stämmen auf die Säule aufgetragen. Nach dem Spülen der Säule mit 1 x 5 ml PBS, wurden die gebundenen Antigenbestandteile mit 2 x 3 ml Glycin/HCl eluiert. Das Eluat wurde durch sofortige Zugabe von Bicarbonat-Puffer (0,05 mol/l, pH 9,6) neutralisiert. Von allen Fraktionen (Probendurchlauf, Spüldurchlauf, Eluat) wurden im indirekten EIA die Antigen-Konzentrationen ermittelt und nach Bilanzierung die Effizienz des IAC-Verfahrens berechnet.

IV. Ergebnisse

4.1 Herstellung von MAP-Präparationen

4.1.1 Herstellung der Immunogene

Für die Herstellung der Immunogene wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. Für Ansatz A wurde MAP-Stamm DSM 44133 eingesetzt, die Anreicherung der Zellen erfolgte parallel auf HEYM-Nährmedium und in M7H9-Flüssigbouillon. Für die Herstellung der MAP-Präparationen wurden zum einen drei, über vier Wochen kultivierte, HEYM-Röhrchen mittels PBS abgeschwemmt. Nach Zentrifugation bei 6.000 x g für 10 min wurde das Bakterienpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden auf diese Weise dreimal gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Zum anderen wurden Bakterien in M7H9-Medium für vier Wochen in Schüttelkultur kultiviert und anschließend ebenfalls wie oben beschrieben zentrifugiert und gewaschen. Nach Zusammenführen der beiden MAP-Präparationen (jeweils 200 µl Bakteriensuspension) wurde zum Schutz vor proteolytischem Abbau noch ein Proteaseinhibitor-Mix im Volumen-Verhältnis von 1:10 zugefügt. Um eine möglichst schonende Inaktivierung der Keime zu erreichen, wurde - wie dann auch später für Ansatz B - eine Bestrahlung mittels γ -Strahlung mit 15 kGray gewählt. Die Bestrahlung der Keime erfolgte durch die Firma Steris (Allershausen). Ansatz A wurde für die Grundimmunisierung und anschließende Restimulierung von Kaninchen sowie Mäusen (1. Immunisierungsansatz) verwendet. Allerdings zeigte sich, dass in den induzierten Kaninchen- bzw. Mäuseantisera auch eine Kreuzreaktivität mit Bestandteilen des HEYM-Mediums nachweisbar war.

Um in einem zweiten Immunisierungsansatz bei Mäusen zum einen eine breitere Immunantwort zu erhalten und eventuell auftretende unerwünschte Reaktivitäten mit Medienbestandteilen zu vermeiden, wurde ein neuer Ansatz zur Immunogen-Herstellung gewählt. In Ansatz B wurden zum einen MAP-Präparationen verschiedener MAP-Stämme (DSM 44133, 44135 und MS-4) eingesetzt, zum anderen wurden ausschließlich in M7H9-Medium kultivierte Bakterien verwendet. Zusätzlich wurden die Bakterienkulturen statt in 1 ml PBS in jeweils 20 ml PBS gewaschen. Tab. 4 gibt einen Überblick zu den unterschiedlichen Immunogenen.

Tabelle 4: Vergleich der beiden unterschiedlichen Immunogen-Präparationen

	Stamm/Isolate	Anreicherungsmedien	Verwendung
Immunogen A	DSM 44133	HEYM/M7H9	Immunisierung Kaninchen; 1. Immunisierungsansatz Mäuse
Immunogen B	DSM 44133,44135, MS-4	M7H9	2. Immunisierungsansatz Mäuse

4.1.2 Antigen-Präparationen für EIAs

Für die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper bzw. polyklonalen Seren wurden verschiedene mittels unterschiedlicher Mechanismen inaktivierte Mykobakterien-Präparationen eingesetzt. Zum einen wurden die Bakteriensuspensionen mittels γ -Strahlung inaktiviert, zum anderen wurde eine Inaktivierung mittels Hitzeinaktivierung (Autoklavieren) vorgenommen. Hierfür wurden die Bakterienanzuchten wie bei der Herstellung des Immunogens beschrieben aus dem entsprechenden Medium gewonnen und anschließend mehrfach gewaschen. Die in 1 ml PBS resuspendierten Bakterienpellets wurden anschließend für 10 min bei 121 °C autoklaviert.

4.2 Polyklonale Kaninchenantisera

4.2.1 Immunisierung der Kaninchen

Es wurden zwei Kaninchen mit den unter 4.1.1 beschriebenen MAP-Präparationen immunisiert. Die Herstellung der polyklonalen Kaninchenantisera erfolgte extern durch Herrn Prof. Dr. H. Ammer (Herstellung und Vertrieb von Antikörpern in Kissing). Vor Beginn der Immunisierung wurde beiden Tieren zunächst Blut für die Gewinnung des Präimmuserums entnommen. Zur Immunisierung der Tiere wurden die inaktivierten MAP-Präparationen in inkomplettem Freund-Adjuvans emulgiert, pro Tier wurden Keimzahlen von $1 - 2 \times 10^8$ subkutan appliziert. Im Abstand von jeweils drei Wochen wurden die Tiere restimuliert.

Zur Überprüfung des Immunisierungsverlaufs wurde den Tieren insgesamt dreimal Blut entnommen und die gewonnenen Seren mittels EIA getestet. Die Details des Immunisierungsschemas sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Immunisierung von Kaninchen mit MAP, als Immunogen wurde eine Präparation des MAP-Stammes DSM 44133 eingesetzt

Woche	Behandlung	Adjuvans
-1	Entnahme Präimmunserum	
0	Erstimmunisierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
3	1. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
6	2. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
7	1. Blutentnahme	
9	3. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
10	2. Blutentnahme	
12	4. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
13	3. Blutentnahme	
16	5. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
21	6. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans
23	Entnahme des Endserums	

4.2.2 Bestimmung der Antikörper-Titer

Zur Überprüfung des Antikörpertiters der bei den beiden immunisierten Tieren (Kaninchen I, II) zu unterschiedlichen Zeiten gewonnenen Antiseren wurde ein indirektes EIA-Verfahren verwendet. Hierfür wurde zunächst eine Beschichtung der Mikrotiterplatte mit einer konstanten Konzentration einer in M7H9 kultivierten und anschließend autoklavierten MAP-Präparation des DSM Stammes 44135 verwendet. Definiert wurde der Antikörper-Titer als diejenige Verdünnungsstufe, bei der unter den in 3.2.3 beschriebenen EIA-Bedingungen eine Extinktion von 1,0 erzielt wurde. Da bakterielle Oberflächenantigene oft nur eine kurzfristige IgM-Antwort induzieren, wurden alle Seren unter Verwendung spezifischer Peroxidase-markierter Sekundärantikörper auch dahingehend überprüft, ob die MAP-Reaktivität auf IgM- oder IgG-Antikörpern beruht, und ob im Immunisierungsverlauf eine deutliche Änderung des relativen Anteils der Isotypen zu beobachten war. Zur Überprüfung dieser Serokonversion wurden Isotyp-spezifische Sekundärantikörper eingesetzt.

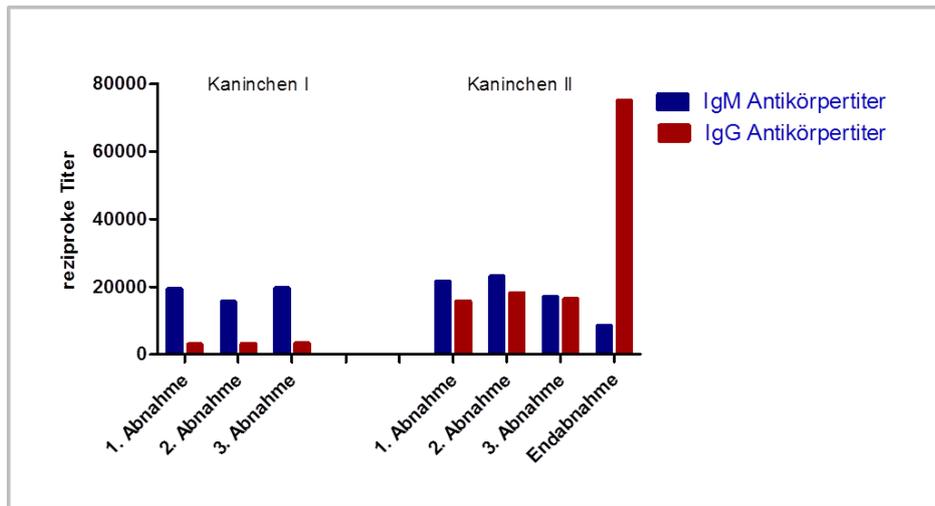


Abbildung 5: Vergleichende Darstellung der gegen MAP-Zellen bei Kaninchen I und II im Verlauf der Immunisierung nachweisbaren IgM- bzw. IgG Antikörper-Titer

Für den Nachweis der IgM-basierten Immunantwort wurde der spezifische Sekundärantikörper Goat anti-Rabbit IgM Secondary Antibody (HRP) (Novus Biologicals, NB7174) verwendet. Bei allen im Laufe der Immunisierung gewonnenen Seren des Kaninchens I wurden als MAP-reaktive Antikörper vor allem IgM detektiert. Es zeigte sich zudem im Verlauf der Abnahmen kein signifikanter Anstieg des IgM Antikörper-Titers. Die Titer lagen konstant in einem Bereich von 1:15.500 bis 1:19.500 (Abb. 5).

Bei den Seren des Kaninchens II konnte im Verlauf der Immunisierung hingegen ein deutlicher Abfall des IgM-Titers beobachtet werden (Abb. 6). Die nachweisbaren Titer lagen zu Beginn bei 1:21.400 und sanken bis zur Endabnahme auf einen Wert von 1:8.400.

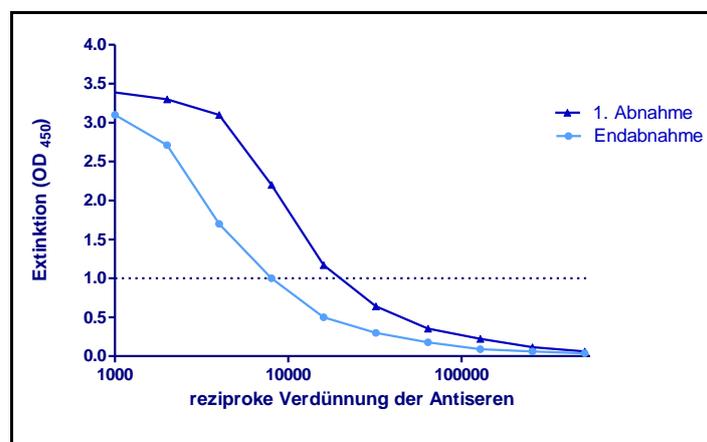


Abbildung 6: Deutlich erkennbarer Abfall der IgM-vermittelten Immunantwort des Kaninchens II zwischen der ersten Blutentnahme und der Endabnahme

Zum Nachweis von MAP-spezifischen IgG-Antikörpern in den Kaninchenseren wurde der HRP Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Vector, PI-1000) als Sekundärantikörper eingesetzt. Für die Seren des Kaninchens I konnte auch nach mehrmaliger Restimulierung kein Anstieg des IgG-Titers beobachtet werden (Abb. 7). Der Antikörper-Titer lag vielmehr über den gesamten Immunisierungszeitraum auf einem relativ niedrigen Niveau von 1:2.900 zu Beginn der Immunisierung bzw. bei 1:3.200 bei der 3. Abnahme. Somit konnte bei diesem Tier weder ein signifikanter Anstieg der MAP-spezifischen Titer noch eine Serokonversion von IgM zu IgG festgestellt werden.

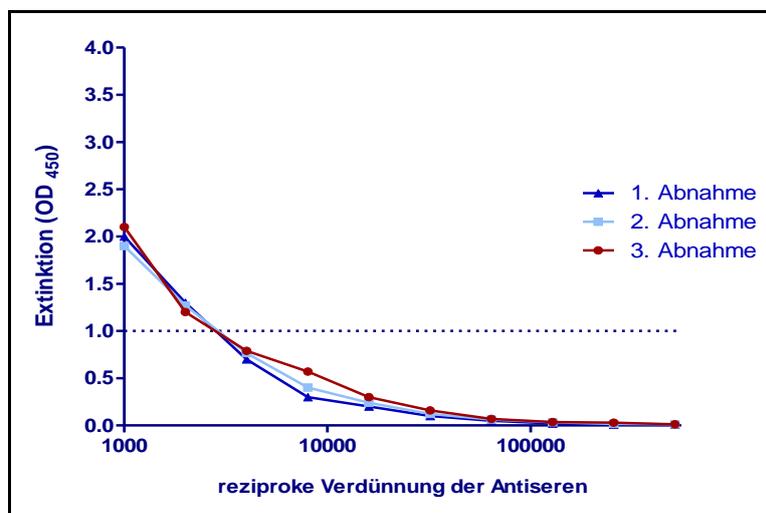


Abbildung 7: Nachweisbare IgG-Antikörper gegen MAP-Zellen in den Seren von Kaninchen I. Im Laufe der Immunisierung konnte kein Anstieg des IgG-Titers nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigten die Seren von Kaninchen II schon bei den ersten Abnahmen einen deutlich höheren IgG-Antikörpertiter. Auch die im Verlauf der Immunisierung zu erwartende Serokonversion konnte für Kaninchen II nachgewiesen werden, insbesondere bei dem in der 23. Immunisierungswoche gewonnenen Endserum wurde ein signifikanter Anstieg des IgG-Antikörper-Titers beobachtet (Abb. 8). Der ermittelte Antikörpertiter lag hier mit einem Wert von 1:74.900 deutlich (ca. Faktor 5) über dem in Woche 7 gemessenen IgG-Titer von 1:15.700 (Abb. 5).

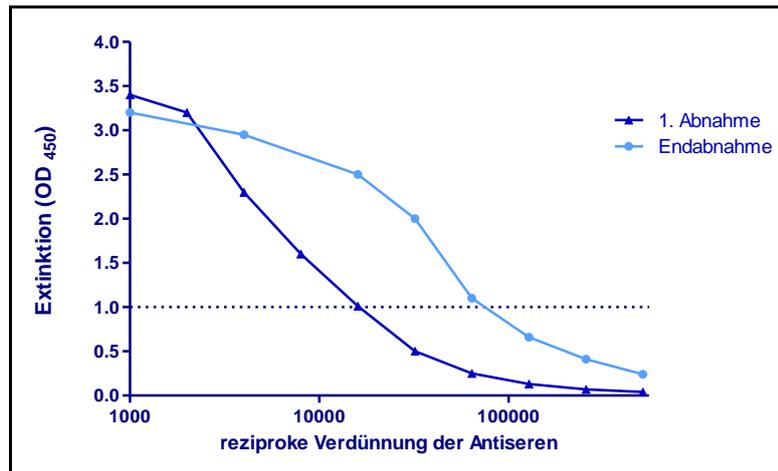


Abbildung 8: Vergleichender IgG-Titer der bei der 1. Blutentnahme (Woche 7) und am Ende der Immunisierung (Woche 23) gewonnenen Seren von Kaninchen II.

4.2.3 Überprüfung der Reaktivität

Um ein effizientes Nachweisverfahren von MAP basierend auf diesen polyklonalen Kaninchenantiseren zu etablieren, wurden in orientierenden Vorversuchen Medienbestandteile auf mögliche Reaktivitäten untersucht und unterschiedliche Verdünnungslösungen der Antiseren zur Reduktion des Backgrounds getestet. Der Background wurde dabei als diejenige Extinktion definiert, die für den antigenfreien Kontrollansatz (Beschichtung der Mikrotiterplatten mit PBS) ermittelt wurde.

Orientierende Vorversuche zeigten, dass im zur Charakterisierung verwendeten indirekten EIA auch bei Serum-Verdünnungen von 1:1.000 im antigenfreien Ansatz noch Absorptionen von 0,5 auftraten. Dies wurde als Hinweis darauf gewertet, dass die polyklonalen Seren neben MAP-spezifischen Antikörpern auch andere, mit der verwendeten Absättigung reaktive Antikörper enthielten. Zur Reduktion dieses unerwünschten Background-Signals wurden verschiedene Varianten überprüft, letztlich ließ sich bei Verwendung einer 1 %igen Casein/PBS Lösung als Verdünnungslösung für die Antiseren eine deutliche Reduktion des Backgrounds um 50 % erzielen (Extinktion im antigenfreien Kontrollansatz bei 0,2). Bei der nachfolgenden detaillierten Charakterisierung der Kaninchenantiseren wurden daher die Seren standardmäßig 1:2.000 in 1 %igem Casein/PBS verdünnt.

Im Hinblick auf die Einsetzbarkeit der gewonnenen Antiseren in indirekten EIAs zum Nachweis von MAP in verschiedenen Anreicherungsmedien wurden die Seren im weiteren Verlauf auch auf solche unerwünschten Reaktivitäten getestet. Geprüft wurden insbesondere Reaktivitäten mit den bei der Herstellung des Immunogens verwendeten Nährmedien nämlich HEYM-Agar bzw. M7H9-Flüssigmedium. Daneben wurden auch mögliche Reaktivitäten mit dem zur Stabilisierung der Immunogen-Präparationen verwendeten Proteaseinhibitor-Mix getestet. Präparationen der unterschiedlichen Anzuchtmedien wurden in seriellen Verdünnungsreihen zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzt, nach der Absättigung mit 3 %igem Casein/PBS wurden die Antiseren in einer konstanten 1:2.000 Verdünnung aufgetragen. Die polyklonalen Kaninchenantiseren zeigten auch bei einer Verdünnung der Antigen-Präparation von 1:2.000 noch eine deutliche Reaktivität mit Medienbestandteilen des HEYM-Agar (ermittelte Absorption in einem Bereich von > 3), während für M7H9 und Proteaseinhibitor eine geringere Reaktivität festgestellt wurde (Absorption im Bereich von 1,14 bis 0,46). Dieses Reaktivitätsmuster ist exemplarisch in Abb. 9 für das bei der Endabnahme gewonnene Serum des Kaninchens II dargestellt. Auf Grund dieser ausgeprägten Reaktivität der Seren mit Medienbestandteilen des HEYM-Schrägagars wurden für die im weiteren Verlauf der Arbeit durchgeführte Überprüfung der Intraspezies- und Intra-Genus- Reaktivität ausschließlich in M7H9-Flüssignährmedium hergestellte und nachfolgend mit PBS gewaschene MAP-Präparationen verwendet.

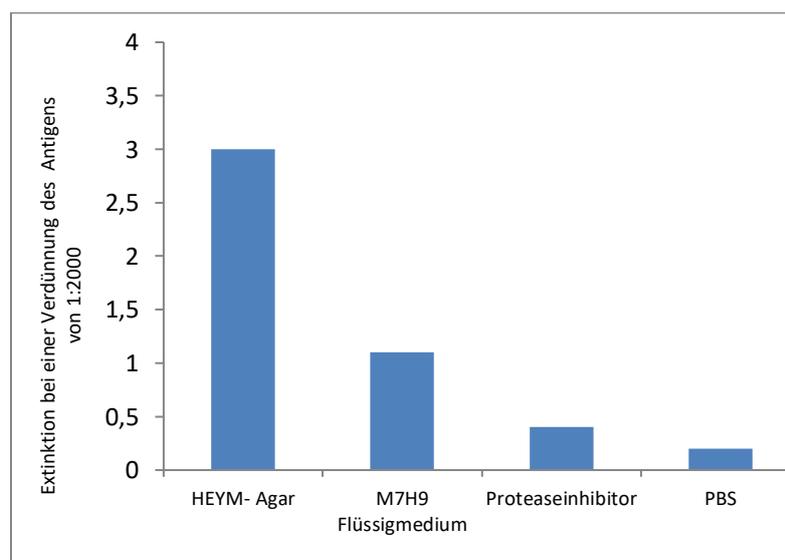


Abbildung 9: Reaktivität des Antiserums (Endabnahme) von Kaninchen II mit unterschiedlichen Medien- und Präparationsbestandteilen.

4.2.4 Relative Antikörperaffinität

Zur Überprüfung der relativen Antikörperaffinität der polyklonalen Seren wurde ein indirekter EIA wie unter 3.2.3. beschrieben eingesetzt. Hierfür wurden auf den Mikrotiterplatten serielle Verdünnungsreihen der MAP Präparation (DSM 44135) angelegt und diese über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absättigung der Platten wurden die zu charakterisierenden polyklonalen Antiseren in einer konstanten Verdünnung von 1:2.000 aufgetragen und letztlich gebundene Antikörper durch anschließende Zugabe peroxidasemarkierter Sekundärantikörper detektiert.

Untersuchungen zur relativen Affinität der gegen MAP gerichteten IgM-Antikörper in den Seren zeigten, dass bei Kaninchen I erst gegen Ende der Immunisierung eine gewisse Steigerung auftrat, für die getesteten MAP-Präparationen wurde dann noch bei einer Verdünnung von 1:66.000 eine Background-bereinigte Extinktion von 0,2 im EIA erzielt (Abb.10). Dies entspricht in etwa einer Nachweisgrenze von ca. $1,9 \times 10^5$ KbE/ml. Im Gegensatz hierzu wurde bei den Seren des Kaninchens II im Verlauf der Immunisierung eine sinkende relative Affinität der IgM-Antikörper festgestellt, die technisch bedingt aber auch auf den rückläufigen IgM-Antikörpertiter zum Ende der Immunisierung zurückzuführen sein könnte. Zu Beginn der Blutentnahmen konnte noch bei einer Verdünnung der Antigenpräparation von 1:53.000 eine Extinktion von 0,2 ermittelt werden, bei Einsatz des Endabnahme-Serums lagen die Werte nur noch bei 1:14.000. Die niedrige Affinität äußerte sich dann auch in einer deutlich schlechteren Nachweisgrenze von ca. 8×10^5 KbE/ml.

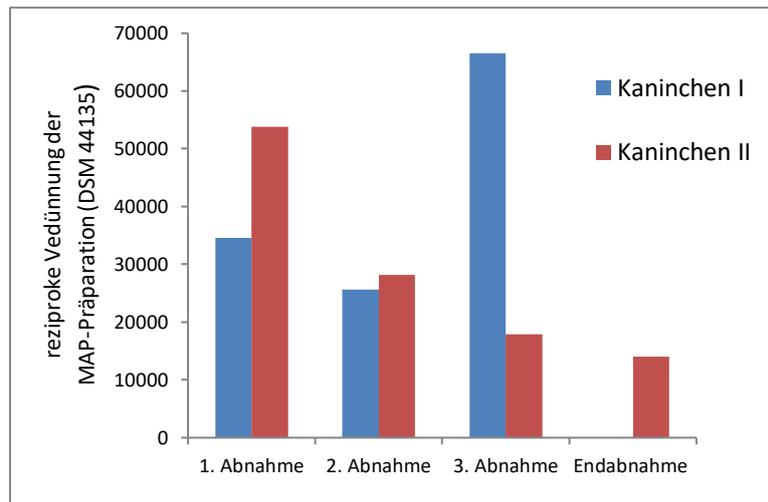


Abbildung 10: IgM-basierte relative Affinität der MAP-spezifischen Kaninchenantisera. Mikrotiterplatten wurden mit einer seriellen Verdünnungsreihe des DSM-Stammes 44135 beschichtet, gebundene Antikörper wurden mit einem IgM-spezifischen Sekundärantikörper detektiert.

Die in Abb.11 zusammengefassten Ergebnisse zur IgG-basierten Affinität der Seren verdeutlichen die unterschiedliche Immunantwort der beiden immunisierten Kaninchen I und II. Grundsätzlich beschränkte sich die MAP-spezifische Immunantwort bei Kaninchen I auf sehr niedrige IgG-Titer (Abb. 5), die Antikörper wiesen zudem nur eine geringe relative Affinität für die in die EIAs eingesetzten MAP-Präparationen auf.

In den Seren des Kaninchens II konnten hingegen schon in einem relativ frühen Stadium der Immunisierung mit MAP reaktive Antikörper vom IgG-Isotyp nachgewiesen werden (Abb. 11), die relative Affinität dieses Serums lag deutlich höher als die der bei Kaninchen I gewonnenen Seren. So wurden bereits mit der 1. Abnahme bei einer relativ hohen Verdünnung der Antigen-Präparation von 1:38.400 (entspricht in etwa $3,9 \times 10^5$ KbE/ml) Extinktionen von 0,2 im EIA erreicht. Bei Einsatz des Endabnahme-Serums konnte dann eine Nachweisgrenze von $1,9 \times 10^5$ KbE/ml erzielt werden. Aufgrund der deutlich besseren Charakteristika (hohe IgG-Titer und gute Affinität) wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch mit dem bei der Endabnahme gewonnenen Serum von Kaninchen II gearbeitet.

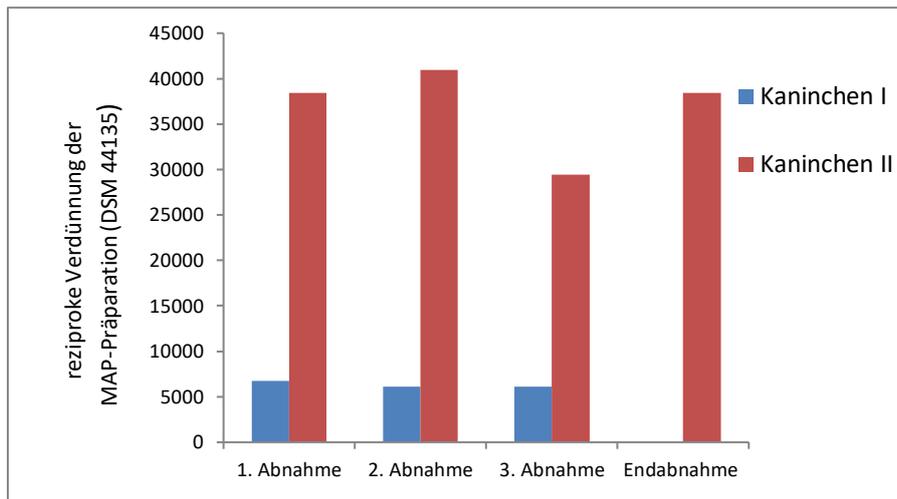


Abbildung 11: IgG-basierte relative Affinität der MAP-spezifischen Kaninchenantisera. Mikrotiterplatten wurden mit einer seriellen Verdünnungsreihe des DSM-Stammes 44135 beschichtet, gebundene Antikörper wurden mit einem IgG-spezifischen Sekundärantikörper detektiert

Für die Überprüfung der Intraspezies-Reaktivität wurden die durch das FLI zur Verfügung gestellten MAP Stämme, wie auch Präparationen des DSM Stammes 44133 und MS-4 in den EIA eingesetzt, wobei von allen Stämmen sowohl autoklaviertes, als auch bestrahltes Material untersucht wurde. Die Bestimmung der Keimzahl in den jeweiligen Bakterien-Präparationen basierte auf der Messung der Optischen Dichte, zur Erstellung der Eichgeraden wurden in M7H9-Medium kultivierte MAP-Anzuchten (DSM 44133) verwendet.

Nach Beschichtung der Mikrotiterplatte wie oben beschrieben, wurde das spezifische Antiserum in einer konstanten 1:2.000 Verdünnung in 1 %igem Casein/PBS aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog wie oben beschrieben. Die in Tab. 6 zusammengefassten Untersuchungen zur Intra-Spezies-Spezifität belegen die breite Reaktivität des Kaninchen-Antiserums. Tendenziell wurden bei den meisten Isolaten für die bestrahlten Keim-Präparationen etwas geringere Nachweisgrenzen als für die autoklavierten Bakterien ermittelt. So lagen bei den autoklavierten Präparationen die Nachweisgrenzen in einem Bereich von $3,6 \times 10^4$ KbE/ml bis 3×10^6 KbE/ml, bei den bestrahlten Bakteriensuspensionen hingegen bei $3,9 \times 10^4$ KbE/ml bis $2,3 \times 10^5$ KbE/ml.

Tabelle 6: Nachweisbarkeit von 19 verschiedenen MAP-Isolaten bzw. Stämmen im indirekten EIA unter Verwendung des Kaninchenantiserums II. Untersucht wurden in M7H9-Medium angereicherte und dann durch Autoklavieren bzw. γ -Strahlung inaktivierte MAP-Präparationen

FLI-Stamm	Nachweisgrenze in KbE/ml				
	Autoklavierte Keime	Bestrahlte Keime	FLI-Stamm	Autoklavierte Keime	Bestrahlte Keime
03A1961	1×10^5	$5,8 \times 10^4$	10MA2530	3×10^6	8×10^4
05A1742	1×10^6	7×10^4	12MA0282	3×10^5	$4,6 \times 10^4$
06A0056	6×10^5	$6,2 \times 10^4$	12MA1579	3×10^5	5×10^4
06A0170	2×10^5	$4,6 \times 10^4$	12MA1581	3×10^4	$1,7 \times 10^5$
06A0815	2×10^5	$4,2 \times 10^4$	12MA1583	3×10^5	5×10^4
06A1279	1×10^5	$1,7 \times 10^5$	15MA0740	2×10^5	$7,4 \times 10^4$
07A0102	3×10^5	$3,9 \times 10^4$	16MA0492	3×10^5	$8,9 \times 10^4$
07A999	1×10^5	$5,8 \times 10^4$	DSM 44133	$3,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
08MA0563	2×10^5	$7,4 \times 10^4$	MS-4	$1,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
10MA2004	6×10^5	$1,5 \times 10^5$			

4.2.5 Intra-Genus Reaktivität

Für die Beurteilung der Intra-Genus Reaktivität wurde die Endabnahme des Kaninchenserums in weiteren Untersuchungen mit autoklavierten Präparationen schnellwachsender Mykobakterien getestet. Hierfür wurden, wie unter 3.2.3. beschrieben, indirekte EIA-Untersuchungen durchgeführt. Für die Beschichtung der Mikrotiterplatte, über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Mykobakterien-Präparationen in seriellen Verdünnungsstufen eingesetzt und am nächsten Tag mit dem Antiserum (1:2.000 verdünnt in 1 %igem Casein/PBS) inkubiert. Die Zellzahl der eingesetzten Bakteriensuspensionen wurde unter Verwendung der Zählkammer ermittelt. Die Nachweisgrenze wurde als diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der unter diesen EIA-Bedingungen eine Extinktion erzielt wurde, die dem zweifachen des Backgrounds entsprach.

Fünf der acht überprüften Spezies zeigten eine Reaktivität im indirekten EIA (Tab. 7), die Nachweisgrenzen lagen hierbei in einem Bereich von $1,8 \times 10^5$ (BCG) bis $7,5 \times 10^6$ KbE/ml (*M. avium* ssp. *silvaticum*). Drei der eingesetzten Stämme (*M. asiaticum*, *M. celatum*, *M. terrae*) zeigten keine Reaktivität im indirekten EIA, d.h auch bei Einsatz hoher

Zellzahl-Konzentrationen von ca. 10^8 bis 10^9 Kbe/ml konnten nur Absorptionen $< 0,5$ im EIA erreicht werden. Grundsätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass abgesehen von BCG die polyklonalen Kaninchenantiseren vorzugsweise mit den zum Mycobacterium-Avium-Komplex (MAC) gehörigen Mykobakterien-Spezies *M. avium* ssp. und *M. intracellulare* reagieren. Die *M. avium*-Subspezies weisen zudem eine hohe genetische Homologie mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* auf.

Tabelle 7: Nachweisbarkeit schnellwachsender Mykobakterien im indirekten EIA unter Verwendung des Kaninchenantiserums II (Endabnahme)

Mykobakterienstamm	Nachweisgrenze in Kbe/ml	Mykobakterienstamm	Nachweisgrenze in Kbe/ml
<i>M. asiaticum</i>	$> 1 \times 10^8$	<i>M. intracellulare</i>	$2,5 \times 10^6$
<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>	2×10^6	<i>M. scrofulaceum</i>	5×10^6
<i>M. avium</i> ssp. <i>silvaticum</i>	$7,5 \times 10^6$	<i>M. terrae</i>	$> 1 \times 10^9$
<i>M. celatum</i>	$> 1,5 \times 10^8$	BCG	$1,8 \times 10^5$

4.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Reaktivität der polyklonalen Antikörper des Kaninchenantiserums weiter charakterisiert. Es wurden sowohl lebende als auch autoklavierte MAP-Präparationen (DSM 44135) verwendet. Methodische Details sind unter 3.2.4 beschrieben.

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse der Präparate konnte eine Reaktivität des Antiserums mit Oberflächenstrukturen der MAP-Zellen (Abb. 12) gezeigt werden. Parallele Kontrollansätze mit einem MAP-irrelevanten Kaninchenserum (als Immunogen wurde *Cronobacter* spp. verwendet) bestätigten die Spezifität der Reaktion, eine unspezifische Färbung der MAP-Zellen bei Einsatz des Vergleichsserums wurde nicht beobachtet.

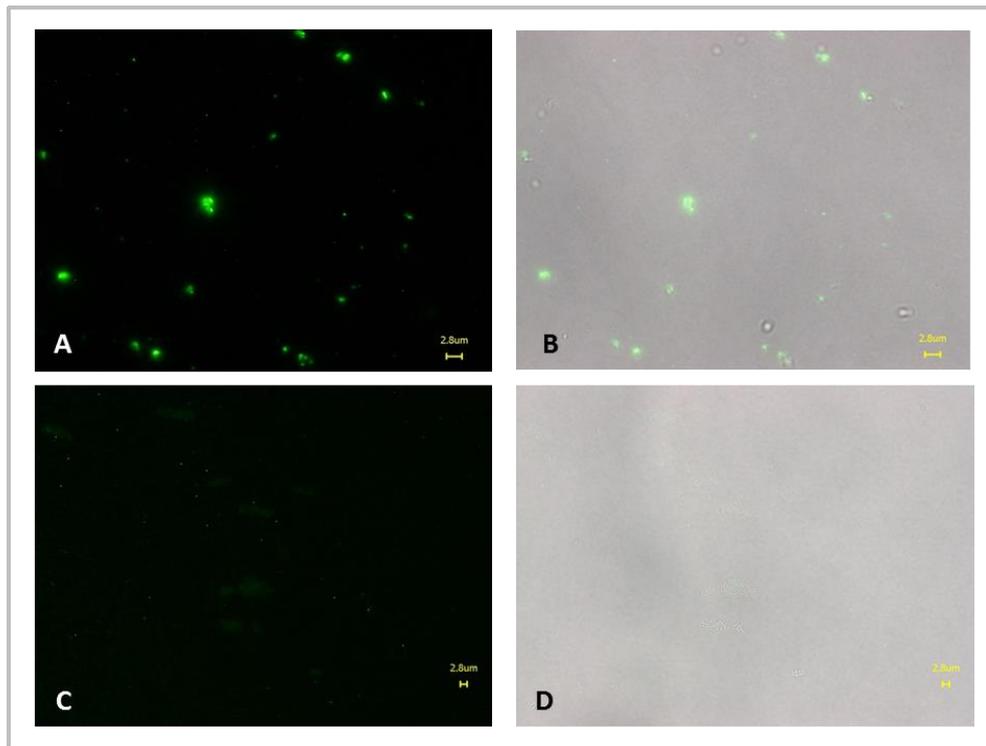


Abbildung 12: Reaktivität des Kaninchenantiserums II mit frischen in M7H9-Medium kultivierten MAP-Präparationen (DSM 44135), (A) Immunfluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 1,5 sec.), (B) Overlay der Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme. Aufnahmen entsprechender Kontrollansätze unter Verwendung eines MAP-irrelevanten (*Cronobacter* spp. spezifischen) Kaninchenantiserums sind in (C) und (D) dargestellt.

4.2.7 Immunoblot

Mittels Immunoblot wurde überprüft, ob die in der Immunfluoreszenz beobachtete Reaktivität der Seren mit ganzen MAP-Zellen auf eine Bindung an oberflächenassoziierte Proteine zurückzuführen ist. Für die Proteinextraktion wurden zunächst MAP aus einer M7H9-Anzucht entnommen, zentrifugiert und in 1 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden sowohl Pellet als auch gewonnener Überstand, wie unter 3.2.5 beschrieben, für 10 Minuten in SDS-Puffer gekocht und die denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Reaktivität des Antiserums überprüft. Es zeigte sich, dass vor allem Proteinbanden im Bereich zwischen $< 14 - 45$ kDa von dem Antiserum erkannt wurden (Abb. 13).

Besonders prominent war dabei eine Bande bei < 14 kDa. Prinzipiell zeigte das Kaninchenantiserum mit dem eingesetzten Pellet eine deutlich stärkere Reaktivität als mit dem zellfreien Überstand.

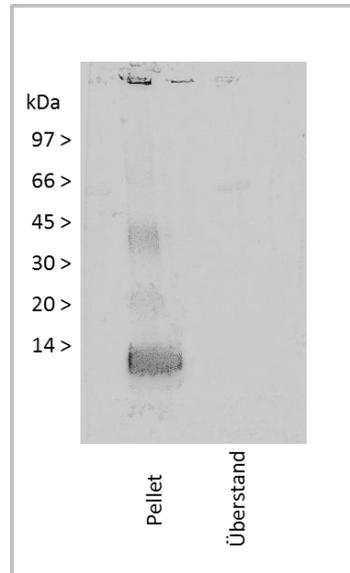


Abbildung 13: Reaktivität des Kaninchenantiseraums mit einer MAP-Präparation (DSM 44135) im Immunoblot. Die Keime wurden in M7H9-Medium angezüchtet, die Antiseren in einer Verdünnung von 1:2.000 eingesetzt.

4.2.8 Charakterisierung der detektierten Antigene

An der Oberfläche mykobakterieller Zellwände finden sich zum Teil mehr oder weniger stark gebundene Polysaccharide und Lipide. In statischen Kulturen und auch in phagozytierenden Zellen sind diese verhältnismäßig stark mit der bakteriellen Zellwand assoziiert. In Schüttelkulturen scheinen diese jedoch in geringerem Maße an der bakteriellen Oberfläche gebunden zu sein, wodurch sie sich häufiger im Kulturüberstand wiederfinden (Draper, 1998, Ortalo-Magne et al., 1995). Zur genaueren Charakterisierung und Lokalisierung der für die Antikörperbindung ursächlichen Antigenstrukturen wurden MAP-Stämme in M7H9-Medium kultiviert und anschließend in Zellpellets und zellfreie Überstände aufgetrennt. Hierzu wurde sowohl bestrahltes, als auch autoklaviertes MAP-Material eingesetzt. Zur Gewinnung der Fraktionen wurden die inaktivierten Anreicherungen 1:20 verdünnt und anschließend zentrifugiert ($3.000 \times g$, 15 min). Die so gewonnenen Präparationen wurden im indirekten EIA wie unter 3.2.3. beschrieben untersucht.

Es zeigte sich, dass die zellfreien Überstände der autoklavierten MAP-Präparationen eine deutlich stärkere Reaktivität als das eingesetzte Pellet aufwiesen, d.h. etwa 80 % der ursprünglichen Reaktivität waren im Überstand nachweisbar, im Pellet hingegen nur noch 6,25 %. Bei den bestrahlten Keimpräparationen traten diese massiven Unterschiede nicht auf: Die Reaktion des Bakterienpellets lag, gemessen an der ursprünglich ermittelten Reaktivität der Original-Präparation bei 50 %, die des Überstandes bei etwa 40 % (Abb. 14).

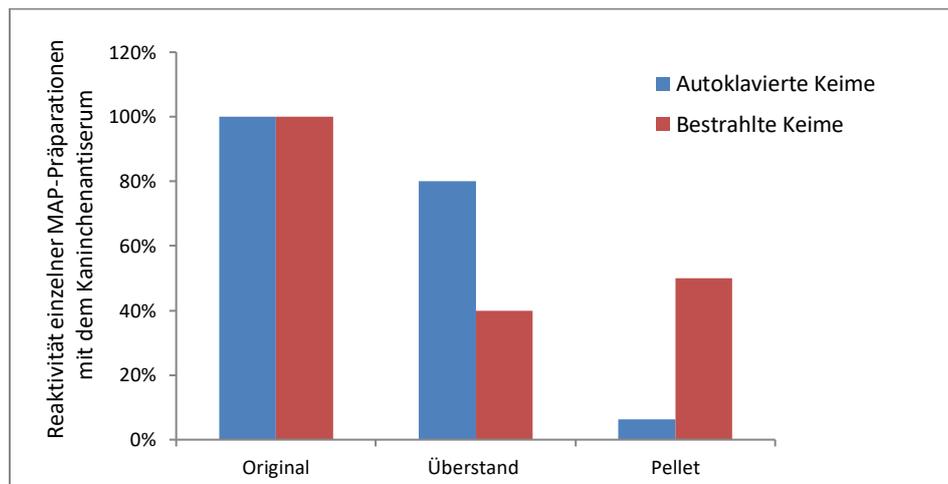


Abbildung 14: Lokalisation EIA-reaktiver MAP-Antigenstruktur nach Abtrennung des Zellpellets bei autoklavierten und bestrahlten MAP-Präparationen

Aufgrund der bestehenden Reaktivität des Serums mit M7H9-Medium (siehe Abb. 9) konnte die Lokalisation der Zielantigene bei lebenden Kulturen nur orientierend getestet werden. Die Absorptionen im EIA für steril filtrierte Überstände (DSM 44135) lagen auf relativ niedrigem Niveau, auch bei einer hohen Anfangskeimzahl (1×10^9 KBE/ml) ließen sich im Überstand nur Absorptionen von 0,7 nachweisen. Absorptionen für vergleichbare Zellpellets lagen bei $> 4,0$.

Um im nächsten Schritt zu verifizieren, ob es sich bei den von den Antiseren erkannten, in den autoklavierten Überständen und Zellpellets nachweisbaren MAP-Strukturen tatsächlich um Proteine handelt, wurden die Proben proteolytisch verdaut.

Für den Proteinase K Verdau wurden 4 μ l einer Proteinase K Lösung (1 mg/ml) zu 200 μ l einer autoklavierten MAP-Präparation (DSM 44135) pipettiert. Die Probe wurde für 1 h bei 65 °C unter leichten Schüttelbewegungen und anschließend über Nacht bei 37 °C im

Brutraum inkubiert. Am Folgetag wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Proteinase K 1h im siedenden Wasserbad erhitzt und nachfolgend mittels EIA und Immunoblot untersucht. Die Nachweisgrenze der mit Proteinase K behandelten Probe war im indirekten EIA-Verfahren um etwa Faktor 30 schlechter als die der Originalpräparation. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den vom polyklonalen Antiserum vorzugsweise erkannten Antigenstrukturen um Proteine handeln könnte. Auf Grund der nach dem PK-Verdau jedoch noch geringfügig erhaltenen Reaktivität wurden die angefertigten Präparationen anschließend im Immunoblot wie unter 3.2.5 beschrieben getestet. Dabei wurden die im EIA erhaltenen Ergebnisse bestätigt, bei den PK verdauten Proben wurden gegenüber den Originalpräparationen deutlich reduzierte Bandenintensitäten in dem bereits unter 4.4.5 beschriebenen Reaktionsbereich von > 14-45 kDa ermittelt (Abb. 15):

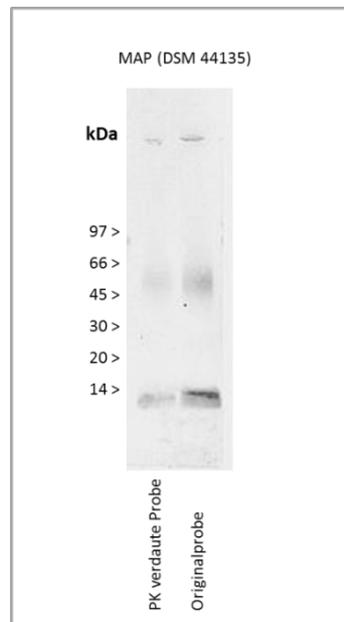


Abbildung 15: Immunoblot-Reaktivität einer MAP-Präparation (DSM 44135) vor (Originalprobe) bzw. nach Verdau mit Proteinase K

4.2.9 Einsetzbarkeit zur immunomagnetischen Separation von MAP-Zellen

Im Hinblick auf eine angestrebte Anreicherung von MAP-Zellen aus Probenmaterial wie zum Beispiel Milch wurden Aliquote des gefällten Kaninchenantiserums an magnetische Partikel gekoppelt. Eingesetzt wurden hierfür mit Sekundärantikörper (Schaf-anti-Kaninchen IgG) vorbeschichtete Partikel, als Probe wurde künstlich mit MAP (DSM 44135) kontaminierte (1×10^3 KbE/ml bzw. 1×10^4 KbE/ml) fettarme Milch verwendet. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eventuell auftretende unspezifische Bindung von MAP-Zellen an die Partikel auszuschließen, wurde parallel ein Vergleichsansatz, bei dem mit irrelevantem Kaninchenantiserum (Immunogen: Peptid-KLH Konjugat) beschichtete Dynabeads verwendet wurden, angesetzt. Die erfolgreiche Kopplung der Serumantikörper wurde mittels Immunfluoreszenz verifiziert. Dazu wurden mit Kaninchenantiserum beschichtete Beads ($10 \mu\text{l}$) 1:10 in PBS verdünnt und dann mit einem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488 Goat anti-Rabbit IgG; Endverdünnung 1:100) für 1 h bei RT im Intellimixer inkubiert (F 99, rpm 7). Parallel wurde eine Negativkontrolle mit nativen Beads mitgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden beide Ansätze in PBS resuspendiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Im Vergleich zur Negativkontrolle wiesen die gekoppelten Beads eine deutliche Fluoreszenz auf (Abb. 16). Die Negativkontrolle zeigte bei gleicher Belichtungsdauer keine Fluoreszenz. Dieses Ergebnis bestätigte die erfolgreiche Kopplung der Serumantikörper an die Beads.

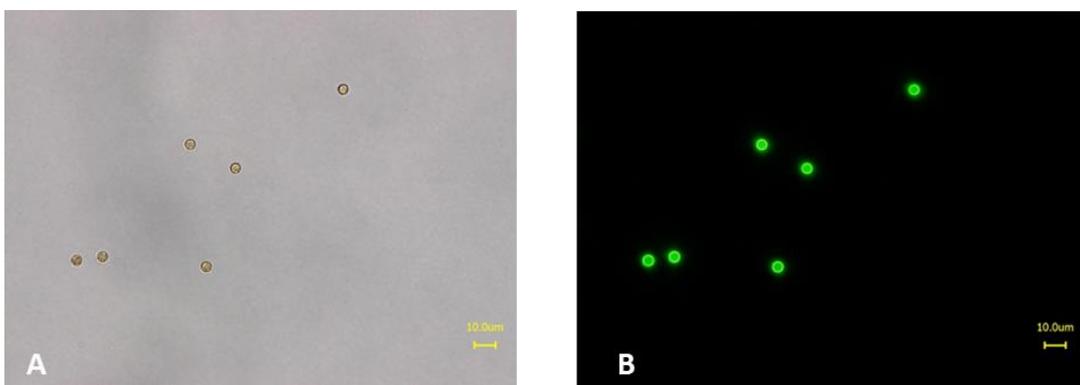


Abbildung 16: Durchlicht (A) bzw. Fluoreszenzaufnahme (B) von mit Kaninchenantiserum beladenen Beads. Die Negativkontrolle (nicht dargestellt) wies bei gleicher Belichtungsdauer (1/28 sec) keine Fluoreszenz auf.

Die so vorbehandelten Beads wurden wie in 3.2.6 detailliert beschrieben zur Anreicherung von MAP aus kontaminierten Milchproben eingesetzt. Nach Inkubation und immunomagnetischer Separation wurden rückgewonnene Milch-Überstände, Spüllösungen sowie potentiell mit MAP-Zellen beladene immunomagnetische Beads in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf M7H10 Festmedium (Middlebrook 7H10 mit Zusatz von Mykobaktin J und OADC-Enrichment) ausgestrichen und nach vierwöchiger Inkubation bei 37 °C das Keimwachstum beurteilt. Auf den M7H10-Platten der Milch-Überstände wie auch der Spüllösungen konnte ein deutliches Keimwachstum nachgewiesen werden (Abb. 17), bei den entsprechenden Ansätzen der immunomagnetischen Beads waren hingegen keine Kolonien sichtbar.

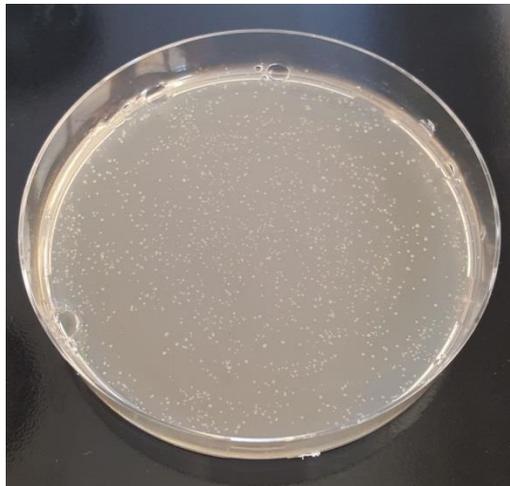


Abbildung 17: Deutliche Koloniebildung auf den M7H10 Platten der Milchausstriche

Aufgrund der fehlenden Bindung von MAP an die Dynabeads wurden in einem zweiten Ansatz die Beschichtungsbedingungen (24 h bei 4 °C statt 30 min bei Raumtemperatur) variiert, sowie höhere MAP-Keimzahlen ($7,2 \times 10^4$ bzw. $8,1 \times 10^5$ Keimen/ml) eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation der Beads mit der Probe und mehrmaligen Waschschritten wie unter 3.2.6 beschrieben, wurden die gewonnenen Präparationen (Milch nach Inkubation mit Beads, Überstände aus den Waschschritten, sowie gewaschene Beads) erneut zur Überprüfung der Anreicherungs-effizienz auf M7H10 ausgebracht und für vier Wochen bei 37 °C im Brutraum inkubiert. Nach vier Wochen Inkubationszeit wurde anhand des Bakterienwachstums die Rückgewinnungsrate beurteilt. Hierbei wurde auf den mit Kaninchenantiserum beladenen Beads ein Bakterienwachstum von 1×10^3 bzw. $3,6 \times 10^1$ bzw. KbE/ml beobachtet, was einer Rückgewinnungsrate von 0,05 - 0,12 %

entspricht. Allerdings wurden auch für den Kontrollansatz, bei dem die Beads mit einem irrelevanten Serum beschichtet worden waren, ähnliche Werte erzielt. Die Zellzahlen lagen hier bei $3,6 \times 10^1$ bzw. 4×10^2 KbE/ml. Dies entspricht in Relation zur Ausgangskeimzahl einer Rückgewinnungsrate von 0,04 - 0,05 % für die mit 10^4 bzw. 10^5 KbE/ml kontaminierte Milch. Eine Verwendung des MAP-spezifischen polyklonalen Kaninchenantiserums resultiert demnach nicht in einer signifikant höheren Rückgewinnungsrate (Abb. 18).

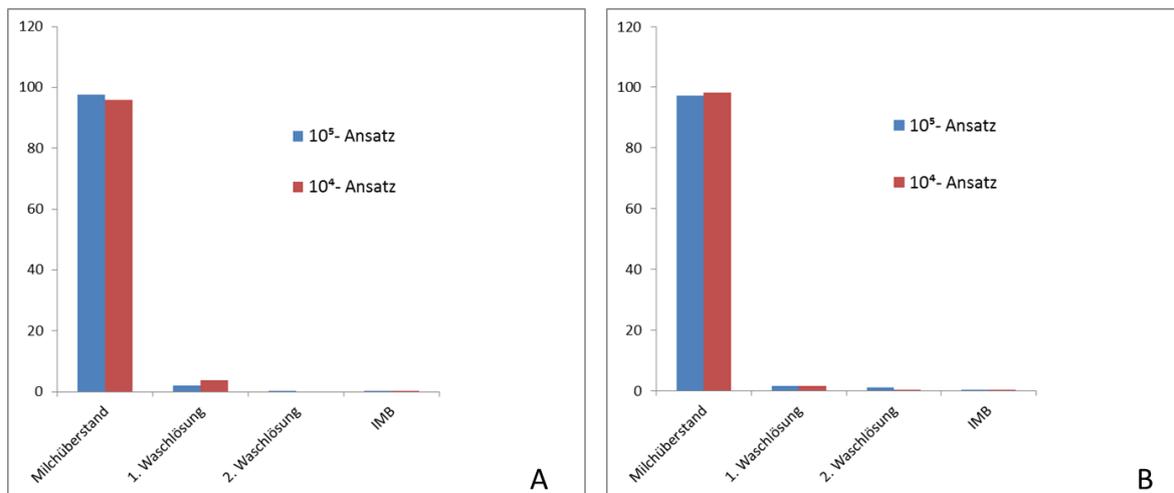


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der in den unterschiedlichen Überständen und Waschlösungen rückgewonnenen Keime/ml für (A) die mit MAP-spezifischen Kaninchenantiserum bzw. (B) Kontrollserum beschichteten immunomagnetischen Beads.

4.3 Monoklonale Antikörper

4.3.1 Immunisierung von Mäusen

Für die Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk) wurden wie unter 4.1.1 beschrieben in zwei Ansätzen jeweils 5 weibliche Mäuse mit Immunogen A bzw. B immunisiert und im Abstand von mehreren Wochen restimuliert. In Tab. 8 ist das entsprechende Immunisierungsschema für den 2. Immunisierungsansatz zusammengefasst. Es wurden Zellzahlen im Bereich von 2×10^7 - 4×10^7 KbE/pro Tier eingesetzt, die unter 4.1.1 aufgeführten Stämme waren dabei im Immunogen zu gleichen Teilen enthalten. Für die Grundimmunisierung und die erste Restimulierung wurden die MAP-Präparationen in

Sigma-Adjuvans emulgiert. Es handelt sich hierbei um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die eine schonende Alternative zum Freund-Adjuvans darstellt.

Tabelle 8: Immunisierung von Mäusen (2. Ansatz) mit MAP-Keimen, die eingesetzte Präparation bestand aus den inaktivierten MAP-Stämmen DSM 44133, 44135, MS-4

Woche	Behandlung	Adjuvans bzw. Puffer	Applikation
0	Erstimmunisierung	Sigma-Adjuvans	s.c.
4	1. Restimulierung	Sigma-Adjuvans	i.p.
11	1. Blutentnahme		
15	2. Restimulierung	Inkomplettes Freund-Adjuvans	i.p.
19	2. Blutentnahme		
22	3. Restimulierung	PBS	s.c./i.p.

4.3.2 Generierung der Antikörper

Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurden die polyklonalen Mausantisera mittels indirekter EIA-Verfahren untersucht, wobei in orientierenden Untersuchungen Antikörper-Titer, Antigen-Affinität und Spezifität der Seren ermittelt wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei Mäuse für die Generierung monoklonaler Antikörper mithilfe von Hybridom-Technik (3.2.2) ausgewählt und mittels PEG die aus den Milzen gewonnenen B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert. Zwölf Tage nach der Zellfusion wurden die ZKÜ der Hybridome mittels indirektem EIA auf Antikörperproduktion überprüft. Letztlich konnten zwei Hybridomzelllinien, 8B2/1H und 12G3, etabliert werden, die MAP-spezifische Antikörper vom IgM-(8B2/1H) bzw. IgG_{2a}-Isotyp sezernieren. Abgesehen von den Untersuchungen zur Antigen-Spezifität wurden zur genaueren Charakterisierung der beiden MAP-reaktiven mAK 8B2/1H und 12G3 die nach der 3. Klonierung der Hybridome gewonnenen ZKÜ verwendet. Zur Ermittlung des relativen Antikörper-Gehalts der ZKÜ wurden Mikrotiterplatten mit einer konstanten Konzentration einer autoklavierten MAP-Präparation (DSM 44133) beschichtet und die Zellkulturüberstände (ZKÜ) anschließend in Verdünnungsreihen aufgetragen. Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der unter diesen Testbedingungen im EIA eine Extinktion von 1,0 erreicht wurde. Für die beiden Überstände wurden dabei reziproke Antikörpertiter in einem Bereich von 810 (mAk 8B2/1H) bzw. 3.700 (mAk 12G3) ermittelt.

Die Charakterisierung der gewonnenen monoklonalen Antikörper 8B2/1H und 12G3 basierte auf unterschiedlichen immunochemischen Verfahren. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Untersuchung mittels EIA-Verfahren. Für detaillierte Untersuchungen zur Reaktivität der mAk wurden des Weiteren Immunfluoreszenz- bzw. Immunoblot-Verfahren eingesetzt.

4.3.3 Antigen-Spezifität

Bei der Charakterisierung der polyklonalen Kaninchenantisera hatte sich gezeigt, dass in Abhängigkeit vom verwendeten Immunogen neben MAP-spezifischen Antikörpern bei den Tieren auch Antikörper gegen Bestandteile der bei der Immunogen-Herstellung verwendeten Medien (HEYM-Medium, M7H9) induziert wurden. Da ähnliche Beobachtungen auch bei den orientierenden Untersuchungen der Mäusesera gemacht wurden (Ergebnisse nicht dargestellt), wurde die Reaktivität der bei den ersten EIA-Untersuchungen positiv reagierenden ZKÜ detailliert vorab geprüft. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit Verdünnungsreihen von bestrahlten bzw. autoklavierten MAP-Präparationen auch mit entsprechend verdünnten HEYM- bzw. M7H9-Medien, relevanten Medienbestandteilen (Eigelb, Mykobaktin) sowie dem zur Stabilisierung der Immunogene verwendeten Protease-Inhibitor-Mix beschichtet. Um eine eventuelle unspezifische Bindung der monoklonalen Antikörper an die Platte auszuschließen, wurde zudem die Reaktivität der ZKÜ in antigen-freien Kontrollansätzen (nur mit Verdünnungspuffer beschichtete Platte) überprüft. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 19 anhand der beiden MAP-spezifischen monoklonalen Antikörper 12G3 und 8B2/1H dargestellt, wobei für letzteren bei Einsatz höherer Antikörper-Konzentrationen eine gewisse unspezifische Bindung beobachtet wurde. Diese unerwünschte Reaktivität konnte durch höhere Verdünnung der ZKÜ jedoch vermieden werden. Bei einer Verdünnung von $\geq 1:150$ lagen die Absorptionswerte für den antigen-freien Kontrollansatz bei akzeptablen 0,2 AU, für MAP-haltige Ansätze wurden hingegen Werte von mehr als 3,0 ermittelt.

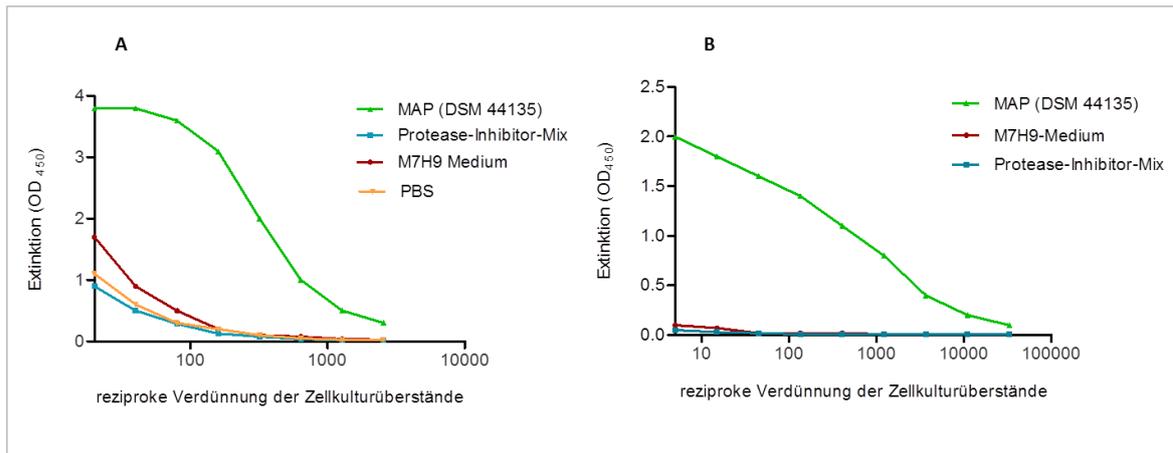


Abbildung 19: Reaktivität von (A) mAk 8B2/1H bzw. (B) 12G3 im indirekten EIA. Die Platten wurden mit verschiedenen Antigen-Präparationen (verdünnt in PBS) bzw. nur PBS beschichtet und mit Verdünnungsreihen der beiden mAk (in Form von ZKÜ) beprobt.

Die Überprüfung der EIA-Reaktivität dieser ZKÜ mit Medienbestandteilen bestätigte die Spezifität der beiden mAk 8B2/1H und 12G3 für MAP, während bei anderen, in den ersten Tests positiv reagierenden ZKÜ z.T. Medien-Bestandteile bzw. andere Zusätze als antigene Determinante identifiziert wurden. Die in Abb. 20 dargestellten ZKÜ 3D9, 3B11 bzw. 5G2 (alle aus mit Immunogen A immunisierten Mäusen stammend) reagierten beispielsweise mit HEYM-Bestandteilen bzw. dem Protease-Inhibitor-Mix. Dies erklärt auch die divergierende Reaktivität mit den unterschiedlichen MAP-Präparationen. So wurde eine deutliche Reaktivität mit einer bestrahlten MAP-Präparation, für deren Herstellung sowohl auf HEYM-Medium kultivierte MAP, als auch Protease-Inhibitor-Mix verwendet wurden (4.1.1), beobachtet während die nach Anzucht in M7H9-Medium gewonnenen, autoklavierten MAP-Präparationen keine Reaktivität zeigten.

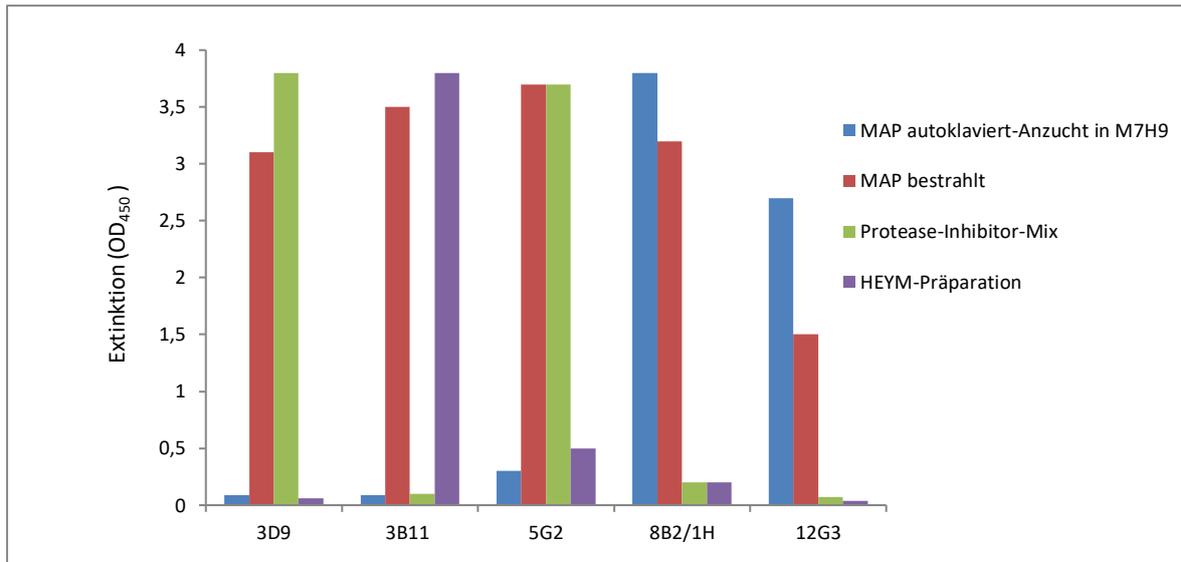


Abbildung 20: Reaktivitätsmuster verschiedener monoklonaler Antikörper. Alle Antikörper stammten aus der gleichen Zellfusion, bei der Zellmaterial von mit bestrahlten MAP-Präparationen immunisierten Tieren verwendet worden war.

4.3.4 Bestimmung der Intra-Spezies Reaktivität

Erste Untersuchungen zur Intra-Spezies Reaktivität der beiden spezifischen monoklonalen Antikörper konzentrierten sich auf die, zur Immunisierung der Mäuse eingesetzten MAP-Stämme (DSM 44133, DSM 44135, MS-4), wobei sowohl autoklavierte als auch bestrahlte Keimpräparationen untersucht wurden. Für die Überprüfung der Intra-Spezies Reaktivität von 8B2/1H und 12G3 wurden Mikrotiterplatten mit Bakterienpräparationen verschiedener MAP-Stämme in seriellen Verdünnungsreihen beschichtet. Die ZKÜ wurden anschließend in konstanten Verdünnungen eingesetzt. Diese lag beim mAk 12G3 bei 1:10, bei mAk 8B2/1H aufgrund der in orientierenden Voruntersuchungen festgestellten Background-Problematik deutlich höher (1:150). Bei ersten Versuchen unter Verwendung des Sekundärantikörpers Polyclonal Rabbit anti-Mouse Ig-HRP (Dako, P0161) wurden im EIA insbesondere für den mAk 8B2/1H jedoch vergleichsweise niedrige Signalintensitäten ($\leq 1,5$) erhalten. Durch den Einsatz eines alternativen, besser mit Maus-IgM reaktiven Sekundärantikörpers (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L) Jackson Immunoresearch) konnten deutlich höhere Messwerte (Absorption $\geq 4,0$) erhalten und infolge dessen auch die Nachweisgrenze des EIA deutlich verbessert werden. Die Nachweisgrenze (Antigen-Titer) wurde als diejenige Verdünnungsstufe des Antigens definiert, bei der im indirekten EIA noch eine Extinktion von 0,3 erreicht wurde. Beide

Antikörper zeigten im indirekten EIA eine Reaktivität mit allen drei zur Immunisierung verwendeten MAP-Stämmen, unabhängig von dem jeweils eingesetzten Inaktivierungsverfahren (Abb. 21). Für die autoklavierten Stämme wurden mit mAk 8B2/1H (Isotyp IgM) Nachweisgrenzen im Bereich von $4,1 \times 10^4$ KbE/ml bis $1,3 \times 10^5$ KbE/ml erzielt, die entsprechenden Werte für die bestrahlten Präparationen lagen höher, nämlich bei $7,8 \times 10^5$ KbE/ml bis $1,4 \times 10^6$ KbE/ml.

Auch für den mAk 12G3 (Isotyp IgG_{2a}) zeigte sich, dass die autoklavierten MAP-Stämme besser als die bestrahlten Präparationen erkannt wurden. Die Nachweisgrenzen lagen hier in einem Bereich von $6,7 \times 10^5$ KbE/ml bis 1×10^6 KbE/ml (autoklavierte MAP) bzw. $3,7 \times 10^6$ KbE/ml bis $6,2 \times 10^6$ KbE/ml (bestrahlte MAP).

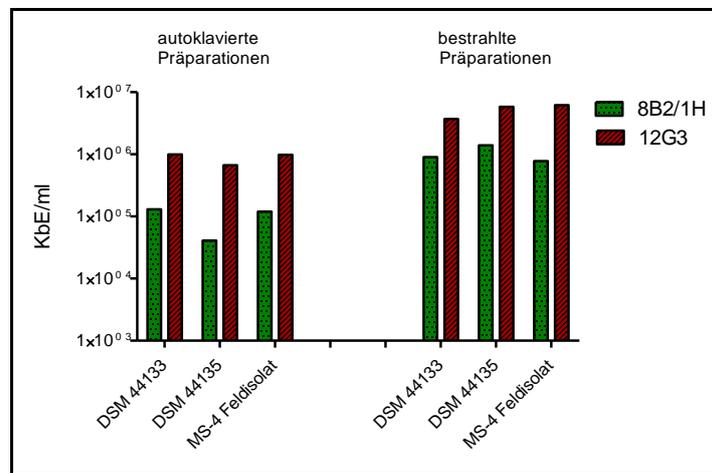


Abbildung 21: Reaktivität von 8B2/1H und 12G3 mit den zur Immunisierung verwendeten MAP-Stämmen (DSM 44133, DSM 44135, MS-4 Feldstamm). Dargestellt sind die im indirekten EIA erzielten Nachweisgrenzen für die jeweilige MAP-Präparation. Die Anzucht der Stämme erfolgte in M7H9-Medium. Die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden mit PBS gewaschen und anschließend mittels γ -Strahlung bzw. Autoklavieren vor der EIA-Untersuchung inaktiviert.

Weiterführende Untersuchungen unter Verwendung der vom Friedrich-Löffler Institut zur Verfügung gestellten 17 Isolate bestätigten die breite Reaktivität der beiden mAk. Im Hinblick auf die mit den als Immunogen verwendeten Stämmen gemachten Erfahrungen beschränkte sich hier die Untersuchung auf autoklavierte Präparationen. Die bei Einsatz des mAk 12G3 erzielten Nachweisgrenzen lagen in einem Bereich von 3×10^5 KbE/ml bis 1×10^7 KbE/ml, wobei alle Isolate vom monoklonalen Antikörper erkannt wurden. Die hohe Affinität bzw. breite Reaktivität des mAk zeigte sich auch darin, dass für 8 der 17

untersuchten Isolate bei Zellzahlen von $< 5 \times 10^6$ KbE/ml noch Absorptionswerte von $> 1,0$ im EIA erreicht wurden (Abb. 22).

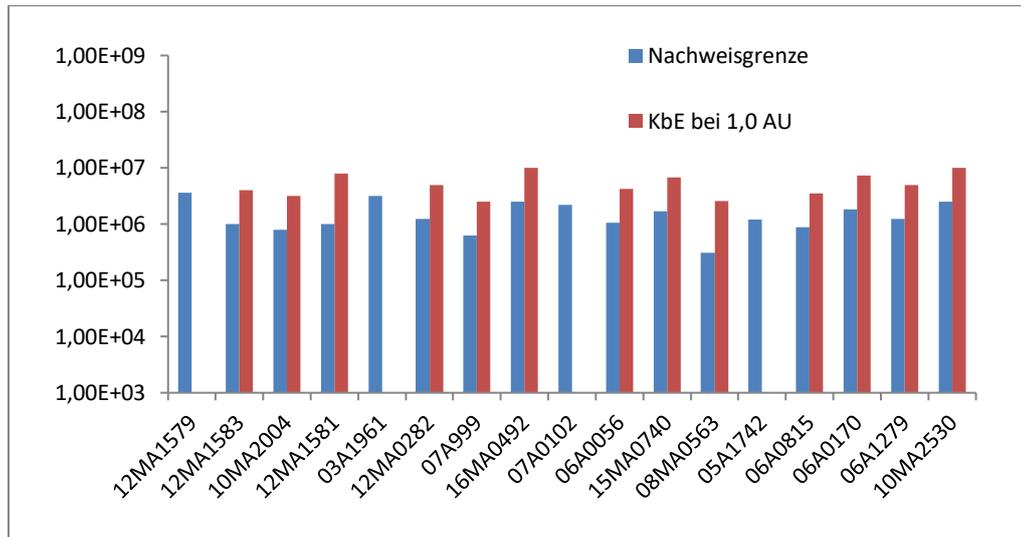


Abbildung 22: Nachweisbarkeit von MAP-Isolaten (autoklavierte Präparationen) im indirekten EIA bei Verwendung des mAk 12G3.

Bei Einsatz des mAk 8B2/1H konnten 16 der 17 untersuchten Proben mittels indirektem EIA nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenzen lagen in einem Bereich von 5×10^4 bis 1×10^7 KbE/ml, wobei allerdings grundsätzlich nur für 11 Isolate Absorptionswerte von $> 1,0$ erhalten wurden (Abb. 23)

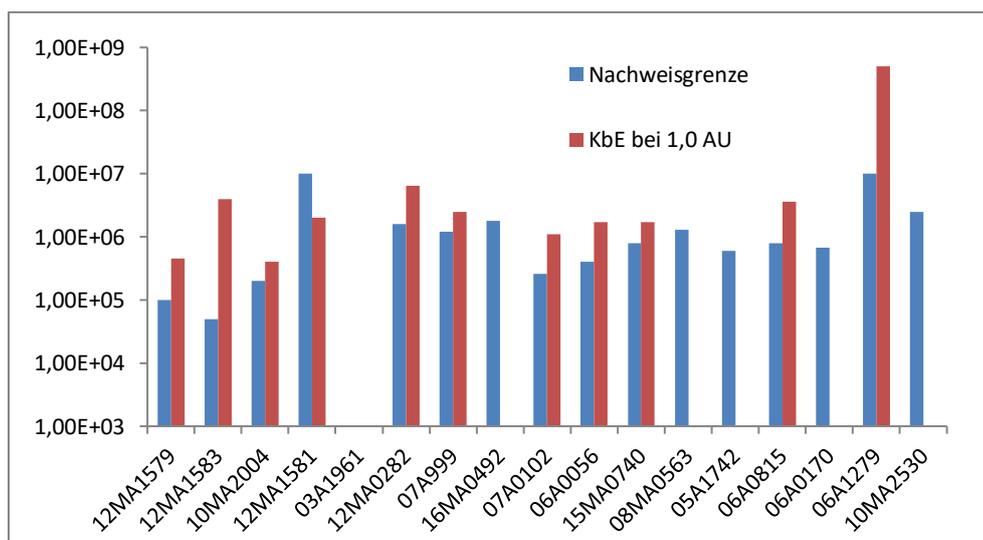


Abbildung 23: Nachweisbarkeit von MAP-Isolaten (autoklavierte Präparationen) im indirekten EIA bei Verwendung des mAk 8B2/1H.

4.3.5 Überprüfung der Spezifität

Zur Beurteilung der Speziesübergreifenden Reaktivität der monoklonalen Antikörper wurden neben den diversen Isolaten von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* auch Präparationen anderer Mykobakterien-Spezies getestet, wobei auch hier wiederum nur autoklavierte Bakterienpräparationen in die EIAs eingesetzt wurden. Die Anzucht der überprüften Mykobakterien erfolgte ausschließlich in M7H9-Flüssigmedium.

Sowohl mAk 8B2/1H als auch 12G3 zeigten eine breite Reaktivität mit den überprüften Mykobaktérienspezies (Tab. 9). Die Nachweisgrenzen des mAk 8B2/1H (Isotyp IgM) lagen mit Werten zwischen $7,5 \times 10^5$ und 5×10^7 KbE/ml tendenziell etwas über den, für die *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-Stämme ermittelten Werte. Für BCG konnte im 8B2/1H-EIA auf Grund von Interferenzen der Keimpräparationen mit Maus-IgM kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Die Nachweisgrenzen des mAk 12G3 lagen in einem Bereich von 2×10^6 bis $2,5 \times 10^7$ KbE/ml und damit ebenfalls etwas über den für die Referenzstämme ermittelten Nachweisgrenzen von $6,2 \times 10^5$ bis $3,6 \times 10^6$ KbE/ml. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die von den monoklonalen Antikörpern erkannten antigenen Determinanten weitverbreitet in der Familie der Mycobacteriaceae zu finden sind.

Tabelle 9: Reaktivität und Nachweisgrenze der monoklonalen Antikörper 8B2/1H und 12G3 mit autoklavierten Bakterienpräparationen schnellwachsender Mykobakterien

Bakterienstamm	Nachweisgrenze in KbE/ml	
	mAk 8B2/1H	mAk 12G3
<i>M. asiaticum</i>	2×10^6	2×10^6
<i>M. avium ssp. avium</i>	1×10^7	5×10^6
<i>M. avium ssp. silvaticum</i>	$7,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
<i>M. celatum</i>	$7,5 \times 10^5$	3×10^6
<i>M. intracellulare</i>	5×10^7	$2,5 \times 10^7$
<i>M. scrofulaceum</i>	1×10^7	2×10^7
<i>M. terrae</i>	$8,5 \times 10^6$	2×10^7
BCG	n.d.	6×10^6

4.3.6 Lokalisation der Zielantigene

Zur genaueren Charakterisierung und Lokalisierung der an der Antikörperbindung beteiligten Antigenstrukturen wurden MAP-Präparationen unterschiedlichen Behandlungen (Abtrennung zellulärer Bestandteile, Proteaseverdau) unterzogen und mit verschiedenen immunchemischen Verfahren (EIA, Immunoblot, Immunfluoreszenz) untersucht.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob es sich bei den mit den mAk reaktiven Strukturen um Zellwandständige Antigene von MAP handelt. Hierfür wurden 1:20 Verdünnungen bereits autoklavierter bzw. bestrahlter MAP-Präparationen (DSM 44135) hergestellt und diese anschließend zentrifugiert (3.000 x g, 15 min). Das gewonnene Zellpellet wurde im Ausgangsvolumen rekonstituiert und zusammen mit dem gewonnenen zellfreien Überstand semiquantitativ im indirekten EIA untersucht.

Prinzipiell reagierten beide mAK mit dem zellfreien Überstand deutlich besser als mit dem durch Zentrifugation gewonnenen Zellpellet. Die Werte für die Überstände lagen hierbei um bis zu Faktor 53 höher. Auffällig war auch, dass die für den Überstand gemessene relative Reaktivität deutlich über dem für die Originalpräparation ermittelten Wert lag, so dass zum Teil Wiederfindungsraten von > 160 % ermittelt wurden (Abb. 24)

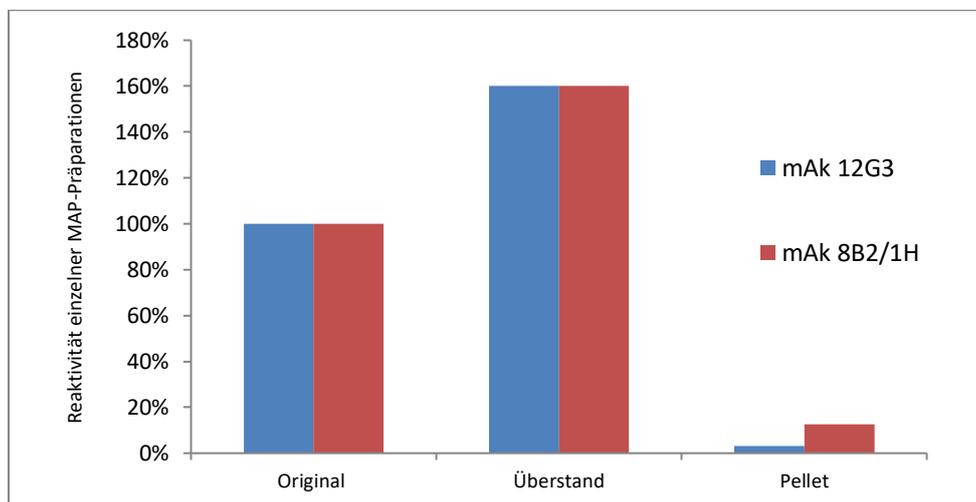


Abbildung 24: Relative Verteilung der mit mAk 8B2/1H bzw. 12G3 nachweisbaren Zielantigene auf Zellpellet und zellfreiem Überstand. Eingesetzt wurden in M7H9-Flüssigmedium angereicherte und danach autoklavierte Keimpräparationen des MAP-Stamms DSM 44135.

Zur weiteren Verifizierung dieser Ergebnisse wurden autoklavierte Präparationen einiger anderer, vom FLI zur Verfügung gestellten MAP-Isolate (Tab. 3) analog behandelt und Zellpellet bzw. zellfreier Überstand im indirekten EIA unter Verwendung der beiden mAk untersucht. Bedingt durch die geringere Reaktivität der Ausgangspräparationen konnten hier zum einen im gewonnenen Zellpellet mit beiden monoklonalen Antikörpern keine bzw. nur Spuren der Zielantigene nachgewiesen werden, zum anderen lagen für den mAk 8B2/1H die Wiederfindungsraten (Reaktivität von Überstand und Zellpellet im Vergleich zum Ausgangsmaterial) zum Teil auf niedrigem Niveau. Umso deutlicher fiel jedoch die Reaktion der Überstände aus. Für acht der siebzehn getesteten FLI-Isolate konnten dabei hohe Antigen-Titer von $> 1:1.600$ in den Überständen ermittelt werden. Abb. 25 und Abb. 26 stellen beispielhaft die Ergebnisse einiger FLI-Stämme dar. Unter Verwendung von mAk 8B2/1H wurden im Vergleich zu den Originalpräparationen relative Reaktivitäten im Bereich von 120 - 142 % erreicht (Abb. 25). Für mAk 12G3 lagen die Werte mit bis zu 160 % noch etwas höher (Abb. 26). Diese Ergebnisse untermauern die beim DSM-Referenzstamm gemachten Erfahrungen, dass - zumindest bei autoklavierten MAP-Präparationen - die Zielantigene vorzugsweise im zellfreien Überstand und nicht an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

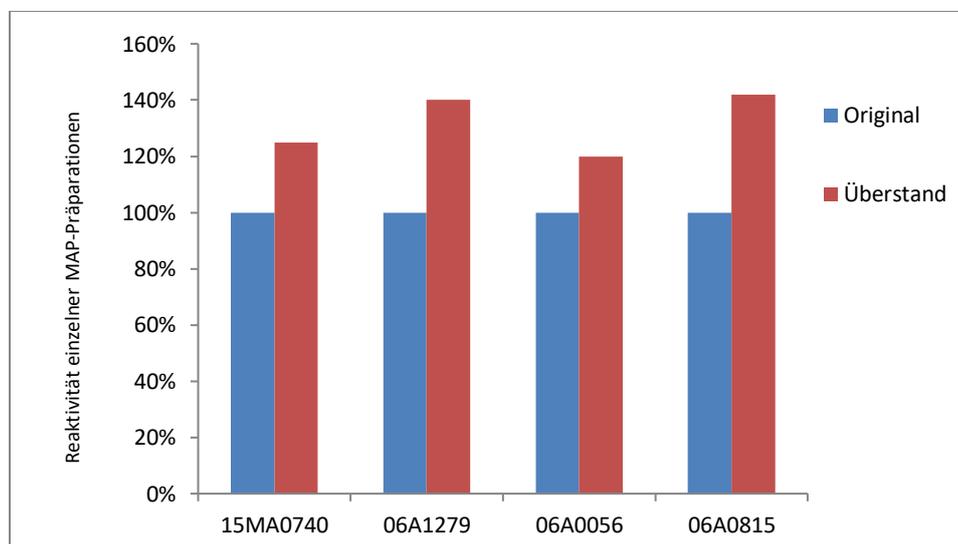


Abbildung 25: Relative Reaktivität von autoklavierten MAP-Präparationen verschiedener MAP-Isolate und daraus gewonnener zellfreier Überstände im auf mAk 8B2/1H basierenden indirekten EIA. Die Zellpellets wiesen nur marginale Restaktivitäten von $< 5\%$ auf und sind daher nicht dargestellt.

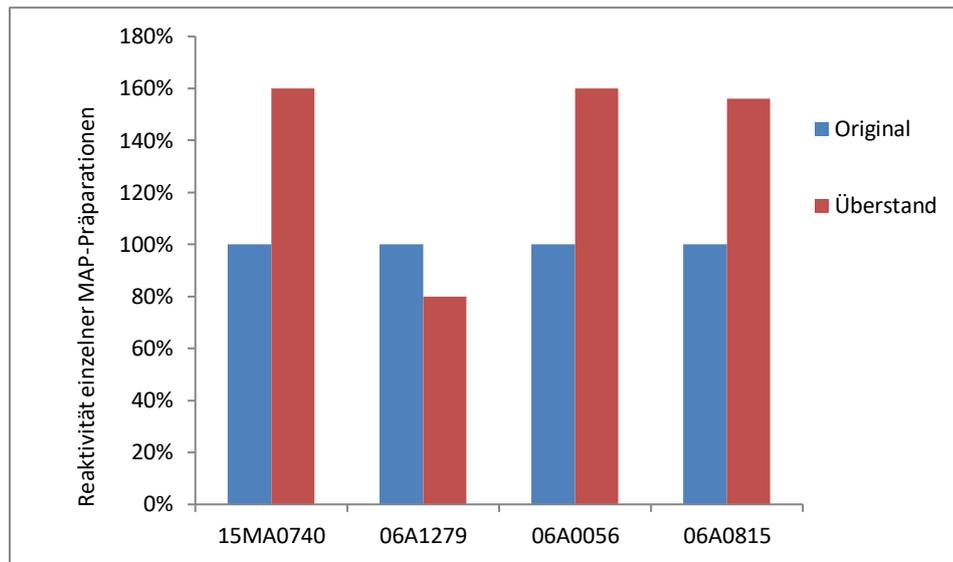


Abbildung 26: Relative Reaktivität von autoklavierten MAP-Präparationen verschiedener MAP-Isolate und daraus gewonnener zellfreier Überstände im auf mAk 12G3 basierenden indirekten EIA. Die Zellpellets wiesen nur marginale Restaktivitäten von < 5 % auf und sind daher nicht dargestellt.

Ähnliche Beobachtungen (Ergebnisse nicht dargestellt) wurden auch bei den bestrahlten MAP-Präparationen gemacht, so dass sich die Frage stellte, ob diese präferentielle Lokalisation auch bei lebenden Keimen zu beobachten ist.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden von den Referenzstämmen bzw. den FLI-Isolaten Aliquote von in M7H9 angelegten Flüssiganreicherungen steril filtriert und in Verdünnungsreihen in den auf mAk 12G3 basierenden EIA eingesetzt. MAk 8B2/1H konnte aufgrund der in Abb. 19 skizzierten Reaktivität mit M7H9-Flüssigmedium nicht für diese Versuchsreihe eingesetzt werden. Die Keimgehalte der verwendeten Anreicherungen lagen in einem Bereich von 1×10^8 bis $2,5 \times 10^8$ KbE/ml, die für die zellfreien Kulturüberstände der lebenden MAP erhaltenen Ergebnisse wurden in Relation zu den für autoklavierte Keimpräparationen erhaltenen Reaktivitäten gesetzt. Abb. 27 stellt exemplarisch einige der in diesen Versuchsreihen erhaltenen Ergebnisse dar.

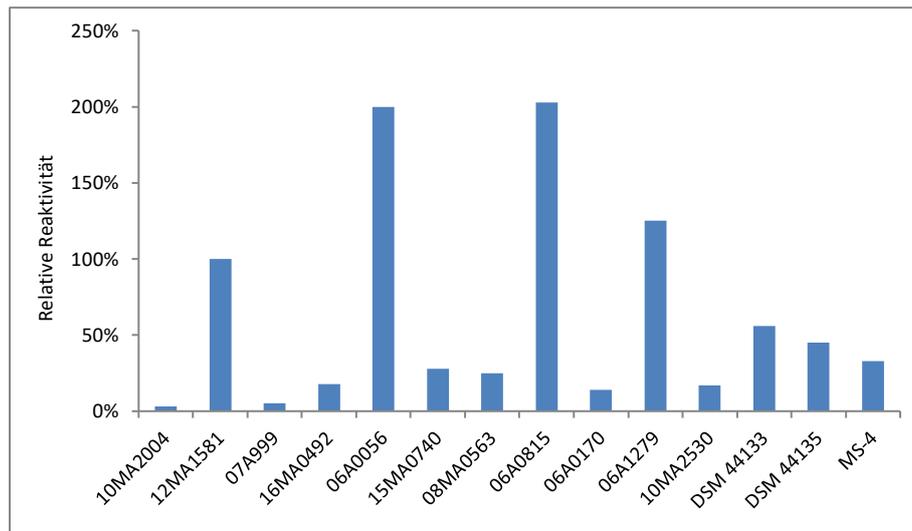


Abbildung 27: Relative Reaktivität frischer, steril filtrierter Überstände von MAP (Referenzstämmen und FLI-Isolate) mit mAk 12G3. Die im EIA erhaltenen Signalintensitäten lagen, gemessen an den für autoklavierte Präparationen ermittelten Werten in einem Bereich von 3 bis 203 %.

Anders als bei den Überständen der autoklavierten Keimpräparationen, wurden hier verhältnismäßig heterogene Wiederfindungsraten ermittelt, die Werte variierten stark in einem Bereich von 3 - 203 %. Dies untermauert zum einen die Theorie, dass es sich bei den reaktiven Antigenen um lose an die Oberfläche von MAP gebundene Antigene handelt. Zum anderen deuten diese Ergebnisse aber auch darauf hin, dass eventuell zumindest bei manchen Stämmen wie z.B. 15MA0740 (vergleiche Abb. 26) erst nach zusätzlicher Manipulation (z.B. Autoklavieren) die antigenen Strukturen vermehrt im zellfreien Überstand zu finden sind.

Zur weiteren Charakterisierung der Zielantigene wurden hochreaktive, autoklavierte Bakterienpräparationen des MAP-Stammes DSM 44135 über Nacht mit Proteinase K behandelt und nachfolgend in die auf den mAk 8B2/1H und 12G3 basierenden EIA-Systemen bzw. im Immunoblot eingesetzt. Für beide mAk und in beiden verwendeten Techniken wurden kongruente Ergebnisse erhalten. Die Proteasebehandlung resultierte in einer drastischen Reduktion der Antikörper-Aktivität. So wurden beispielsweise mit mAk 8B2/1H für die Originalproben bei einer Zellzahl von $1,7 \times 10^5$ Kbe/ml im EIA Signalintensität von 1,0 erreicht, nach PK-Verdau mussten dann Zellzahlen von $> 1,4 \times 10^8$ Kbe/ml eingesetzt werden. Der unter identischen Bedingungen angesetzte Kontrollansatz (Ansatz ohne Zusatz von PK) wies die gleiche Reaktivität wie die

Originalprobe auf. Auch mAk 12G3 zeigte eine deutlich reduzierte Reaktivität (ca. Faktor 10) mit der PK verdauten Probe im Vergleich zur Originalprobe, wobei allerdings auch nach PK-Verdau noch gewisse Reaktivitäten nachweisbar waren (Abb. 28). Diese Ergebnisse geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass es sich bei beiden mit den mAk reaktiven Zielantigenen um Proteine bzw. proteinhaltige Verbindungen handelt.

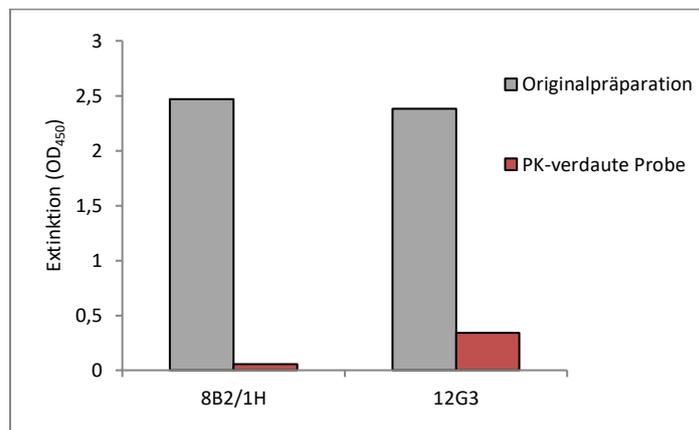


Abbildung 28: Rest-Reaktivität der beiden mAk 8B2/1H bzw. 12G3 mit Proteinase K verdauten MAP-Präparationen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im nächsten Schritt sowohl die PK verdauten Probe, als auch die Originalprobe wie unter 3.2.5 beschrieben mittels Immunoblot analysiert. Die Zellkulturüberstände wurden hierfür in einer 1:10 Verdünnung (entspricht in etwa einem Antikörpergehalt von 5 µg/ml) eingesetzt. Im Versuchsaufbau mit mAk 8B2/1H waren allerdings weder für die Originalprobe, noch die PK verdauten Probe eindeutige Proteinbanden detektierbar, nur im Bereich des Probenauftrags war eine geringe Reaktivität des mAk nachweisbar. Im Gegensatz hierzu reagierte mAk 12G3 bei der Originalprobe mit einer Proteinbande bei ca. 45 kDa, die nach PK-Verdau der Probe nicht mehr nachweisbar war (Abb. 29).

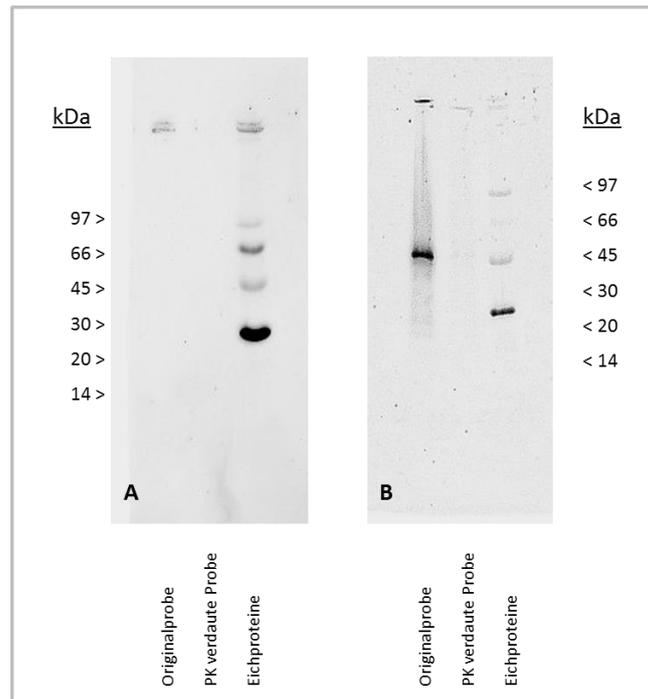


Abbildung 29: Immunoblot nach PK-Verdau im Vergleich zu unverdauten Originalproben. (A) mAk 8B2/1H, (B) mAk 12G3. Bei mAk 12G3 ist eine deutliche Reduktion der Bandenstärke erkennbar

4.3.7 Immunfluoreszenz

In den oben dargestellten Versuchen konnte zumindest bei autoklavierten Präparationen eine präferentielle Lokalisation der Zielantigene im zellfreien Überstand nachgewiesen werden. Die Analyse von Kulturüberständen lebender Keime führte allerdings zu divergierenden Ergebnissen. Daher wurden in weitergehenden Versuchen mittels Immunfluoreszenz zusätzlich überprüft, ob bei lebenden Keimen unter diesen Analyse-Bedingungen die Zielantigene auch auf der Zelloberfläche nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurden lebende MAP-Zellen der beiden Referenzstämme (DSM 44135 bzw. MS-4) in M7H9 angereichert, für die Immunfluoreszenz wurden Zellgehalte von ca. 1×10^9 Kbe/ml verwendet. Antikörperhaltige Hybridom-Kulturüberstände wurden dabei in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Wie in Abb. 30 dargestellt, konnte für 8B2/1H unter diesen Bedingungen keine ausgeprägte Bindung an lebende MAP nachgewiesen werden, mAk 12G3 zeigte hingegen mit beiden verwendeten Stämmen eine deutliche Reaktivität, wobei vorzugsweise eine punktuelle Fluoreszenz auf den MAP-Zellen beobachtet wurde. Die in Abb. 30 dargestellten typischen Bilder verdeutlichen auch, dass die mAk nicht

immer mit allen Zellen reagieren, ein weiterer Hinweis darauf, dass das Zielantigen nicht fest in der Zellwand verankert ist und eine starke Tendenz aufweist in das umgebende Medium zu diffundieren. In den mitgeführten Negativkontrollen (Einsatz von MAP-irrelevanten mAk gleichen Isotyps) wurde keinerlei Reaktivität festgestellt.

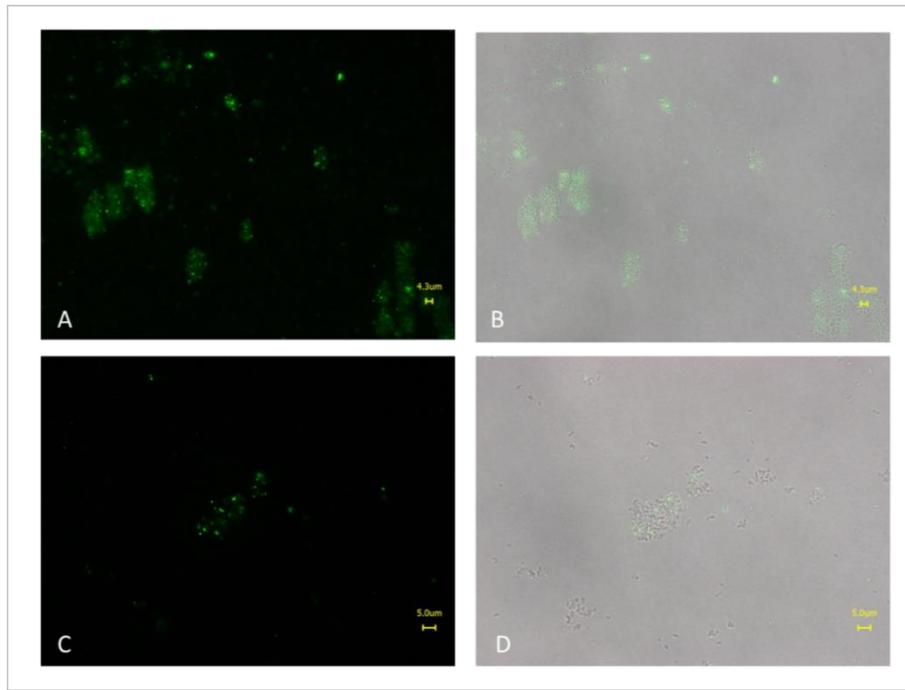


Abbildung 30: Reaktivität der beiden monoklonalen Antikörper in der Immunfluoreszenz mit lebenden MAP (DSM 44135). (A) Immunfluoreszenzaufnahme mit punktueller Konzentration (Belichtungszeit 1,5 sec) bei Einsatz von mAk 12G3 (B) wie A in Overlay-Modus (C) + (D) Immunfluoreszenzaufnahme bzw. Overlay mit der Phasenkontrastaufnahme bei Einsatz von mAk 8B2/1H .

4.3.8 Anreicherung der Zielantigene mittels Immunaффinitätschromatographie

Da in allen Untersuchungen starke Hinweise darauf erhalten wurden, dass es sich bei dem mit mAk 12G3 reaktiven Antigen um ein Protein handelt und zudem relativ hohe Konzentrationen dieses Proteins im zellfreien Überstand nachweisbar sind, wurde im Weiteren überprüft, ob mittels Immunaффinitätschromatographie das reaktive Antigen in reiner Form dargestellt werden kann.

Dazu wurde mAk 12G3 kovalent an eine Gelmatrix (CNBr-aktivierte Sepharose 4B) gekoppelt und zur Herstellung einer Immunaффinitätssäule (Gelvolumen von 3,5 ml)

verwendet. In allen IAC-Ansätzen wurden 25 ml steril filtrierter Kulturüberstand des MAP-Stammes DSM 44135 (1:2 verdünnt in PBS) über die Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit 20 ml PBS, wurden die gebundenen Komponenten mittels 15 ml Glycin/HCl-Puffer (pH 2,5) von der Säule eluiert. Durch sofortige Zugabe von Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,0) wurde das Eluat neutralisiert (pH 7,0), Aliquote der einzelnen Fraktionen (Probenauftrag, Probendurchlauf, Spülüberstände und Eluat) wurden mittels indirekter EIA-Verfahren untersucht.

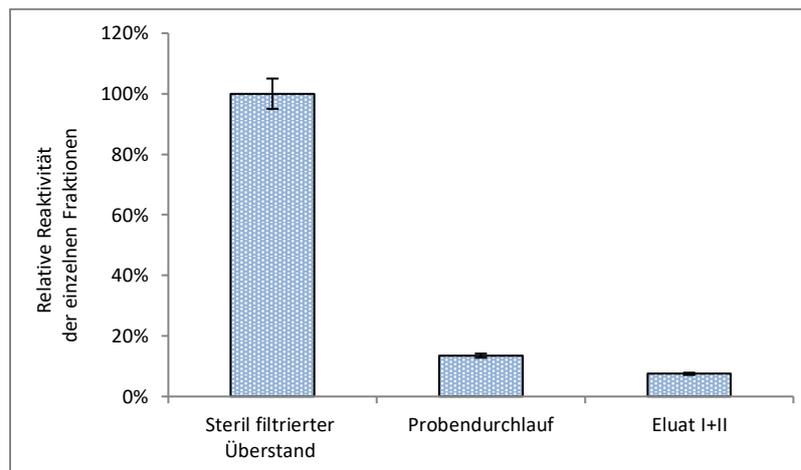


Abbildung 31: Bilanzierung der zur IA-Anreicherung des mit mAk 12G3 reaktiven Proteins durchgeführten Versuche (n=3). Alle Fraktionen wurden mittels indirektem EIA untersucht.

In allen Versuchen (n=3) wurde eine hohe Bindung des in den MAP-Kulturüberständen vorhandenen Antigens an das Immunosorbens beobachtet, der relative Restantigen-Gehalt in den Probendurchläufen lag bei 11 % (Abb. 31). Die Bindung des Antigens an die Säule war stabil, in der Waschlösung war maximal 1 % der aufgetragenen Antigen-Menge nachweisbar. Allerdings wurde für das Eluat nur eine Rückgewinnungsrate von 7,5 % erzielt. Um auszuschließen, dass der fehlende Nachweis des Zielantigens auf einer unspezifischen Bindung des Proteins an die Säulenmatrix beruht, wurde in einem Parallelansatz Kulturüberstand des MAP-Stammes DSM 44135 unter identischen Bedingungen über eine mit einem irrelevanten Isotyp-gleichen mAK (mAk 2A12 gegen T-2 Toxin) gecoatete Säule gegeben und die erhaltenen Fraktionen mittels EIA und Immunoblot analysiert. Eine ausgeprägte Bindung des Proteins an das eingesetzte Säulenmaterial wurde dabei nicht beobachtet, 86 % der reaktiven Bestandteile konnten im Probendurchlauf, 8,9 % in Spüllösung I nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf eine beabsichtigte Identifikation des mit dem mAk 12G3 reaktiven Proteins mittels proteomischer Verfahren (Massenspektrometrie) wurde das gewonnene Eluat mittels 50 %igem PEG 20.000 um etwa Faktor 15 konzentriert und anschließend gegen PBS dialysiert und zusammen mit den bei der IA-Reinigung anfallenden Fraktionen im Immunoblot analysiert (Abb. 32). Im Vergleich zum Kontrolllauf wurde im Probendurchlauf bzw. den Waschlösungen der MAP-spezifischen Säule eine deutliche Reduktion der antigenspezifischen Bandenstärke beobachtet, ein Beweis für die auch im EIA beobachtete Bindung des Proteins an die mit dem spezifischen Antikörper 12G3 gekoppelte Säulenmatrix. Allerdings konnte auch unter den bei der SDS-PAGE eingesetzten reduzierenden Bedingungen keine höhere Antigen-Konzentration im Eluat nachgewiesen werden, d.h. auch nach Aufkonzentrierung des Eluats wurden nur Spuren des Zielantigens mittels Immunoblot gefunden. Ob diese extrem niedrige Wiederfindungsrate auf eine fehlende Eluierbarkeit des Proteins von der IA-Säule, einen proteolytischen Abbau nach der Aufreinigung oder auf andere Gründe zurückzuführen ist, konnte bislang nicht geklärt werden.

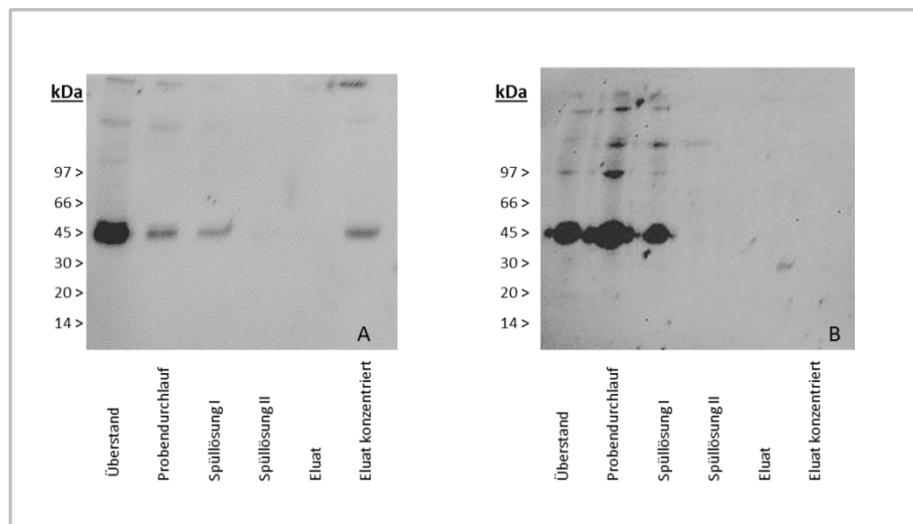


Abbildung 32: (A) Immunoblot-Analysen der bei der IA-Reinigung des mit mAk 12G3 reaktiven Proteins anfallenden Fraktionen. Die Reduktion der Proteinbanden in Probendurchlauf und Waschlösungen zeigt, dass eine spezifische Bindung der MAP-Bestandteile an die Säule stattgefunden hat. (B) Immunoblot-Analyse eines unter identischen Bedingungen durchgeführten Kontrollansatzes, bei dem für die IA-Reinigung ein nicht mit MAP(-Bestandteilen) reaktiver mAk eingesetzt wurde. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass prinzipiell keine Bindung des Proteins an die eingesetzte Gelmatrix auftritt.

V. Diskussion

Aufgrund der weiten Verbreitung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen ist eine potentielle Kontamination des Lebensmittels Milch mit *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) nicht auszuschließen. Unter lebensmittelhygienischen und epidemiologischen Aspekten wird nach wie vor sehr kontrovers diskutiert, ob MAP in der Lage ist, die üblichen Pasteurisierungsbedingungen zu überleben (Robertson et al., 2017). Eine zentrale Rolle spielt hierbei auch die Frage, ob intrazellulär als Aggregate vorliegende MAP-Keime eventuell eine deutlich höhere Hitzeresistenz aufweisen (Gerrard et al., 2018). Grundsätzlich wird aber von allen Autoren bemängelt, dass sensitive und spezifische Methoden zum MAP-Nachweis in Milch fehlen, insbesondere die schnelle Differenzierung von lebenden und toten Keimen gestaltet sich in praxi aufgrund der extrem langen Generationszeiten dieser Keime als schwierig (Robertson et al., 2017, Alajmi et al., 2016). Zwar sind kommerzielle ELISA-Testverfahren (z.B.: IDEXX MAP Ab Test, ID Screen® Paratuberculosis Indirect, Paracheck® 2 Kit) für den Nachweis der Paratuberkulose des Rindes am Markt erhältlich, diese sind jedoch als Antikörper-Nachweise konzipiert und dienen dazu eine bestehende Infektion des Tieres nachzuweisen - ein direkter MAP-Nachweis ist damit nicht möglich. Viele Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die Sensitivität dieser Verfahren limitiert ist, bei Untersuchungen von Milch wurden bspw. nur 54 - 62 % der Erreger-positiven Tiere identifiziert (https://www.fli.de/fileadmin/FLI/IMP/Information_NRL_Paratuberkulose.pdf, letzter Zugriff 01/19). Dabei spielt das Stadium der Erkrankung eine wichtige Rolle, bei der Untersuchung subklinisch erkrankter Tiere wurde eine deutlich niedrigere Trefferquote als bei klinisch erkrankten Tieren gefunden (Olsen et al., 2002, Fry et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes zur MAP-Milch-Problematik durch die Generierung von MAP-spezifischen Antikörpern die Basis für die Etablierung innovativer, sensitiver und schneller Nachweisverfahren geschaffen werden, mit denen anders als bei den bislang eingesetzten kulturellen und molekularbiologischen Verfahren ein schneller und direkter Erregernachweis insbesondere in der Milch möglich ist. Ein zentraler Punkt dieses Konzeptes war dabei die antikörperbasierte Anreicherung lebender MAP-Keime aus Probenmatrices wie z.B. Milch.

Aufgrund dieser Prämisse sollten zur Induzierung von MAP-spezifischen Antikörpern in Mäusen und Kaninchen minimal manipulierte und schonend inaktivierte MAP-

Präparationen eingesetzt werden, wobei insbesondere Struktur und Zusammensetzung der Zelloberfläche der von lebenden Keimen sehr ähneln sollte. Eine in älteren Arbeiten beschriebene Hitzeinaktivierung der MAP-Keime vor der Immunisierung (Mutharia et al., 1997) stellte daher keine praktikable Alternative dar, da dieses Verfahren zu einer umfangreichen Denaturierung von Proteinen und somit zu massiven Veränderung der Oberflächen-assoziierten Epitope führt (Kindt et al., 2007). Einen deutlichen Unterschied in der Immunantwort von mit lebenden bzw. toten MAP immunisierten Kaninchen beobachteten bereits Bannantine und Stabel (2001). Zur schonenden Inaktivierung der Keime wurden daher in der vorliegenden Arbeit die hergestellten Keimpräparationen mit γ -Strahlung behandelt. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die zur Immunisierung eingesetzten Keime sich in ihrer Oberflächenstruktur nicht von lebenden Keimen unterscheiden und somit die später generierten Antikörper auch für eine Anreicherung lebender Keime geeignet wären. Ähnliche Ansätze wurden auch von Grant et al. (1998) bei der Generierung von polyklonalen Kaninchenantisera bzw. O'Brien et al. (2016) zur Herstellung monoklonaler Maus-Antikörper eingesetzt. In beiden Ansätzen wurden Antikörper in den Tieren induziert, die zum einen im direkten und kompetitiven ELISA eine Bindung an ganze MAP-Zellen zeigten und zum anderen erfolgreich zur immunmagnetischen Anreicherung von MAP-Zellen aus Probenmatrices eingesetzt werden konnten (Khare et al., 2004, O'Brien et al., 2016). In anderen Arbeiten zur Induzierung von monoklonalen Antikörpern gegen MAP-Oberflächenassoziierte Antigene wurden als Immunogene hingegen nach Ultraschallbehandlung gewonnene Proteinhaltige Zelllysate eingesetzt (Radosevich et al., 2007) wobei allerdings unklar blieb, ob zur Präparation lebende oder hitzebehandelte MAP-Keime verwendet worden waren (Bannantine et al., 2007a, Bannantine et al., 2011). Genauere Studien zur Art bzw. Lokalisation der von den generierten mAk erkannten Antigene zeigten allerdings, dass ein Großteil der so induzierten Antikörper mit cytosolischen Proteinen reagierte - eine Anreicherung von MAP-Keimen ist damit nicht möglich (Bannantine et al., 2018). Von derselben Arbeitsgruppe wurden auch gelegentlich rekombinant hergestellte MAP-Proteine als Immunogen eingesetzt. Zur Auswahl der Proteine wurde die Immunreaktivität von Seren MAP-positiver Kühe berücksichtigt (Bannantine et al., 2007b, Bannantine et al., 2012) im Fokus standen hierbei ein 35 kDa MMP (major membrane protein; MAP_2121c) bzw. eine Peptidoglycan-Hydrolase (MAP_1272c). In einer Vielzahl weiterer Immun-Proteomik-Studien, bspw. Willemsen et al., 2006, Leroy et al., 2007, Facciuolo et al., 2013, Capsel et al., 2016, Li et al., 2017, Karuppusamy et al., 2018, bei denen überprüft

wurde, gegen welche MAP-Proteine in den Seren infizierter Rinder und Schafe Antikörper nachzuweisen sind, wurden mittlerweile eine breite Palette anderer Zielantigene identifiziert.

Neben dem Inaktivierungsverfahren wurde bei der Herstellung des Immunogens zudem berücksichtigt, dass die Expression von Membranproteinen auch davon abhängig ist, unter welchen Bedingungen die Anreicherung der Keime erfolgt (Cho and Collins, 2006). Daher wurde für Immunogen A MAP-Material aus zwei verschiedenen Anreicherungsverfahren verwendet: zum einen aus einer Flüssiganreicherung in M7H9-Medium, zum anderen auf einem festen Nährboden (HEYM-Agar) gewachsene Keime. Beide Medien enthalten allerdings hohe Konzentrationen an Proteinen - bovines Serumalbumin und Katalase bei M7H9 bzw. Eiproteine bei HEYM-Medien, was sich im weiteren Verlauf der Arbeiten als kontraproduktiv erwies. Bei der Charakterisierung der mit Immunogen A induzierten polyklonalen Seren stellte sich nämlich heraus, dass sowohl gegen Bestandteile der o.a. Medien als auch gegen den zur Konservierung des Immunogens eingesetzten Protease-Inhibitor-Mix Antikörper gebildet worden waren. Insbesondere mit HEYM-Bestandteilen zeigten die generierten Kaninchenantisera eine deutliche Kreuzreaktivität. Auch für einige der aus der parallel laufenden Immunisierung von Mäusen gewonnenen mAk konnte eine Reaktivität mit HEYM-Bestandteilen nachgewiesen werden (mAk 3B11 in Abb. 20). Als Antigen fungierte hierbei ein ca. 15 - 20 kDa großes Eiprotein, das - wie weitere Untersuchungen zeigten - sich zudem relativ stark an die MAP-Keime anlagerte (Ergebnisse nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurde für die erneute Immunisierung von Mäusen ein alternatives Immunogen eingesetzt. Die Anreicherung der Stämme erfolgte dabei nur mehr im M7H9-Medium, und zur Entfernung der Medienproteine wurde das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet intensiv mit proteinfreiem Puffer gewaschen.

Prinzipiell konnten aber durch den Einsatz dieser Immunogene im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei Kaninchen und Mäusen hohe Titer an MAP-spezifischen Antikörpern induziert werden, die entsprechenden Werte lagen bspw. für das Endserum des Kaninchens II bei 1:75.000 (IgG-Titer). Dieses Kaninchen zeigte bei der Immunisierung auch den üblichen Immunisierungsverlauf, d.h. Abfall der anfänglich hohen IgM-Titer und parallel dazu ein Anstieg der IgG-Titer. Im Gegensatz dazu kam es beim Kaninchen I nicht zur erwarteten Serokonversion, trotz Restimulierung konnte kein Anstieg des IgG-Antikörpertiters beobachtet werden. Auch der ermittelte IgM-Titer bewegte sich während des gesamten Immunisierungsverlaufs auf einem konstanten Niveau

von 1:15.500 bis 1:19.500. Ob dies auf das verwendete Immunogen zurückzuführen ist, blieb unklar. Bei Grant et al. (1998), die eine ähnlich hergestellte MAP-Präparation auch zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten, fehlen entsprechende Angaben zum Immunisierungsverlauf. Interessant ist allerdings in diesem Zusammenhang, dass in späteren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe mit diesem Immunogen trotz einer Immunisierungsdauer von mehreren Monaten nur mAk vom IgM-Isotyp generiert werden konnten - eventuell ein Hinweis darauf, dass die Immunogenität der mittels γ -Strahlung inaktivierten MAP-Präparation limitiert ist.

Prinzipiell konnten mit dem Immunogen in den eigenen Arbeiten Antikörper gegen Oberflächenstrukturen von MAP in Mäusen zu induziert werden. Allerdings gehörte auch hier einer der letztlich etablierten Antikörper, mAk 8B2/1H, zum Isotyp IgM. Als nachteilig ist hierbei insbesondere anzusehen, dass diese Immunglobuline nur mit hohem Aufwand zu reinigen sind, sich in gereinigter Form oft als instabil erweisen und zudem die Tendenz haben, sich an Oberflächen unspezifisch anzulagern. Diese bei manchen IgM auftretende unspezifische Bindungsfähigkeit ist zurückzuführen auf den speziellen Aufbau der IgM-Moleküle: 5 IgG-ähnliche Moleküle, die durch *joining*-Peptide und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Richter, 2003, Mulisch, 2013). Auch für den mAk 8B2/1H wurden ähnliche Charakteristika ermittelt, zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen mussten die entsprechenden ZKÜ in höheren Verdünnungen (1:150) in die EIAs eingesetzt werden. Prinzipiell beschränkt dies die Einsetzbarkeit des mAk für analytische Zwecke.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die hergestellten polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörper in verschiedenen Ansätzen umfassend charakterisiert, wobei zuallererst die relative Affinität und Spezifität der Antikörper im Vordergrund stand. Das im Hinblick auf den hohen IgG-Anteil für diese Untersuchungen ausgewählte Kaninchenserum (Endabnahme des Kaninchens II) zeigte dabei eine hohe Affinität und breite Reaktivität. Im indirekten EIA konnten Nachweisgrenzen von bis zu 3×10^4 KBE/ml erzielt werden, alle eingesetzten MAP-Isolate wurden erkannt. Bei der weiteren Überprüfung des Serums auf Genus-übergreifende Reaktivität stellte sich heraus, dass das Kaninchenantiserum vornehmlich mit Vertretern des Avium-Komplexes (MAC) reagierte. Zu diesen zählt neben den *M. avium* ssp. auch *M. intracellulare*. Aufgrund der hohen genetischen Homologie von 95 % zwischen *M. avium* ssp. und den MAP-Stämmen

(Bannantine et al., 2003, Wu et al., 2006, Paustian et al., 2008) war dieses Reaktionsmuster zu erwarten und wurde auch in vielen anderen Untersuchungen thematisiert.

Auch die mit dem Immunogen B generierten mAk 8B2/1H und 12G3 zeigten ähnliche Charakteristika und zeichneten sich ebenfalls durch eine breite Reaktivität mit fast allen überprüften MAP-Isolaten und nicht nur den zur Immunisierung verwendeten Stämmen aus. Bei Verwendung von mAK 12G3 wurden alle der überprüften MAP-Isolate mit Nachweisgrenzen von bis zu 3×10^5 Kbe/ml detektiert. Im auf 8B2/1H basierenden EIA wurden Nachweisgrenzen von bis zu $4,1 \times 10^4$ Kbe/ml erreicht, 16 der 17 eingesetzten MAP-Isolate wurden erkannt. Auffällig war jedoch, dass beide mAk eine deutlich stärkere Reaktivität mit den autoklavierten als mit den zur Herstellung des Immunogens verwendeten bestrahlten Keimpräparationen aufwiesen. Die in den indirekten EIAs erreichten relativ niedrigen Nachweisgrenzen untermauern zum einen die hohe Affinität der hergestellten Antikörper, können zum anderen aber auch als Indiz dafür gewertet werden, dass die von den mAk erkannten Antigen-Strukturen in hohen Mengen von den MAP-Keimen exprimiert werden - ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Einsetzbarkeit der mAk zur Anreicherung von MAP aus Lebensmitteln.

Beide mAK zeigten jedoch nicht nur eine breite Reaktivität mit diversen überprüften MAP-Stämmen sondern wiesen auch eine deutliche, Genus-übergreifende Reaktivität auf. So wurden alle überprüften schnellwachsenden Mykobakterien-Spezies erkannt, wenn auch auf etwas niedrigerem Niveau als die MAP-Stämme. Gründe für die sowohl bei den monoklonalen Antikörpern als auch polyklonalen Antiseren auftretende Intra-Genus Reaktivität liegen sicherlich, wie bereits bei Olsen (2002) beschrieben, darin, dass ein Großteil der bei MAP identifizierten Antigene auch in anderen Mykobakterien-Spezies zu finden ist, wobei die Sequenzhomologien der Proteine oft bei deutlich über 90% liegen (Facciolo et al., 2013). Auch andere Autoren wiesen auf die Problematik einer mangelnden Spezifität monoklonaler Antikörper gegen MAP hin (Mutharia et al., 1998, Bannantine et al., 2007a, Bannantine et al., 2018). So wurden bspw. von der Arbeitsgruppe um J.P. Bannantine am U.S. Department of Agriculture im Laufe eines Jahrzehntes Dutzende von mAk gegen MAP generiert, lediglich ein Antikörper erwies sich als spezifisch für MAP und zeigte keine Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien (Bannantine et al., 2011). Homologe des von mAk erkannten 25 kDa-Proteins (MAP_1025) sind zwar auch bei anderen Mykobakterien zu finden, der Antikörper erkennt aber ein nur bei MAP-Stämmen zu findendes Aminosäuren-Motiv (HPGGQQP).

Alle in der vorliegenden Arbeit etablierten Antikörper (mAk und polyklonale Seren) reagierten mit antigenen Oberflächenstrukturen von MAP, die sich im Verlauf der Untersuchungen als Proteine bzw. proteinhaltige Strukturen identifizieren ließen. Für die Untersuchungen zur Epitop-Spezifität wurden überwiegend Immunoblot- aber auch EIA-Verfahren eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Kaninchenantiserum mit Zielantigenen im Bereich von < 14 - 45 kDa reagierte, die prominenteste Bande wurde für ein Protein mit einem grob geschätzten Molekulargewicht von etwa 9 - 11 kDa erhalten (Abb. 15). Ein Verdau mit Proteasen bestätigte den Proteincharakter des Zielantigens, weitere Anstrengungen zur genaueren Identifizierung dieses Proteins wurden nicht unternommen. Im Hinblick darauf, dass zur Immunisierung der Kaninchen ganze MAP-Zellen verwendet worden waren, ist aber eine so stark ausgeprägte, fast monospezifische Reaktivität mit nur einem, zudem vergleichsweise niedermolekularen Protein erstaunlich. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch bei Seren MAP-infizierter Rinder regelmäßig eine Reaktion in diesem Molekulargewichtsbereich nachzuweisen ist (Olsen et al., 2002, Willemsen et al., 2006) bzw. dass in einer als PPD (purified protein derivative) bezeichneten, beim Hauttest eingesetzten MAP-Präparation ein 13 kDa großes Protein (Acyl carrier protein, MAP_1997) in hohen Konzentrationen nachzuweisen ist (Capsel et al., 2016)

Auch der mAK 12G3 zeigte - anders als der mAk 8B2/1H - eine Reaktivität im Immunoblot, es wurde eine deutliche Bande im Bereich von ca. 45 kDa erhalten. Dieser Größenbereich ist häufig bei MAP zu finden. He und De Buck (2010) konnten zeigen, dass etwas mehr als 10 % der bei MAP nachweisbaren Zellwandproteine ein Molekulargewicht von 40 - 50 kDa aufweisen. Interessant ist in diesem Zusammenhang sicherlich auch, dass in der bereits oben erwähnten PPD ein 44 kDa Protein (Elongation factor Tu; MAP_4143) in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Von He und De Buck (2010) wurde dieses Protein zudem als eines von 38 Oberflächen-exponierten MAP-Proteinen identifiziert. Auch in der bereits erwähnten Arbeit von Mutharia et al. (1997) wurde ein spezifischer monoklonalen Antikörper, MAb FL1-A1, generiert, der im Immunoblot MAP-Antigene mit einem Molekulargewicht im Bereich von 44 - 45 kDa detektierte. Das Antigen war sowohl in Zelllysaten als auch in zellfreien Kulturüberständen nachweisbar, allerdings nicht mehr nach intensiver Hitzebehandlung der Lysate (100 °C, 30 min). Im Gegensatz hierzu ist das vom mAk 12G3 erkannte Protein hitzestabil und lässt sich auch in autoklavierten Präparationen nachweisen. Auch hier konnte der Proteincharakter des reaktiven Antigens durch Verdau mit Proteinase K bewiesen werden, die Behandlung

fürte allerdings zu keinem vollständigen Verdau. Nach Gründen für diese partielle Protease-Resistenz wurden nicht weiter gesucht, eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich beim Zielantigen um ein Glyco- bzw. Lipoprotein handelt.

In den Ansätzen mit 8B2/1H konnte nach Verdau mittels Proteinase K hingegen im indirekten EIA ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Im Vergleich zur unbehandelten Probe wies die mit Proteinase K verdaute Probe im EIA keinerlei Reaktivität mehr auf. Daneben wurde für diesen mAk auch eine fehlende Reaktivität im Immunoblot festgestellt. Beide Befunde stellen deutliche Hinweise darauf dar, dass dieser mAk ein auf einem Protein lokalisiertes Konformationsepitop erkennt. Dieses Epitop ist zudem hitzestabil, da der mAk auch mit autoklavierten MAP-Präparationen sehr stark reagiert. Im Hinblick auf eine Identifizierung des mit diesem mAk reaktiven Proteins sind aufgrund der Kombination aus Konformationsepitop und IgM-Isotyp viele der gängigen Techniken nicht einsetzbar, die von Bannantine et al. (2007 bzw. 2018) beschriebenen Phagen-Display-Bibliotheken erscheinen hier noch am erfolgversprechendsten.

Weitere Ansätze zur genaueren Lokalisation der antigenen Strukturen basierten auf Immunfluoreszenz-Untersuchungen. Während für den mAk 8B2/1H keine Bindung an die Oberfläche von MAP-Zellen gezeigt werden konnte, wurde für das Kaninchenantiserum eine deutliche Bindung an Oberflächen-assoziierte Strukturen von MAP nachgewiesen. Dies bewies die grundsätzliche Eignung der Seren für IMS-basierte Ansätze, entsprechende Experimente scheiterten allerdings aus unbekanntem Gründen. Eventuell könnten hier durch Modifikationen des Testablaufs wie z.B. Verwendung anderer magnetischer Beads mit höherer Bindungskapazität bzw. Einsatz teilgereinigter Serum-Präparationen, bessere Ergebnisse erzielt werden. Eine Bindung an MAP-Zellen konnte mittels Immunfluoreszenz auch für den mAk 12G3 gezeigt werden, auffällig war hier eine punktuell ausgeprägte Reaktivität. Die Ergebnisse bewiesen, dass zumindest ein Teil der generierten Antikörper Oberflächenstrukturen der MAP-Keime erkennen, die Lokalisation des mit mAk 8B2/1H reaktiven Proteins blieb hingegen unklar. Eine mangelnde Reaktivität monoklonaler Antikörper in Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde am Lehrstuhl auch bei früheren Untersuchungen mit *B. cereus* und *A. acidoterrestris* beobachtet. Mögliche Gründe waren eine eventuell unzureichende Präsentation des Zielepitops an der Keimoberfläche bzw. eine Reaktivität der mAk mit lose an die Keimoberfläche gebundenen Proteinen (Wiescher, 2013, Mast, 2016). Eine ganze Reihe von Proteomics-Untersuchungen zeigte, dass bei MAP die letztgenannte Variante relativ

häufig auftritt. So beobachteten He und De Buck (2010) eine deutliche Diskrepanz zwischen theoretisch und tatsächlich auf der MAP-Zellwand gefundenen Proteinen. Dies wurde zurückgeführt auf eine „loose association of these proteins with the cell wall“, eine Freisetzung dieser Proteine soll bereits bei üblichen, schonenden Bearbeitungsschritten wie z.B. Schütteln oder Zentrifugation erfolgen. Auch werden bei der Untersuchung von MAP-Kulturfiltraten regelmäßig eine Vielzahl von Proteinen gefunden, die nicht zum erwarteten MAP-Sekretom zu zählen sind (Cho and Collins, 2006, Facciuolo et al., 2013). Um zu überprüfen, ob diese variable Oberflächenbindung auch bei den Zielantigenen der generierten Antikörper auftritt, wurden daher steril filtrierte Überstände und Zell-Pellets getrennt voneinander in indirekten EIA-Verfahren überprüft und auf ihre Reaktivität untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass alle Antikörper, sowohl polyklonale Seren als auch monoklonale Antikörper, eine deutlich stärkere Reaktivität mit den zellfreien Überständen als den Zellpellets aufwiesen. Besonders ausgeprägt war dies bei Verwendung autoklavierter Präparationen, während bei der auf mAk 12G3 basierenden Analyse von Kulturüberständen lebender Keime z.T. eine völlig andere Verteilung gefunden wurde. Einschränkend anzumerken ist hierbei allerdings, dass sich aus technischen Gründen bei den beiden Untersuchungsreihen die Zusammensetzung des M7H9-Mediums unterschied. Zur Vermeidung einer Keimagglutination erfolgte die Anzucht der letztlich autoklavierten Stämme unter Zusatz eines oberflächenaktiven Detergens (0,3 % Tween 20); unter diesen Bedingungen war aber eine Anreicherung der als lebende Keime analysierten FLI-Isolaten nicht möglich. Wahrscheinlich tragen daher beide Faktoren - Hitzebehandlung und Detergens-Zusätze - dazu bei, das Oberflächen-assoziierte Protein von der Keimoberfläche abzulösen.

Diese offene Frage zeigt aber auch unter anderem, dass es grundsätzlich wünschenswert ist, im Hinblick auf eine umfassende Charakterisierung der mAk deren eigentliche Zielantigene (MAP-Proteine) eindeutig zu identifizieren. Basierend auf den verfügbaren Sequenzierungsdaten zu den jeweiligen MAP-Proteinen könnten so bspw. die Lokalisation der Antigene besser angesprochen werden oder unerwartete, eventuelle Kreuzreaktionen der mAk mit anderen Nicht-Mykobakterien frühzeitig erkannt und beim analytischen Einsatz der Antikörper entsprechend berücksichtigt werden. Wie von Bannantine et al. (2018) anhand der Charakterisierung von 36 MAP-spezifischen mAk gezeigt, ist zur erfolgreichen Identifizierung grundsätzlich eine breite Palette an unterschiedlichen Verfahren (Phagen-Display, Protein-Arrays, Massenspektrometrie nach Immunpräzipitation) einsetzbar bzw. notwendig, für manche mAk konnte z.T. erst ein Jahrzehnt

nach der Erstbeschreibung (Bannantine et al., 2007b) das Zielantigen der mAk zweifelsfrei identifiziert werden.

Eigene Ansätze zur Identifizierung des mit dem mAk 12G3 reaktiven Proteins beschränkten sich auf den Einsatz der Immunaffinitätschromatographie (IAC). Dieser Ansatz hatte sich bereits in früheren Untersuchungen am Lehrstuhl insbesondere bei der Reindarstellung von *B. cereus* bzw. *S. aureus* Enterotoxinen bewährt. So wurde bspw. von Tausch (2016) ein hocheffizientes IAC-Verfahren für eine *B. cereus* Enterotoxin-Komponente (HBL-B) etabliert, ca. 80 % des Toxins konnte im Eluat wiedergefunden werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass der an die Säulenmatrix gekoppelte mAk 12G3 in der Lage ist, das in nennenswerten Konzentrationen in steril filtrierten Kulturüberständen vorliegende MAP-Protein zu binden, im Eluat konnten dann aber nur 7,5 % der ursprünglich aufgetragenen Proteinmenge nachgewiesen werden. Alle bislang vorliegenden Daten deuten auf eine mangelnde Eluierbarkeit des gebundenen Proteins hin, ein v.a. bei der Isolierung von funktionellen Proteinen häufiger zu beobachtendes Phänomen (Firer, 2001). Problematisch ist hierbei insbesondere die Löslichkeit bzw. Denaturierung des Zielproteins unter den für die Elution verwendeten sauren pH-Bedingungen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch die von Cho und Collins (2006) gemachte Beobachtung, dass sich die in MAP-Kulturfiltraten vorliegenden Proteine im Vergleich zu den Zellysate-Proteinen durch vergleichsweise niedrige isoelektrische Punkte auszeichnen. Daneben wurden im Laufe der Arbeit aber auch verschiedene Hinweise darauf erhalten, dass es sich beim mAk 12G3 reaktiven Antigen um ein vergleichsweise hydrophobes Protein handelt. Bei der Elution von hydrophoben Proteinen haben sich wiederum Zusätze von organischen Lösungsmitteln wie Ethylenglycol (Cazes, 2004) bewährt. Inwieweit eine vollständige Elution des mAk 12G3 reaktiven Proteins unter geänderten IAC-Bedingungen möglich ist, muss sich in weiteren Versuchsreihen zeigen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit polyklonale und monoklonale Antikörper gegen Oberflächenassoziierte Antigenstrukturen von MAP gewonnen werden, die mittelfristig zur Etablierung von alternativen Anreicherungs- bzw. Nachweisverfahren für diese lebensmittelhygienisch wichtige Keimgruppe eingesetzt werden könnten.

Aufgrund seiner hohen Affinität weist hierbei insbesondere der mAk12G3 ein besonderes Potential auf, zur vollständigen Charakterisierung dieses Antikörpers fehlt jedoch noch die eindeutige Identifizierung des mit dem mAk 12G3 reaktiven MAP-Oberflächenproteins.

VI. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung poly- und monoklonaler Antikörper zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP).

Als Immunogen wurden mittels γ -Strahlung inaktivierte Keimpräparationen verwendet. Nach Immunisierung von Kaninchen und Mäusen konnten polyklonale Kaninchenantisera und monoklonale Antikörper (mAk) generiert werden. Sensitivität und Spezifität, insbesondere Intra-Spezies bzw. Intra-Genus Reaktivität dieser Antikörper wurden anhand einer großen Bandbreite unterschiedlicher Mykobakterien-Stämme untersucht. Für die Charakterisierung wurden unterschiedliche immunochemische Verfahren eingesetzt. Im indirekten EIA-Verfahren konnten aufgrund der hohen Affinität der generierten Antikörper Nachweisgrenzen von bis zu 3×10^4 KbE/ml (Kaninchenantiserum) erzielt werden. Für die im Rahmen der Immunisierung von Mäusen gewonnenen monoklonalen Antikörper (mAk 8B2/1H und 12G3) wurden vergleichbare Nachweisgrenzen von bis zu $4,1 \times 10^4$ KbE/ml (8B2/1H) bzw. 3×10^5 KbE/ml (12G3) ermittelt. Allerdings zeigten insbesondere die monoklonalen Antikörper auch eine breite Reaktivität mit anderen überprüften Mykobakterien.

Mittels Immunoblot konnte gezeigt werden, dass das Kaninchenantiserum vor allem mit Proteinbanden in einem Bereich von < 14 kDa – 45 kDa reagiert, die Hauptbande lag bei 9 – 11 kDa. Als Zielantigene des mAk 12G3 konnte ein 45 kDa MAP-Protein identifiziert werden, mAk 8B2/1H zeigte im Immunoblot keine Reaktivität. Eine genauere Lokalisation der Zielantigene erfolgte mittels Immunfluoreszenz anhand von lebenden Keimen, sowie der EIA-Analyse von zellfreien Überständen bzw. Bakterienpellets. Die starke Reaktivität der zellfreien Überstände und die teilweise punktuelle Reaktivität der mAk mit MAP-Oberflächen deuten darauf hin, dass es sich bei den reaktiven Antigenen um lose an die Oberfläche von MAP gebundene Strukturen handelt.

Im Hinblick auf die angestrebte Identifizierung des mit mAk 12G3 reaktiven MAP-Proteins wurde überprüft, ob mittels Immunaффinitätschromatographie (IAC) eine Reindarstellung des Zielantigens möglich ist. Nach Auftrag steril filtrierter Kulturüberstände von MAP auf die IA-Säule konnte eine hohe Bindung des Antigens an das Immunosorbens festgestellt werden, eine effiziente Elution des gebundenen Materials war jedoch nicht möglich.

VII. Summary

Development and Application of poly- and monoclonal antibodies for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

This paper describes the development and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Bacterial preparations were inactivated by gamma irradiation. By immunizing rabbits and mice with this preparation, polyclonal and monoclonal antibodies (mAb) were obtained. Sensitivity and specificity, particularly intra-species and intra-genus reactivity, of the antibodies were determined by using a broad panel of different mycobacterial strains. For further antibody characterization different immunochemical methods were used. Due to the high affinity of the generated antibodies, detection limits up to 3×10^4 cfu/ml (rabbit antiserum) could be achieved by using the indirect EIA procedure. Similar sensitivities were found for the generated mouse monoclonal antibodies, mAb 8B2/1H and mAb 12G3, detection limits were 4.1×10^4 cfu/ml and 3×10^5 cfu/ml, respectively. However, specificity of the antibodies was limited, particularly the monoclonal antibodies showed a broad reactivity with other mycobacteria.

By immunoblot analyses it could be demonstrated, that the rabbit antiserum reacts with protein bands covering the range of < 14 kDa – 45 kDa, the main band was detected at approximately 9 – 11 kDa. Further on mAb 12G3 reacted with a 45 kDa MAP-protein while mAb 8B2/1H showed no reactivity in the immunoblot analysis. To better address the localization of the target antigens, viable MAP cells were analyzed by immunofluorescence techniques. In addition, cell-free supernatants and cell pellets were analyzed by EIA. In combination, the strong EIA-reactivity of the cell-free supernatant and the focal immunostaining of the cells indicate that the reactive antigen is loosely attached to the surface of MAP.

With respect to the desired identification of the MAP-protein, reactive with mAb 12G3, the usability of an immunoaffinity approach (IA) for the purification of the target antigen was tested. After applying cell-free MAP-supernatants to the IA-column, an excellent binding of the antigen to the immunosorbent could be observed. However, attempts failed to efficiently elute the bound protein from the IA column.

VIII. Literaturverzeichnis

- ALAJMI, A., KLEIN, G., GRABOWSKI, N. T., FOHLER, S., AKINEDEN, Ö. & ABDULMAWJOOD, A. 2016. Evaluation of a Commercial Real-Time PCR Kit for the Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Milk. *Current microbiology*, 73, 668-675.
- AUTSCHBACH, F., EISOLD, S., HINZ, U., ZINSER, S., LINNEBACHER, M., GIESE, T., LÖFFLER, T., BÜCHLER, M. & SCHMIDT, J. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut*, 54, 944-949.
- BAKLIEN, K. & BRANDTZAEG, P. 1976. Immunohistochemical characterization of local immunoglobulin formation in Crohn's disease of the ileum. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 11, 447-457.
- BANNANTINE, J., STABEL, J., LIPPOLIS, J. & REINHARDT, T. 2018. Membrane and Cytoplasmic Proteins of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis that Bind to Novel Monoclonal Antibodies. *Microorganisms*, 6, 127.
- BANNANTINE, J. P., LINGLE, C. K., STABEL, J. R., RAMYAR, K. X., GARCIA, B. L., RAEBER, A. J., SCHACHER, P., KAPUR, V. & GEISBRECHT, B. V. 2012. MAP1272c encodes an NlpC/P60 protein, an antigen detected in cattle with Johne's disease. *Clinical and vaccine immunology.*, 19, 1083-1092.
- BANNANTINE, J. P., RADOSEVICH, T. J., STABEL, J. R., BERGER, S., GRIFFIN, J. F. T. & PAUSTIAN, M. L. 2007a. Production and characterization of monoclonal antibodies against a major membrane protein of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clinical and vaccine immunology.*, 14, 312-317.
- BANNANTINE, J. P., RADOSEVICH, T. J., STABEL, J. R., SREEVATSAN, S., KAPUR, V. & PAUSTIAN, M. L. 2007b. Development and characterization of monoclonal antibodies and aptamers against major antigens of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clinical and vaccine immunology.*, 14, 518-526.
- BANNANTINE, J. P., STABEL, J., LAMONT, E., BRIGGS, R. E. & SREEVATSAN, S. 2011. Monoclonal antibodies bind a SNP-sensitive epitope that is present uniquely in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Frontiers in microbiology*, 2, 163.
- BANNANTINE, J. P., ZHANG, Q., LI, L.-L. & KAPUR, V. 2003. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. avium and *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis belies their divergent growth rates. *BMC microbiology*, 3, 10.
- BEARD, P., DANIELS, M., HENDERSON, D., PIRIE, A., RUDGE, K., BUXTON, D., RHIND, S., GREIG, A., HUTCHINGS, M. & MCKENDRICK, I. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of clinical microbiology*, 39, 1517-1521.
- BENEDICTUS, A., MITCHELL, R., LINDE-WIDMANN, M., SWEENEY, R., FYOCK, T., SCHUKKEN, Y. & WHITLOCK, R. 2008. Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in a dairy herd going through a control program. *Preventive veterinary medicine*, 83, 215-227.
- BENEDICTUS, G., DIJKHUIZEN, A. & STELWAGEN, J. 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Veterinary Record*, 121, 142-6.
- BERGER, S., HINZ, D., BANNANTINE, J. P. & GRIFFIN, J. F. T. 2006. Isolation of high-affinity single-chain antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis surface proteins from sheep with Johne's disease. *Clinical and vaccine immunology.*, 13, 1022-1029.

- BRENNAN, P. J. & NIKAIIDO, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry*, 64, 29-63.
- BULL, T. J., MCMINN, E. J., SIDI-BOUMEDINE, K., SKULL, A., DURKIN, D., NEILD, P., RHODES, G., PICKUP, R. & HERMON-TAYLOR, J. 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*, 41, 2915-2923.
- CAPSEL, R. T., THOEN, C. O., REINHARDT, T. A., LIPPOLIS, J. D., OLSEN, R., STABEL, J. R. & BANNANTINE, J. P. 2016. Composition and potency characterization of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis purified protein derivatives. *PloS one*, 11, e0154685.
- CAZES, J. 2004. *Encyclopedia of Chromatography 2004 Update Supplement*, S. 1182-1188, Crc Press, Florida
- CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J. & MERKAL, R. 1984a. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell veterinarian*, 74, 218-262.
- CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J., MERKAL, R. S., THAYER, W. R. & COUTU, J. 1984b. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*, 20, 966-971.
- CHO, D. & COLLINS, M. T. 2006. Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clinical and vaccine immunology*, 13, 1155-1161.
- CLARK, D., KOZICZKOWSKI, J., RADCLIFF, R., CARLSON, R. & ELLINGSON, J. 2008. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*, 91, 2620-2627.
- CLARKE, C. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, 116, 217-261.
- CLARKE, C. & LITTLE, D. 1996. The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *Journal of comparative pathology*, 114, 419-437.
- COCITO, C., GILOT, P., COENE, M., DE KESEL, M., POUPART, P. & VANNUFFEL, P. 1994. Paratuberculosis. *Clinical microbiology reviews*, 7, 328-345.
- COLLINS, M. T. 2003a. Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Irish Veterinary Journal*, 56, 565-574.
- COLLINS, M. T. 2003b. Update on paratuberculosis: 2. Pathology and diagnosis. *Irish Veterinary Journal*, 56, 619-623.
- COLLINS, M. T., GARDNER, I. A., GARRY, F. B., ROUSSEL, A. J. & WELLS, S. J. 2006. Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229, 1912-1919.
- COUSINS, D., WHITTINGTON, R., MARSH, I., MASTERS, A., EVANS, R. & KLUVER, P. 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and cellular probes*, 13, 431-442.

- COUSSENS, P. M. 2001. Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system. *Animal Health Research Reviews*, 2, 141-162.
- DE VOSS, J. J., RUTTER, K., SCHROEDER, B. G., SU, H., ZHU, Y. & BARRY, C. E. 2000. The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 1252-1257.
- DIJKHUIZEN, A., VAN SCHAİK, G., HUIRNE, R., KALIS, C. & BENEDICTUS, G. 1994. A cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Kenya Veterinarian*, 18, 219-221.
- DONAT, K., ERHARDT, G., SOSCHINKA, A. & BRANDT, H. 2014. Decreased serum protein associated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis shedding in German Holstein cows. *Veterinary Record*, 174, 10.1136.
- DRAPER, P. 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Frontiers in Bioscience*, 3, D1253-D1261.
- ENGLUND, S., BÖLSKE, G. & JOHANSSON, K. E. 2002. An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *FEMS microbiology letters*, 209, 267-271.
- EVERMAN, J. L., ECKSTEIN, T. M., ROUSSEY, J., COUSSENS, P., BANNANTINE, J. P. & BERMUDEZ, L. E. 2015. Characterization of the inflammatory phenotype of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis using a novel cell culture passage model. *Microbiology*, 161, 1420-1434.
- FACCIUOLO, A., KELTON, D. F. & MUTHARIA, L. M. 2013. Novel secreted antigens of Mycobacterium paratuberculosis as serodiagnostic biomarkers for Johne's disease in cattle. *Clinical and vaccine immunology*, 20, 1783-1791.
- FAHRLÄNDER, H., BIANCHI, L. & MIHATSCH, M. 1979. Die chronisch entzündlichen Darmkrankheiten. *Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für innere Medizin*, J.F. Bergmann-Verlag München 42, 1-111.
- PECTEAU, M.-E., WHITLOCK, R. H., BUERGELT, C. D. & SWEENEY, R. W. 2010. Exposure of young dairy cattle to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 51, 198.
- FELLER, M., HUWILER, K., STEPHAN, R., ALTPETER, E., SHANG, A., FURRER, H., PFYFFER, G. E., JEMMI, T., BAUMGARTNER, A. & EGGER, M. 2007. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 7, 607-613.
- FIRER, M. 2001. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49, 433-442.
- FRÖSSLING, J., WAHLSTRÖM, H., ÅGREN, E. C. C., CAMERON, A., LINDBERG, A. & LEWERIN, S. S. 2013. Surveillance system sensitivities and probability of freedom from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in Swedish cattle. *Preventive veterinary medicine*, 108, 47-62.
- FRY, M. P., KRUIZE, J. & COLLINS, M. T. 2008. Evaluation of four commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine paratuberculosis in Chilean dairy herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 329-332.
- GARCIA, A. & SHALLOO, L. 2015. Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of dairy science*, 98, 5019-5039.
- GERRARD, Z. E., SWIFT, B. M., BOTSARIS, G., DAVIDSON, R. S., HUTCHINGS, M. R., HUXLEY, J. N. & REES, C. E. 2018. Survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk. *Food microbiology*, 74, 57-63.

- GILMOUR, N., NISBET, D. & BROTHERSTON, J. 1965. Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. *Journal of comparative pathology*, 75, 281-286.
- GOBIN, J. & HORWITZ, M. A. 1996. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 1527-1532.
- GRANT, I. R. 2010. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in animal-derived foods and the environment. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. M. Behr and DM Collins, ed. CAB International, Cambridge, MA, 29-39.
- GRANT, I. R., BALL, H. J. & ROWE, M. T. 1998. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3153-3158.
- GRANT, I. R., BALL, H. J. & ROWE, M. T. 2002. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental microbiology*, 68, 2428-2435.
- GREEN, E., TIZARD, M., MOSS, M., THOMPSON, J., WINTERBOURNE, D., MCFADDEN, J. & HERMON-TAYLOR, J. 1989. Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic acids research*, 17, 9063-9073.
- HART, P. A. & YOUNG, M. 1991. Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *Journal of Experimental Medicine*, 174, 881-889.
- HOFFMANN, J., PREIß, J., AUTSCHBACH, F., BUHR, H., HÄUSER, W., HERRLINGER, K., HÇHNE, W., KOLETZKO, S., KRIEGLSTEIN, C. & KRUIS, W. 2008. S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease. Results of a German Evidence-based Consensus Conference]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 46, 1094-146.
- HOLMSTROM, A. Control of paratuberculosis in live cattle and semen imported to Sweden 1995-2004. The 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, 2005, 2005. IAP.
- HOSTETTER, J., STEADHAM, E., HAYNES, J., BAILEY, T. & CHEVILLE, N. 2003. Phagosomal maturation and intracellular survival of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in J774 cells. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 26, 269-283.
- HOWE, E. & HARDING, G. 2000. A comparison of protocols for the optimisation of detection of bacteria using a surface acoustic wave (SAW) biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 641-649.
- HURLEY, S. S., SPLITTER, G. A. & WELCH, R. A. 1988. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family Mycobacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38, 143-146.
- IVNITSKI, D., ABDEL-HAMID, I., ATANASOV, P. & WILKINS, E. 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 599-624.
- JOHNE, H. & FROTHINGHAM, L. 1895. A peculiar case of tuberculosis in a cow. *Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie*, 21, 438-455.

- 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. *American journal of veterinary research*, 62, 270-274.
- 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. *Journal of clinical microbiology*, 42, 1075-1081.
- KHOL, J. L., BRAUN, A. L., SLANA, I., KRALIK, P. & WITTEK, T. 2017. Testing of milk replacers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR and bacterial culture as a possible source for Johne's disease (paratuberculosis) in calves. *Preventive veterinary medicine*, 144, 53-56.
- KINDT, T. J., GOLDSBY, R. A., OSBORNE, B. A. & KUBY, J. 2007. *Kuby immunology*, Macmillan.
- KIRSNER, J. B. & SHORTER, R. G. 1982. Recent developments in nonspecific inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine*, 306, 775-785.
- KLEE, W. 1987. Paratuberkulose beim Rind: Diagnose und Bekämpfung. *Der praktische Tierarzt. Collegium veterinarium XVII*, 55-57.
- KLEE, W. 2002. Paratuberkulose (Johnesche Krankheit). *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*, 4, 586-591.
- KOETS, A., HOEK, A., LANGELAAR, M., OVERDIJK, M., SANTEMA, W., FRANKEN, P., VAN EDEN, W. & RUTTEN, V. 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*, 24, 2550-2559.
- KOETS, A. P., RUTTEN, V. P., DE BOER, M., BAKKER, D., VALENTIN-WEIGAND, P. & VAN EDEN, W. 2001. Differential Changes in Heat Shock Protein-, Lipoarabinomannan-, and Purified Protein Derivative-Specific Immunoglobulin G1 and G2 Isotype Responses during Bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection. *Infection and Immunity*, 69, 1492-1498.
- KÖRMENDY, B. 1994. The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds. *Veterinary microbiology*, 41, 117-125.
- LAMBRECHT, R. S. & COLLINS, M. T. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 15, 239-246.
- LANGER, V. 2012. *Nachweis von Legionella pneumophila in Luft und Wasser mittels Antikörper-Mikroarrays*. Dissertation, Technische Universität München.
- LARSEN, A., MERKAL, R. & VARDAMAN, T. 1956. Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, 17, 549.
- LIANG, G., MALMUTHUGE, N., GUAN, Y., REN, Y. & GRIEBEL, P. J. 2016. Altered microRNA expression and pre-mRNA splicing events reveal new mechanisms associated with early stage *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Scientific reports*, 6, 24964.
- LOVELL, R., LEVI, M. & FRANCIS, J. 1944. Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 54, 120-129.
- MAREK, J. 1910. Enteritis paratuberculosa. *Alltrorv Lapok*, 33, 504.
- MAST, S. B. 2016. *Nachweis von Alicyclobacillus acidoterrestris* Sporen in Fruchtsäften: Entwicklung und Charakterisierung von poly- und monoklonalen Antikörpern. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

- MAYER, R. 2018. *Molekularbiologischer Nachweis von Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis mit Fokus auf Milchproben*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- MCFADDEN, J., BUTCHER, P., CHIODINI, R. & HERMON-TAYLOR, J. 1987. Determination of genome size and DNA homology between an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease and other mycobacteria. *Microbiology*, 133, 211-214.
- MERKAL, R. & CURRAN, B. 1974. Growth and metabolic characteristics of Mycobacterium paratuberculosis. *Applied microbiology*, 28, 276-279.
- MILLAR, D., FORD, J., SANDERSON, J., WITHEY, S., TIZARD, M., DORAN, T. & HERMON-TAYLOR, J. 1996. IS900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3446-3452.
- MÖBIUS, P., LUYVEN, G., HOTZEL, H. & KÖHLER, H. 2008. High genetic diversity among Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *Journal of clinical microbiology*, 46, 972-981.
- MOMOTANI, E., WHIPPLE, D., THIERMANN, A. & CHEVILLE, N. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary pathology*, 25, 131-137.
- MORTIER, R. A., BARKEMA, H. W. & DE BUCK, J. 2015. Susceptibility to and diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: a review. *Preventive veterinary medicine*, 121, 189-198.
- MULISCH, M. 2013. *Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick*, S.3-10, Springer-Verlag, Schweiz
- MUTHARIA, L., MORENO, W. & RAYMOND, M. 1997. Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigens of Mycobacterium paratuberculosis with monoclonal antibodies. *Infection and immunity*, 65, 387-394.
- MUTHARIA, L. M., KLINCK, J., YAMAGUCHI, H. & DAVEY, M. 1998. Purification, characterization and immunochemical properties of a novel 60-kDa protein of Vibrio anguillarum strains. *FEMS microbiology letters*, 168, 111-117.
- NASER, S., FELIX, J., LIPING, H., ROMERO, C., NASER, N., WALSH, A. & SAFRANEK, W. 1999. Occurrence of the IS 900 gene in Mycobacterium avium complex derived from HIV patients. *Molecular and cellular probes*, 13, 367-372.
- NASER, S. A., GHOBRIAL, G., ROMERO, C. & VALENTINE, J. F. 2004. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *The Lancet*, 364, 1039-1044.
- NIELSEN, S. S. 2008. Transitions in diagnostic tests used for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infections in cattle. *Veterinary microbiology*, 132, 274-282.
- O'BRIEN, L. M., STEWART, L. D., STRAIN, S. A. & GRANT, I. R. 2016. Novel monoclonal antibody and peptide binders for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and their application for magnetic separation. *PloS one*, 11, e0147870.
- OLSEN, I., SIGURÐARDÓTTIR, Ó. & DJØNNE, B. 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle A review. *Veterinary quarterly*, 24, 12-28.
- ORTALO-MAGNE, A., DUPONT, M.-A., LEMASSU, A., ANDERSEN, A. B., GOUNON, P. & MAMADOU, D. 1995. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*, 141, 1609-1620.

- PAUSTIAN, M. L., ZHU, X., SREEVATSAN, S., ROBBE-AUSTERMAN, S., KAPUR, V. & BANNANTINE, J. P. 2008. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium avium* subspecies obtained from multiple host species. *BMC genomics*, 9, 135.
- RADOSEVICH, T. J., REINHARDT, T. A., LIPPOLIS, J. D., BANNANTINE, J. P. & STABEL, J. R. 2007. Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains K-10 and 187. *Journal of bacteriology*, 189, 1109-1117.
- RICHTER, G. 2003. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken*; S. 237-251, Georg Thieme Verlag.
- ROBERTSON, R. E., CERF, O., CONDRON, R. J., DONAGHY, J. A., HEGGUM, C. & JORDAN, K. 2017. Review of the controversy over whether or not *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis poses a food safety risk with pasteurised dairy products. *International dairy journal*, 73, 10-18.
- ROSSITER, C. A. & BURHANS, W. S. 1996. Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 12, 383-415.
- SANTEMA, W., VAN KOOTEN, P., HOEK, A., LEEFLANG, M., OVERDIJK, M., RUTTEN, V. & KOETS, A. 2011. Hsp70 vaccination-induced antibodies recognize B cell epitopes in the cell wall of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vaccine*, 29, 1364-1373.
- SAXEGAARD, F., BAESS, I. & JANTZEN, E. 1988. Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. *Apmis*, 96, 497-502.
- SCHRAUDER, A., AMMON, A., STARK, K., EULER, U., BRÄUNIG, J., WEISE, E. & FÜR RISIKOBEWERTUNG, B. 2003. Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis-eine Literaturstudie. *Broschüre des Robert Koch Instituts*
- SHIN, J. S., CHANG, Y.-F., HUANG, C., ZHU, J., HUANG, L., HAN, S. Y., SHIN, K.-S., STEHMAN, S., SHIN, S. J. & TORRES, A. 2004. Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in culture. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16, 116-120.
- SHINNICK, T. & GOOD, R. 1994. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 884-901.
- STABEL, J. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, 77, 465-473.
- STABEL, J. R., WELLS, S. J. & WAGNER, B. A. 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 85, 525-531.
- STELMASZYK, K. 2014. *Synthese und Untersuchung artifizieller tripodaler Catechol-Siderophore*, epubli.
- STEPHAN, R. 2007. Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2, 222-227.
- STEVENSON, K. 2010. Comparative differences between strains of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Paratuberculosis: organism, disease, control*, 126-137.
- SWEENEY, R. W. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 12, 305-312.
- TASARA, T. & STEPHAN, R. 2005. Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in milk. *Applied and environmental microbiology*, 71, 5957-5968.

- TWORT, F. 1912. A method for isolating and cultivating the mycobacterium enteritidis chronicæ pseudotuberculosis bovis, Jöhne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovines. *Proceedings of the Royal Society of London. B*, 84, 517-542.
- VAN, A. D., HOSSAIN, M., GUMUSBOGA, M. & RIEDER, H. 2008. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 12, 108-110.
- WANG, J., MOOLJI, J., DUFORT, A., STAFFA, A., DOMENECH, P., REED, M. B. & BEHR, M. A. 2016. Iron Acquisition in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Journal of bacteriology*, 198, 857-866.
- WELLS, S. J., COLLINS, M. T., FAABERG, K. S., WEES, C., TAVORNPANICH, 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. *Clinical and vaccine immunology.*, 13, 1125-1130.
- WENTINK, G., BONGERS, J., ZEEUWEN, A. & JAARTSVELD, F. 1994. Incidence of paratuberculosis after vaccination against M. paratuberculosis in two infected dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 41, 517-522.
- WHIPPLE, D. L., CALLIHAN, D. R. & JARNAGIN, J. L. 1991. Cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3, 368-373.
- WHITLOCK, R. Laboratory diagnosis of Johne's disease. Proceedings of the 3rd International colloquium on paratuberculosis. Orlando, 1991. 1-11.
- WHITLOCK, R. H. & BUERGELT, C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 12, 345-356.
- WHITMAN, W. B., GOODFELLOW, M. & KÄMPFER, P. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*, Springer New York.
- WHITTINGTON, R. 2010. 22 Cultivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Organism, Disease, Control*, 244.
- WHITTINGTON, R. J. & WINDSOR, P. A. 2009. In utero infection of cattle with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a critical review and meta-analysis. *The Veterinary Journal*, 179, 60-69.
- WIESCHER, F. M. M. 2013. *Produktion von poly-und monoklonalen Antikörpern gegen Staphylococcus aureus, Bacillus cereus und Sporen von Bacillus cereus zur Entwicklung eines bioaffinitätschromatographischen Schnellnachweises*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- WILLEMSSEN, P. T., WESTERVEEN, J., DINKLA, A., BAKKER, D., VAN ZIJDERVELD, F. G. & THOLE, J. E. 2006. Secreted antigens of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as prominent immune targets. *Veterinary microbiology*, 114, 337-344.
- WU, C.-W., GLASNER, J., COLLINS, M., NASER, S. & TALAAT, A. M. 2006. Whole-genome plasticity among Mycobacterium avium subspecies: insights from comparative genomic hybridizations. *Journal of bacteriology*, 188, 711-723.
- YOSHIMURA, H. H. & GRAHAM, D. Y. 1988. Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 26, 1309-1312.

IX. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau der Zellwand von Mykobakterien	4
Abbildung 2	Regionale Verteilung der in Deutschland gemeldeten Paratuberkulose Fälle im Jahr 2017	14
Abbildung 3	Kultivierung von MAP auf HEYM-Agar	26
Abbildung 4	Kultivierung von MAP in Middlebrook 7H9 Medium	27
Abbildung 5	Vergleichende Darstellung der gegen MAP-Zellen bei Kaninchen I und II im Verlauf der Immunisierung nachweisbaren IgM- bzw. IgG Antikörper-Titer	36
Abbildung 6	Deutlich erkennbarer Abfall der IgM-vermittelten Immunantwort des Kaninchens II zwischen der ersten Blutentnahme und der Endabnahme	36
Abbildung 7	Nachweisbare IgG-Antikörper gegen MAP-Zellen in den Seren von Kaninchen I.	37
Abbildung 8	Vergleichender IgG-Titer der bei der 1. Blutentnahme (Woche 7) und am Ende der Immunisierung (Woche 23) gewonnenen Seren von Kaninchen II	38
Abbildung 9	Reaktivität des Antiserums (Endabnahme) von Kaninchen II mit unterschiedlichen Medien- und Präparationsbestandteilen	39
Abbildung 10	IgM-basierte relative Affinität der MAP-spezifischen Kaninchenantisera.	41
Abbildung 11	IgG-basierte relative Affinität der MAP-spezifischen Kaninchenantisera.	42
Abbildung 12	Reaktivität des Kaninchenantisera II mit frischen in M7H9-Medium kultivierten MAP-Präparationen.	45
Abbildung 13	Reaktivität des Kaninchenantisera mit einer MAP-Präparation (DSM 44135) im Immunoblot.	46
Abbildung 14	Lokalisation EIA-reaktiver MAP-Antigenstruktur nach Abtrennung des Zellpellets bei autoklavierten und bestrahlten MAP-Präparationen	47
Abbildung 15	Immunoblot-Reaktivität einer MAP-Präparation (DSM 44135) vor (Originalprobe) bzw. nach Verdau mit Proteinase K	48

Abbildung 16	Durchlicht bzw. Fluoreszenzaufnahme von mit Kaninchenantiserum beladenen Beads	49
Abbildung 17	Deutliche Koloniebildung auf den M7H10 Platten der Milchausstriche	50
Abbildung 18	Prozentualer Anteil der in den unterschiedlichen Überständen und Waschlösungen rückgewonnenen Keime/ml	51
Abbildung 19	Reaktivität von mAk 8B2/1H bzw. 12G3 im indirekten EIA.	54
Abbildung 20	Reaktivitätsmuster verschiedener monoklonaler Antikörper	55
Abbildung 21	Reaktivität von mAk 8B2/1H und 12G3 mit den zur Immunisierung verwendeten MAP-Stämmen (DSM 44133, DSM 44135, MS-4 Feldstamm)	56
Abbildung 22	Nachweisbarkeit von MAP-Isolaten (autoklavierte Präparationen) im indirekten EIA bei Verwendung des mAk 12G3	57
Abbildung 23	Nachweisbarkeit von MAP-Isolaten (autoklavierte Präparationen) im indirekten EIA bei Verwendung des mAk 8B2/1H	57
Abbildung 24	Relative Verteilung der mit mAk 8B2/1H bzw. 12G3 nachweisbaren Zielantigene auf Zellpellet und zellfreiem Überstand	59
Abbildung 25	Relative Reaktivität von autoklavierten MAP-Präparationen verschiedener MAP-Isolate und daraus gewonnener zellfreier Überstände im auf mAk 8B2/1H basierenden indirekten EIA	60
Abbildung 26	Relative Reaktivität von autoklavierten MAP-Präparationen verschiedener MAP-Isolate und daraus gewonnener zellfreier Überstände im auf mAk 12G3 basierenden indirekten EIA	61
Abbildung 27	Relative Reaktivität frischer, steril filtrierter Überstände von MAP (Referenzstämme und FLI-Isolate) mit mAk 12G3	62
Abbildung 28	Rest-Reaktivität der beiden mAk 8B2/1H bzw. 12G3 mit Proteinase K verdauten MAP-Präparationen	63
Abbildung 29	Immunoblot nach PK-Verdau im Vergleich zu unverdauten Originalproben mit mAk 8B2/1H und mAk 12G3	64
Abbildung 30	Reaktivität der beiden monoklonalen Antikörper in der Immunfluoreszenz mit lebenden MAP (DSM 44135)	65

Abbildung 31	Bilanzierung der zur IA-Anreicherung des mit mAk 12G3 reaktiven Proteins durchgeführten Versuche	66
Abbildung 32	Immunoblot-Analysen der bei der IA-Reinigung des mit mAk 12G3 reaktiven Proteins anfallenden Fraktionen	67

X. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Die vier Stadien der Paratuberkulose-Erkrankung	9
Tabelle 2	Im Laufe der vorliegenden Arbeit verwendete MAP-Isolate	24
Tabelle 3	Für die Überprüfung der Intra-Genus Reaktivität der gewonnenen Antikörper verwendete Mykobakterien	25
Tabelle 4	Vergleich der beiden unterschiedlichen Immunogen-Präparationen	34
Tabelle 5	Immunisierungsschema von Kaninchen mit MAP	35
Tabelle 6	Nachweisbarkeit von 19 verschiedenen MAP-Isolaten bzw. Stämmen im indirekten EIA unter Verwendung des Kaninchenantiserums II	43
Tabelle 7	Nachweisbarkeit schnellwachsender Mykobakterien im indirekten EIA unter Verwendung des Kaninchenantiserums II (Endabnahme)	44
Tabelle 8	Immunisierungsschema von Mäusen (2. Ansatz) mit MAP-Keimen	52
Tabelle 9	Reaktivität und Nachweisgrenze der monoklonalen Antikörper 8B2/1H und 12G3 mit autoklavierten Bakterienpräparationen schnellwachsender Mykobakterien	58

XI. Danksagung

Großer Dank gilt an erster Stelle Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die Überlassung dieses aktuellen und interessanten Themas. Ich habe mich sehr gefreut am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch promovieren zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Dietrich bedanken. Vielen Dank, Ritchie, dass ich mich auch in so manch schwieriger Situation der letzten zwei Jahre immer auf deine Kompetenz, dein Wissen und nicht zuletzt auf eine Portion Humor verlassen konnte.

Mein herzlichster Dank gilt auch Brunhilde Minich. Vielen Dank, liebe Bruni, dass du dir immer Zeit für mich genommen hast wenn ich mal wieder "eine ganz kurze Frage" hatte.

Außerdem möchte ich mich bei Franziska Faber, Stephanie Straßner, Gaby Acar, Nele Maxseiner, Maja Elsner und Julia Schmidt für ihre Hilfsbereitschaft und liebenswerte Art bedanken. Schön war's mit euch!

Des Weiteren danke ich allen anderen Mitarbeitern und Mitdoktoranden am Lehrstuhl für die gemeinsame Zeit, die vielen fröhlichen Momente und die Unterstützung.

Vielen Dank, Ricarda. Für die lustigen Zeiten im Büro und die Mittagspausen am Sonnenbänkchen. Ich werde mich immer gerne an unsere gemeinsame Bürozeit erinnern.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ihr habt mich in jeder Phase meines Lebens so wunderbar unterstützt und immer an mich geglaubt. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit - und vieles mehr- nie möglich gewesen. Ich kann euch nicht genug danken!

Vielen, vielen Dank, lieber Christian. Dafür, dass du mir durch deinen Optimismus, deine Ruhe und deinen Humor immer wieder neue Kraft gibst. Ich bin so glücklich, dich an meiner Seite zu haben.