

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Kurt Pfister

**Effekte von Speicheldrüsenprodukten der Schildzecke  
*Amblyomma variegatum* auf die Immunantwort von Zebu- und  
Somba- Rindern in Togo: eine Feldstudie**

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

Von Gesine Feldmann  
aus Neunkirchen/ Saar

**München 2014**

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Kurt Pfister

**Korreferent/ en:** Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Klee

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fragestellung und Ziele der Arbeit</b>	<b>2</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Zecken</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Die Schildzecke <i>Amblyomma variegatum</i></b>	<b>4</b>
<b>2.3. Speicheldrüsenprodukte (SGE)</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Immunreaktion</b>	<b>11</b>
<b>2.5. Rinderrassen</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Untersuchungsgebiet und Untersuchungszeitraum</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Tiere</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Methoden</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien</b>	<b>29</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
<b>4.1. Zelluläre Immunantwort</b>	<b>32</b>
<b>4.2. Blutbild</b>	<b>38</b>
<b>4.3. Parasitenspezifische Immunglobuline</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Parasitologische Untersuchung der Blutausstriche</b>	<b>42</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Zelluläre Immunantwort</b>	<b>44</b>
<b>5.2. Blutbild</b>	<b>52</b>
<b>5.3. Parasitenspezifische Immunglobuline</b>	<b>54</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>

<b>7. SUMMARY</b>	<b>58</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>9. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>	<b>72</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b>	<b>74</b>

## **1. Einleitung**

In Afrika südlich der Sahara stellt der Komplex von Zecken und der von ihnen übertragenen Krankheiten (Tick borne diseases, TBD) wie Anaplasmosis, Babesiose, Cowdriose und anderen mit Zecken assoziierten Krankheiten wie Dermatophilose (Morrow et al., 1993) zusammen mit der Trypanosomose die größte von Parasiten ausgehende Bedrohung für die Tierproduktion dar (Jongejan, 1994) und beschränkt zudem die Einfuhr exotischer Hochleistungstiere zur Steigerung der Produktivität.

Die Erreger vieler der weltweit wichtigsten Infektionskrankheiten, einschließlich Malaria, Filariose, Trypanosomose, Leishmaniose und Lyme Disease, werden durch Zecken und andere blutsaugende Arthropoden wie Stechmücken, Tsetsefliegen, Sandfliegen übertragen (Beaty und Marquardt, 1996). Von allen blutsaugenden Arthropoden übertragen Schildzecken die größte Vielfalt an Pathogenen (Sonenshine, 1991).

Mittlerweile werden blutsaugende Arthropoden nicht mehr nur für „fliegende oder krabbelnde Spritzen“ (Wikle, 1996; Wikle & Alarcon-Chaidez, 2001) gehalten. Der Speichel, der zusammen mit Pathogenen injiziert wird, enthält verschiedene Faktoren, die Gerinnungs-, Entzündungs- und Immunreaktionen des Wirtes beeinflussen.

Durch den sehr langen Saugakt, der Tage bis Wochen dauern kann und damit einzigartig unter den Ektoparasiten ist, bieten Zecken eine gute Angriffsfläche für die Immunantwort des Wirtes. Diese kann entweder unspezifisch durch Angriff von Neutrophilen auf die Mundwerkzeuge erfolgen (Wheeler et al., 1989) oder spezifisch durch T- und B- Zellen (Wikle, 1984; Whelen und Wikle, 1993; Borsky et al., 1994; Mbow et al., 1994, Ganapamo et al., 1997). Oft ist diese Immunantwort gegen die Speicheldrüsen gerichtet und führt zu verminderter Blutaufnahme und letztendlich zur Abstoßung der Zecken. Im Gegenzug besitzen Zecken im Speichel antiinflammatorische und immunsuppressive Substanzen, die die Funktion der Neutrophilen hemmen (Ribeiro et al., 1990, Guo et al., 2009), mit dem Komplementsystem interferieren (Ribeiro et al., 1987b), natürliche Killerzellen und Makrophagen beeinflussen (Ramachandra und Wikle 1992, 1995; Kubes et al. 1994; Urioste et al. 1994; Ferreira und Silva 1998; Kopecky und Kuthejlova 1998; Kramer et al., 2011) oder die Proliferation der T-Zellen hemmen und in die Zytokinproduktion eingreifen (Wikle, 1996; Hajnická et al., 2005).

Insgesamt bedeutet dies, dass die gemeinsame Evolution von Zecken, ihren Wirten und Pathogenen auch durch immunsupprimierende Faktoren im Zeckenspeichel gesteuert wurde

(Randolph, 1994). Zecken mit solchen Faktoren waren erfolgreicher bei Nahrungsaufnahme und Vermehrung, ebenso waren durch sie übertragene Pathogene erfolgreicher im Infizieren eines Wirtes und sicherten dadurch ihre Verbreitung.

In weiten Teilen von West- und Zentralafrika, so auch in Togo, gilt *Amblyomma variegatum* als eine der häufigsten und bedeutendsten Zeckenarten. Über die immunologischen Vorgänge bei der Konstellation *A.variegatum*- afrikanische Rinderrassen ist dennoch bisher wenig bekannt.

### 1.1. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Für einen Großteil der ärmeren Bevölkerungsgruppen in afrikanischen Ländern hängt das Leben von der Tierhaltung ab. Nutztiere bedeuten für sie Ernährungs- und Einkommenssicherung und haben darüber hinaus hohen kulturellen Stellenwert, Tierkrankheiten bedrohen somit unmittelbar die Lebensgrundlage. Zecken sind die häufigsten Schadarthropoden und zugleich Vektoren für Krankheitserreger der Haus- und Nutztiere im tropischen Afrika, daher haben sie weitreichende Auswirkungen auf Tierproduktion und Tiergesundheit und somit auf Gesundheit und Überleben der Menschen.

Neue Strategien zu einer nachhaltigen Zeckenbekämpfung und gleichzeitig auch der TBD erscheinen also angezeigt, nicht zuletzt wegen der zunehmenden Resistenzen gegen kommerziell erhältliche Akarizide. Dafür ist jedoch ein umfassendes Verständnis der biologischen Feinheiten der Vektor-Wirt-Interaktion notwendig.

Obwohl *A. variegatum* eine der wichtigsten Zecken der Rinder in Afrika ist, liegen bisher kaum Untersuchungen über diese spezielle Parasit-Wirt-Beziehung vor. Ergebnisse aus Versuchen mit anderen Zeckenarten und anderen Säugetierwirten können nicht direkt übertragen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen wurden im Jahr 2004 in Togo, Westafrika, als Feldversuch an zwei verschiedenen einheimischen Rinderrassen mit natürlicher Exposition gegenüber *A. variegatum* durchgeführt. Dabei sollte geklärt werden, ob auch durch Speicheldrüsenprodukte von *A. variegatum* Veränderungen im Sinne einer Immunsuppression entstehen, wie bereits für andere Zeckenarten beschrieben wurde. Hierzu wurden anhand von T-Zell-Proliferation, Zytokinproduktion und Antikörperproduktion Aspekte der zellulären sowie der humoralen Immunabwehr betrachtet. Besonderer Fokus wurde auf Unterschiede

## *Einleitung*

---

zwischen den einheimischen Rinderrassen Somba und Zebu gelegt, um eventuelle Dispositionen und damit die Eignung verschiedener Rassen herausstellen zu können.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Zecken

Zecken (Ixodida) sind obligat hämatophage Ektoparasiten warmblütiger Wirbeltiere. Es existieren ca. 860 Arten, die sich in die zwei großen Familien der Ixodidae (Schildzecken) und Argasidae (Lederzecken) und die unbedeutende Familie der Nutalliidae aufspalten. Lederzecken treten vorrangig bei Vögeln auf. Die Schildzecken mit den Gattungen *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* und *Boophilus* parasitieren auf Säugetieren mit jeweils unterschiedlich breitem Wirtsspektrum. Sie verursachen lokale Läsionen an der Stichstelle, Entzündungsreaktionen und Nekrosen, systemische Effekte (Toxikosen, Zeckenparalysen) und sind darüber hinaus vor allem als Vektoren von Viren, Rickettsien, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Nematoden von Bedeutung.

### 2.2. Die Schildzecke *A. variegatum*

(engl: tropical bont tick)

Die Gattung *Amblyomma* zählt ca. 100 Arten, von denen die wichtigsten, wie auch *A. variegatum*, in tropischen oder subtropischen humiden Regionen in Afrika südlich der Sahara und in der Neuen Welt vorkommen. Alle *Amblyomma*- Arten sind dreiwirtig.

Wie andere ursprüngliche, wenig an ihre Wirte angepasste Zecken besitzt auch *A. variegatum* lange und starke Mundwerkzeuge, mit ihrem langen Hypostom verankern sie sich tief in der Dermis. Das 2. Segment der zur Orientierung dienenden Pedipalpen ist charakteristischerweise doppelt so lang wie breit. Alle *Amblyomma*- Arten besitzen Augen, an der Hinterseite des Rückenschildes sind girlandenartige Randschildchen sichtbar, die Analfurche verläuft kaudal des Anus. Es existiert ein ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus: bei den Weibchen ist der Schild klein und das nicht vom Schild bedeckte Opisthosoma von brauner bis dunkelgrüner Färbung, die Männchen dagegen tragen einen bunt ornamentierten Rückenschild und haben keine Ventralplatten. Nüchterne Zecken beiderlei Geschlechts sind ca. 7-9 mm lang, Weibchen erreichen im vollgesogenen Zustand Größen bis zu 20 mm (Eckert et al., 2005).

*A. variegatum* ist die häufigste Zecke der Rinder in subhumiden und humiden Zonen von Westafrika (Konstantinov, 1990; Gueye, 1993). Sie gilt in Afrika als eine der schädlichsten Zecken (Yonow 1995).

### **2.2.1. Geographische Verbreitung**

*A. variegatum* tritt in Afrika südlich der Sahelzone auf (Walker und Olwage 1987), das Verbreitungsgebiet erstreckt sich quer über den Kontinent von Senegal über West- und Zentralafrika, Südsudan und Äthiopien bis Nordwestsomalia. In großen Teilen des Horns von Afrika einschließlich eines Großteils von Somalia, Südostäthiopien und Nordkenia existiert *A. variegatum* wegen der zu starken Trockenheit nicht, ist aber in Tansania, Ruanda, Burundi, Malawi, Sambia und Ostangola weit verbreitet. In Südafrika, Namibia, Botswana, Simbabwe und Mozambique kommt sie nicht vor.

Außerhalb Afrikas existiert *A. variegatum* im Jemen und wurde außerdem mit dem Import von Rindern nach Madagaskar, erstmals erwähnt von Neumann (1899), und auf die Inseln im Indischen Ozean (Komorische Inseln, Réunion, Mauritius) eingeschleppt (Walker und Olwage, 1987).

1828 wurde *A. variegatum* durch den Import infester Rinder aus Senegal nach Guadeloupe in die Karibik eingeführt, wo sie sich im Laufe des 19. und 20. Jahrhunderts auf weitere karibische Inseln ausbreitete. Damit droht nun dem Festland Nord-, Zentral- und Südamerikas die Einschleppung der Zecke und besonders des durch sie übertragenen Bakteriums *Ehrlichia ruminantium*, dem Erreger der Cowdriose (Herzwasser). Von den klimatischen Bedingungen sind Florida, der Golf von Mexiko, Mittelamerika, die karibischen Inseln und die Atlantikküste Südamerikas bis nach Uruguay für die Ausbreitung von *A. variegatum* geeignet (Sutherst und Maywald, 1985). Neben dem Viehverkehr spielen auch Zugvögel, besonders der Kuhreiher als Überträger von Larven und Nymphen eine wichtige Rolle für die Ausbreitung von *A. variegatum* (Barré et al., 1995).

### **2.2.2. Biotop und Klima**

Das natürliche Habitat, in dem *A. variegatum* die bei weitem häufigste Zecke der großen Wild- und Haustiere darstellt, sind die tropische Buschsavanne der Nord- und Südsudanzone und die subäquatoriale Buschsavanne der Guinea-Zone. In ariden Gegenden kommt *A. variegatum* nicht vor, wird aber in semiariden und humiden Gegenden vorgefunden und

besetzt dort viele verschiedene Habitat-Typen: baum- und buschbestandene Flächen (Morel, 1969; Walker, 1974), kultivierte Steppe ebenso wie Grassteppen mit dichtem Grasbewuchs (Yeoman, 1968). In der Dornsavanne der Südsahel- und Sahel-Sudanzone ist *A. variegatum* an bewaldeten Flussufern und in Überschwemmungszonen vorhanden. Auch das bewaldete Hochland von Nordsomalia (Pegram 1976) und der Äquatoriale Regenwald (Elbl and Anastos, 1966) werden erwähnt, dort besetzt *A. variegatum* als eingeschleppter, nicht originärer Parasit nur die Lichtungen (Morel, 1969).

*A. variegatum* wird von Meereshöhe bis auf 2590 m angetroffen (Walker, 1974). Ein minimaler jährlicher Niederschlag von 400-750 mm über 3-4 Monate scheint notwendig zu sein, ein maximaler Niederschlag von 2050 bis 2800 mm p.a. wird geduldet (Morel, 1969; Walker, 1974; Paine, 1982). Das saisonale Vorkommen ist regional unterschiedlich und fällt mit der Regenzeit zusammen.

### 2.2.3. Entwicklungszyklus

*A. variegatum* ist eine dreiwirtige Zecke.

Die Embryogenese dauert unter experimentellen Bedingungen bei 25-27°C etwa 53 Tage, die Entwicklung zur Nymphe 14 Tage und zum Adulten 19 Tage (Hoogstraal, 1956). Unter Feldbedingungen sind diese Zeiten stark von der Außentemperatur abhängig, in der Regel entwickelt sich in der Sudansavanne Westafrikas mit nur einer Regenzeit eine Generation pro Jahr (Morel, 1969).

Der Saugakt der adulten Weibchen dauert im Mittel 12 Tage, der der Nymphen und Larven 5 Tage. Saugakt und Eiablage der Weibchen finden während der Regenzeit statt. Erst zu Anfang der Trockenperiode im November und Dezember zeigen sich die Larven auf den Wirtstieren (Theiler 1962), ein massives Auftreten von Nymphen erfolgt von Januar bis April. Zu Ende der Trockenzeit sind ab Ende Februar die ersten adulten Zecken vorhanden, die Männchen etwas früher als die Weibchen; sie verbleiben während der Trockenzeit im Schutz des Bodens und erscheinen erst mit dem Anstieg der Luftfeuchtigkeit nach dem ersten starken Regen. Das Auftreten auf den Tieren wird somit erst im Juni sichtbar (Morel, 1969; Tatchell und Easton, 1986).

In Regionen mit zwei Regenzeiten (äquatoriales Klima) kommen pro Jahr zwei oder drei Generationen von *A. variegatum* zur Entwicklung. Hier überlagern sich die Generationszyklen und sind nicht so deutlich abgegrenzt (Morel, 1969).

## 2.2.4. Wirtsspektrum und Wirtsfindung

*A. variegatum* gehört zu den „Jägern“ unter den Zecken, d.h. die Zecken orten ihre Wirte über eine Entfernung von bis zu fünf Metern mit Hilfe des Hallerschen Organs, das chemische und physikalische Signale wie volatile Substanzen ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , Pheromone, Buttersäure, Ammoniak usw.) oder Vibrationen wahrzunehmen vermag, und suchen sie aktiv auf.

Wegen ihres sehr breiten Wirtsspektrums ist ihre Verbreitung nicht von der Anwesenheit geeigneter Wirte abhängig, was an der sehr weiten Verbreitung in Afrika deutlich wird.

*A. variegatum* gilt in weiten Bereichen Afrikas als eine der bedeutendsten Zecken bei Rindern, welche auch die bevorzugten Wirte sind. Adulte Zecken werden auch auf Ziegen, Schafen, Kamelen, Pferden, Eseln, Hunden, Katzen und Schweinen gefunden, vor allem aber auf mittelgroßen und großen Herbivoren.

Nymphen werden auf allen Haustieren gefunden. Schafe und Ziegen sollen für diese besser als Wirte geeignet sein als für adulte. Larven befallen Schafe, Ziegen und Rinder. Unreife Stadien leben auch auf Eidechsen, Vögeln und Säugern, darunter auch Kleinsäuger und Primaten. Auch Menschen werden hauptsächlich von Nymphen befallen. (Walker, 1974; Hoogstraal und Aeschlimann, 1982).

Bevorzugte Ansatzstellen von Adulten und Nymphen sind die gesamte ventrale Körperregion einschließlich Triel, Unterbrust, Bauchregion, Achsel- und Genitalbereich. Nymphen finden sich auch an den Gliedmaßen. Larven scheinen die von den Adulten bevorzugten Regionen zu meiden und saugen häufig an Kopf, Ohren, Hals, Rücken und Kruppe (Walker, 1974; Hoogstraal and Aeschlimann, 1982).

Generell werden Körperregionen mit weicher Haut stärker befallen, ebenso für das Wirtstier schlecht erreichbare Bereiche. Die Zecken erreichen ihr Wirtstier während des Weidens über die Beine, v.a. über den Zwischenklauenspalt, wo sie sich auch vorübergehend festsaugen. Erst während der Ruhezeiten der Tiere, hauptsächlich nachts, bewegen sich die Zecken zu ihren bevorzugten Körperregionen, wobei viele Zecken wieder verschwinden. Für diese Wanderung sind männliche Pionierzecken von Bedeutung, die nach Befestigung an den Prädilektionsstellen Pheromone produzieren. Dieses Verhalten der Zecken bietet eine Möglichkeit zur wirksamen Akarizidbehandlung mittels Fußbädern, bei traditionellen Haltungsformen z.B. abends, bevor die Tiere sich im Nachtpferch niederlegen (Stachurski, 2000).

## 2.2.5. Schadwirkung

*A. variegatum* verursacht wegen ihrer langen Cheliceren und ihres langen Hypostoms, mit dem sie sich tief in der Dermis verankert, schmerzhafte Hautläsionen (Blutungen, Entzündungen, Nekrosen, Ulzera und Granulome) und führt daher schon per se zu Leistungseinbußen (Milch, Fleisch, Lederschäden). Im Bereich von Euter und Zitzen, einer der Hauptansatzstellen, werden Verletzungen verursacht, die das Saugen der Kälber erschweren oder unmöglich machen und dadurch das Überleben der Kälber bedrohen (Asselbergs und Pereira, 1989; Uilenberg, 1990).

Pegram und Oosterwijk (1990) und Stachurski (1993) geben den Gewichtsverlust bei einheimischen afrikanischen Rindern unter *A. variegatum*-Befall mit 46-63 g pro Zecke an, wobei auch männliche Zecken nachteilige Auswirkungen auf die Gewichtszunahmen der Rinder hatten (Pegram und Oosterwijk, 1990). Durch Akarizidbehandlungen konnten verbesserte Zunahmen erzielt werden (De Castro, 1997). Milchverluste lagen bei Sanga-Zebus in einer Größenordnung von 9 g pro *Rhipicephalus annulatus*- Weibchen (Norval et al., 1997b), hierzu existieren keine Daten von *A. variegatum*.

Durchschnittliche Befallsraten mit *A. variegatum* liegen bei bis zu 75 Zecken pro Tier mit Maximalwerten von über 400 Zecken (Tatchell und Easton, 1986). Koney et al. (1994a) berichten in Ghana bei Zebus von 27 Zecken und bei N'Dama von 8 Zecken pro Tier im saisonalen Durchschnitt, bei Holstein-Friesian unter den gleichen Bedingungen von bis zu 140 Zecken. Bei massivem Befall kann ein Blutverlust bis zur Anämie auftreten.

## 2.2.6. Vektorfunktion, übertragene Krankheitserreger

Für *E. ruminantium*, den Erreger der Cowdriose, ist *A. variegatum* aufgrund der effizienten Übertragung und der weiten Verbreitung der hauptsächliche Vektor (Walker and Olwage 1987).

Weiterhin überträgt *A. variegatum* *Theileria mutans*, den Erreger der milden bovinen Theileriose. Bei hochgradigen Parasitämien kann es zu Anämie, Ikterus und vereinzelten Todesfällen kommen.

*A. variegatum* gilt als Wegbereiter für die bakterielle Hautkrankheit Dermatophilose, da die Hautverletzung durch den Stich die Inokulation des Erregers *Dermatophilus congolensis* ermöglicht und eventuell durch eine durch *A. variegatum* induzierte Immunsuppression die Ausbreitung begünstigt wird (Koney et al., 1994b).

Neben anderen Zecken kann auch *A. variegatum* die Nairobi Sheep Disease, eine Bunyaviruserkrankung (Arbovirus) übertragen.

### 2.2.7. Bekämpfungsstrategien

Als traditionelle Verfahren zur Zeckenbekämpfung werden Akarizide, v.a. Pyrethroide (Flumethrin), angewendet. Die Behandlung kann in Form von Pour-On-Behandlungen, Ohrmarken, Sprühverfahren, Fußbädern oder Tauchbädern durchgeführt werden. Ihr Erfolg ist von der Regelmäßigkeit der Behandlungen abhängig und wird zunehmend von Resistzenzen der Zecken beeinträchtigt. Weitere Einschränkungen stellen Rückstandsproblematik, Toxizität und Umweltbelastung dar.

Maßnahmen wie Rotationsbeweidung, Abbrennen oder Umbrechen der Weiden zielen auf am Boden ruhende Stadien ab und sind angesichts der langen Zeiten, die die Zecken ohne Nahrung auszuhalten vermögen, von begrenzter Wirksamkeit.

Eine Bekämpfungsstrategie auf immunologischer Basis stellt eine Impfung gegen Zeckenantigene dar, wie sie gegen verschiedene andere Zeckenspezies, nicht jedoch gegen *A. variegatum* entwickelt wurde (Merino et al., 2013). So können Impfstoffe gegen „exponierte“ Antigene (*exposed antigens*), die während des Saugaktes an den Wirt abgegeben werden, eingesetzt werden. Ein gereinigtes Protein aus der Zementsubstanz, mit der Zecken ihre Mundwerkzeuge in der Haut ihrer Wirte verankern, von *A. americanum* bewirkte eine speziespezifische Resistenz (Brown, Askenase 1986), bei verschiedenen *Rhipicephalus*- Arten zeigten sich partielle Resistenz und Kreuzresistenzen (Shapiro et al., 1989). Ein rekombinanter Impfstoff gegen *R. microplus* richtet sich gegen sogenannte „verborgene“ Antigene (*concealed antigens*) in der Darmwand der Zecken. Die Zielantigene sind für Antikörper oder Effektorzellen des Wirtes zugängig, es kann aber kein immunologischer Selektionsdruck auf den Parasiten entstehen und sich keine Evasionsstrategie entwickeln, weil der Wirt mit den Antigenen des Parasiten unter natürlichen Bedingungen nicht konfrontiert wird (Willadsen und Kemp, 1988).

Ein rekombinantes Zementprotein von *R. appendiculatus* zeigte eine verbesserte Wirkung, indem es sich gegen exponierte und verborgene Antigene richtet. Es induzierte sowohl eine kutane Entzündungsreaktion als auch erhöhte Antikörpertiter (Trimnell et al., 2002, 2005; Merino et al., 2013). Dies stellt eine sich selbst erhaltende Strategie der Zeckenbekämpfung dar, weil durch natürliche Infestationen eine Auffrischung stattfindet (Frisch 1999; Willadsen

und Jongejan, 1999). Wegen seiner Kreuzreaktivität kann es als Breitspektrum-Vakzine gegen *A. variegatum*, *R. appendiculatus*, *R. microplus* und *I. ricinus* eingesetzt werden. Eine Impfung gegen einen einzigen Vektor schützt zudem gegen verschiedene potentiell übertragbare Erreger.

Ein wichtiger Beitrag zur integrierten Zeckenbekämpfung ist der Einsatz resisternter Rinderrassen. So gelten z.B. Brahman-Zebus oder N'Dama-Rinder als partiell resistent gegen Zecken (Strother et al, 1974; Rechav 1987; DeCastro und Newson, 1993). Dieser Einsatz von an die regionalen Gegebenheiten angepassten Tieren stellt gerade für die Verhältnisse in vielen afrikanischen Ländern eine kostengünstige und einfache Möglichkeit dar.

### **2.3. Speicheldrüsenprodukte (SGE)**

Während des Saugaktes übertragen Zecken Speichel auf ihren Wirt. Durch einen als „Nierenfunktion“ bezeichneten Vorgang können sie das aufgenommene Blut konzentrieren, indem sie überschüssige Flüssigkeit und Ionen und außerdem antigene, toxische und andere Stoffwechselprodukte abgeben.

Der Zeckenspeichel enthält darüber hinaus bis zu 30 pharmakologisch aktive Wirkstoffe mit proteolytischen, haemostatischen, vasokonstriktorischen, thrombozytenhemmenden, entzündungshemmenden, anästhetischen, histaminhemmenden und immunmodulatorischen Eigenschaften. Alle diese erleichtern den Vorgang der Nahrungsaufnahme (Hemmung der Blutgerinnung) oder unterdrücken Abwehrmechanismen des Wirtstieres (Abstreifen der Zecken, Demarkierung der Stichstelle, lokale oder generalisierte Immunreaktionen). Die genaue Zusammensetzung des Speichels ist bei verschiedenen Zeckenspezies unterschiedlich und spiegelt die Anpassung der Zecken im Laufe der Evolution an ihren natürlichen Wirt wieder. Durch generalisierte immunsupprimierende Effekte werden Zecken zum Wegbereiter für Pathogene.

Während des Saugaktes ändert sich die Zusammensetzung des Speichels (Vančová et al., 2010b) und dadurch der Anteil immunogener Substanzen und die Effekte auf das Immunsystem des Wirtes. Bei Speicheldrüsenextrakten von *I. ricinus* sind z.B. die immunsupprimierenden Effekte bei ungesaugten Weibchen am stärksten, wahrscheinlich da diese zu Anfang des Saugaktes so schnell wie möglich die Reaktionen des Wirtes abschwächen müssen. In späteren Saugphasen sind immunsupprimierende Effekte von geringerer Bedeutung (Rolníková et al., 2003).

Anstelle von reinem Zeckenspeichel, der durch Regurgitation nach Auftröpfen von Pilocarpin auf die Zecken gewonnenen werden kann, können für immunologische Untersuchungen wegen der leichteren Gewinnung Extrakte aus homogenisierten Speicheldrüsen (SGE) verwendet werden (Inokuma et al., 1993).

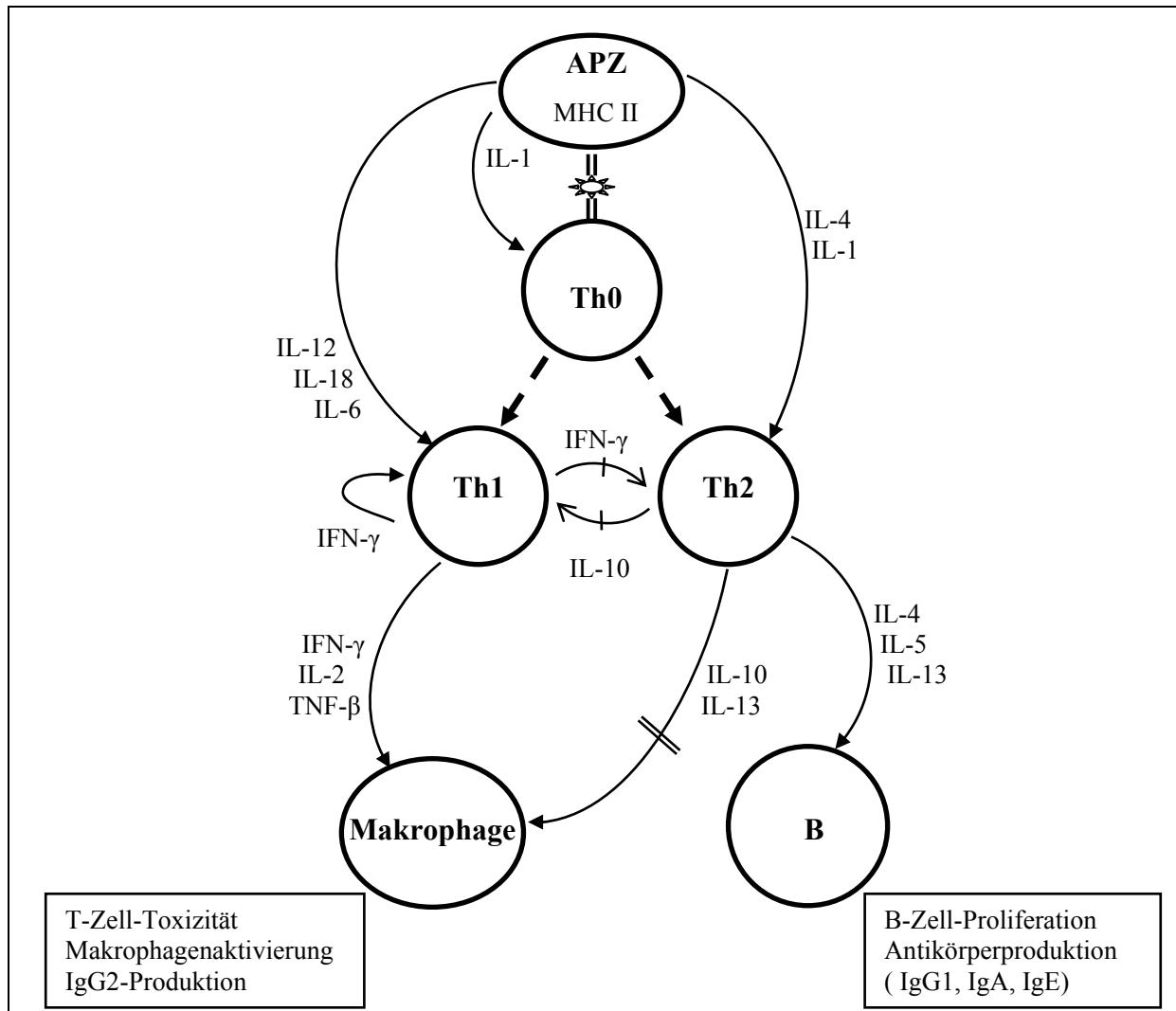
## 2.4. Immunreaktion

### 2.4.1. Immunregulation bei Zeckenbefall

Während die angeborene Abwehr unspezifisch durch natürliche Killerzellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und das Komplementsystem gegen in den Körper eingedrungene Mikroorganismen agiert, ermöglicht die erworbene oder adaptive Immunität eine spezifische und hocheffiziente Erkennung und Eliminierung von Pathogenen durch Proliferation antigenspezifischer T-Lymphozyten, von diesen gebildeten Zytokinen und Bildung von Antikörpern durch aktivierte B-Lymphozyten.

Naive T-Helfer-Zellen (Th0-Zellen) differenzieren nach Aktivierung in zwei Gruppen: Th1-Zellen, die IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  produzieren, und Th2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren. Diese Differenzierung wird durch die Art des Antigens, den Typ der aktivierenden Antigen-präsentierenden Zellen und die Kostimulation über andere Rezeptoren und Liganden beeinflusst. Damit werden zwei unterschiedliche Wege der Immunantwort eingeleitet: Th1-Zellen aktivieren die zelluläre Immunität und führen zu einer Entzündungsreaktion, Th2-Zellen induzieren humorale und allergische Reaktionen (begleitet von der Bildung von IgG1 und IgE beim Rind), eine Entzündung wird unterdrückt (Eckert et al., 2005).

Die zellvermittelte Immunität wird als schützende Immunität gegen Zecken angesehen, daher erscheint es für die Zecke nützlich, eine Umkehr von der Th1-Antwort zur Th2-Antwort zu bewirken (Estes et al., 1994, 1995; Trigona et al., 1999). Nach Heinze et al. (2012b) entwickeln Mäuse bei wiederholtem Zeckenbefall keine eigentliche Immunität, das Zytokinprofil ändert sich aber zu einem gemischten Th1/Th2-Profil mit verstärkter Aktivität regulatorischer T-Zellen.



**Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Interaktion zwischen Zellen und Zytokinen bei Immunreaktionen.**

APZ= Antigenpräsentierende Zelle, B= B-Lymphozyt, IL= Interleukin 1-18, IFN= Interferon, MHC= Major Histocompatibility Complex, Th= T-Helfer-Lymphozyt 0, 1 oder 2.

Antigenpräsentierende Zellen präsentieren Antigene (in Verbindung mit MHC-Molekülen der Klasse II) naiven T-Helferzellen (Th0). Th0-Zellen differenzieren darauf entweder in Th1- oder Th2-Zellen, die unterschiedliche Muster an Zytokinen synthetisieren und damit aktivierend, stimulierend oder inhibierend auf sich und andere Zellen wirken (modifiziert nach Eckert et al., 2005).

Rinder scheinen von dem Th1-Th2-Paradigma etwas abzuweichen (Brown et al., 1994, 1998, 1999 a, b; Palmer et al., 1999; Tuo et al., 1999), da bisher nur wenige echte Th2-Klone entdeckt wurden. Stattdessen sind Th0-Klone mit ähnlichem Zytokinprofil (IL-4, wenig IFN- $\gamma$ ) sehr häufig. Die IgG1- und IgE- Expression wird beim Rind wie bei der Maus durch die Th2-Zytokine IL-4 (und IL-13) induziert, IgG2 wird durch IFN- $\gamma$  und die IgA-Produktion durch TGF-  $\beta$  stimuliert (Estes und Brown, 2002).

In der Haut resistenter Tiere äußert sich die zelluläre Immunität als Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (DTH) mit Infiltration von mononukleären Zellen und Basophilen, in der Frühphase auch Neutrophilen (Heinze et al., 2012a). Sie ist von aktivierte T-Lymphozyten abhängig und wird von Th1-Zytokinen mediert. Die Effektorzellen sind Makrophagen und Basophile, daher wird der Vorgang auch als kutane basophile Hypersensitivität bezeichnet (Brown and Askenase, 1981, 1982; Brown et al., 1983; Ferreira et al., 2003; Marufu et al., 2013). Eine wichtige Rolle spielen hier Langerhanszellen als Antigen-präsentierende Zellen in der Haut, die schon beim Erstbefall die naiven T-Lymphozyten aktivieren und so die Immunreaktion initiieren können (Allen et al., 1979; Andrade et al., 2005); durch Sekretion von IL-1 stimulieren sie T-Zellen zur Teilung und IL-2-Produktion, wodurch die zellvermittelte Immunität initiiert wird.

Dagegen tritt bei empfänglichen Tieren eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp auf mit heftiger Entzündung, Zunahme der Eosino- und Neutrophilen und einer Abnahme der mononukleären Zellen (Fivaz, 1990; Ferreira et al., 2003; Marufu et al., 2013), sie wird von IgE-Antikörpern mediert. Diese verkörpert eine humorale Immunreaktion.

Die DTH gilt als Hauptmechanismus der Zeckenabstoßung bei immunen Tieren. Die Unfähigkeit zur DTH und damit eine gestörte Zellmigration zur Ansatzstelle durch den übertragenen Speichel bei suszeptiblen Tieren verhindert möglicherweise eine schützende Immunantwort (Ferreira et al., 2003).

Antikörper gegen Zeckenspeicheldrüsenantigene steigen nach Infestation im Serum kontinuierlich an, es ist aber umstritten, ob diese Antikörpertiter mit Resistenz korrelieren (Barriga et al. 1991b; Rechav et al. 1990). Hohe Antikörpertiter wurden besonders bei stark befallenen Tieren beobachtet (Willadsen, 1980; Schorderet und Brossard, 1993), mit einer zunehmenden Resistenz fielen diese ab (Barriga et al. 1991b; Fivaz, 1989; Dossa et al., 1996).

### 2.4.2. Immunsuppression durch Zecken

Während des Saugaktes übertragen Zecken kontinuierlich Speichel und greifen durch aus der Speicheldrüse stammende Faktoren ein in die Proliferation der T-Lymphozyten, Zytokinproduktion, die Funktion natürlicher Killerzellen, Antikörperproduktion und Komplementaktivierung (Wikle, 1996). Im Verlauf ihrer Koevolution haben Zecken eine Vielzahl von in den Speichel sezernierten Antagonisten entwickelt, die sie dem Repertoire an

immunpharmakologischen Substanzen ihrer spezifischen Wirkung entgegensezten können (Ribeiro, 1989).

Wikle et al. (1984) entdeckten bei Meerschweinen, die von Zecken befallen waren, die reduzierte Reaktion von Lymphozyten auf Mitogenstimulation. Derselbe Effekt wurde bei Versuchen mit Speichel oder Speicheldrüsenextrakten verschiedener Schildzecken festgestellt (Ramachandra und Wikle, 1992, 1995; Urioste et al., 1994; Bergman et al., 1995, 2000; Ganapamo et al., 1996; Kopecký et al., 1998, 1999; Ferreira und Silva, 1999; Schoeler et al., 1999, 2000). Gleichzeitig wurde eine Verschiebung des Zytokinspektrums vom durch IL-2, IFN- $\gamma$  und IL-12 gekennzeichneten Th1-Profil zum Th2-Profil mit IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  beobachtet (Ramachandra und Wikle, 1992; Urioste et al., 1994; Mbow et al., 1994a; Ganapamo et al., 1996; Ferreira und Silva, 1999; Kopecký et al., 1999; Schoeler et al., 1999, 2000; Brossard und Wikle, 2008). Ähnliche Verhältnisse konnten auch beim Menschen vorgefunden werden (Fuchsberger et al. 1995; Kubeš et al., 2002; Gillespie et al., 2001; Kovar et al., 2001). Bei Rindern beschreiben Inokuma et al. (1993) und Ramachandra und Wikle (1992, 1995) eine reduzierte T-Lymphozytenproliferation und Produktion von Th-1-Zytokinen durch Speichel von *B. microplus* und *D. andersoni*. Inokuma et al. (1993) beschrieben auch eine leichte Verminderung der zirkulierenden T- und B-Lymphozyten.

Auch Neutrophile, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen werden in ihrer Funktion (Produktion von Superoxid und NO<sub>2</sub>, Phagozytose) durch SGE gehemmt (Ribeiro et al., 1990; Kubes et al., 1994; Ferreira und Silva, 1998; Kopecký und Kuthejlova, 1998; Kopecký et al., 1999; Kuthejlova et al., 2001; Wu et al., 2010). Brake und Perez de Leon (2012) konnten bei Rindern eine reduzierte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD69, jedoch nicht von IL-4, CD40 und teilweise CD86 und damit eine Hemmung von Makrophagen und Th1-Zellen nachweisen.

Ramachandra und Wikle (1992, 1995) und Turni et al. (2007) beschrieben bei Mäusen und Rindern zusätzlich eine Verstärkung der LPS-stimulierten B-Zell-Proliferation durch SGE von *R. microplus* und *D. andersoni*.

#### **2.4.3. Entwicklung und Effekte der Immunität gegen Zecken**

Viele Vertebraten sind nicht in der Lage, auf eine initiale Zeckeninfestation zu reagieren, können bei wiederholtem Zeckenbefall aber eine Immunität entwickeln und begegnen der

erneuten Herausforderung mit einer wirksamen Immunantwort. Beim erneuten Befall eines Tieres mit der gleichen Zeckenart erfolgt seltener ein erfolgreiches Ansetzen der Zecken, ihre Gewichtszunahme und Hämoglobinaufnahme sind wegen des entzündlichen Ödems verringert und die Saugphase ist verlängert. Die Häutung zu nachfolgenden Stadien wird beeinträchtigt, weibliche Zecken zeigen reduzierte Fruchtbarkeit, geringere Eiablagezahlen und schlechtere Schlupfraten. Außer diesen v.a. auf dem Nahrungsentzug basierenden Befunden wird der Zecke auch direkter Schaden zugefügt. Stammzellen des Mitteldarms werden geschädigt, was zu einer verringerten Blutaufnahme- und Verdauungskapazität (Walker und Fletcher, 1987) bis zur Ruptur des Darms und Eindringen von Leukozyten des Wirtes ins Gewebe führt (Agbede und Kemp, 1986).

Diese erworbene Immunität ist am besten in jüngeren oder instabilen Parasit-Wirt-Beziehungen sichtbar, vor allem bei Wirten, auf denen die Zecken normalerweise nicht parasitieren. In lange etablierten Parasit-Wirt-Konstellationen, v.a. bei wirtspezifischen Zecken, die auf ihrem bevorzugten Wirt saugen, überwiegt dagegen die Fähigkeit der Zecken, die Immunreaktion wie im vorigen Kapitel beschrieben zu unterdrücken.

Trotz der immunsuppressiven Wirkung des Zeckenspeichels entwickelt sich meist eine partielle Immunität (z.B. bei Brahman-Rindern). Wiederholte Infestationen können beim Wirt eine Reaktion hervorrufen, die immunsupprimierende Faktoren der Zecken zumindest teilweise neutralisiert (Wikl, 1996). Bei hoch spezialisierten Zecken schwindet diese Immunität jedoch bei anhaltender Infestation, so werden z.B. Hunde nach wiederholtem Befall mit *R. sanguineus* wieder empfänglicher und dienen lebenslang als effektive Wirte. Bei wiederholt von Zecken befallenen Rindern war der Grad der Immunsuppression mit der Parasitenlast korreliert und nahm mit jeder Infestation zu (Jongejan et al., 1989; Inokuma et al. 1993).

Anscheinend bleibt die angeborene Resistenz während wiederholter Infestationen konstant, während der Aufbau von Immunität variabler ist, sich langsamer entwickelt und der Immunsuppression unterworfen ist (Baron und Weintraub, 1987; Barriga et al., 1993). Eine höhere Parasitenlast könnte die Immunsuppression verstärken und den Wirt für nachfolgende Infestationen empfänglicher machen, während wiederholte Herausforderungen mit vergleichsweise niedrigen Zeckenzahlen die Abwehr durch den Wirt zu verstärken scheinen (Schorderet und Brossard, 1993).

Zwischen verschiedenen Rinderrassen variiert die Widerstandsfähigkeit gegenüber Zeckenbefall und übertragenen oder assoziierten Mikroorganismen. Bei den Creole-Zebus auf

Guadeloupe existiert eine hohe Resistenz gegen von *A. variegatum* übertragene Krankheiten (Maillard et al., 1993), Zebus und besonders N'Dama-Rinder gelten als weniger empfänglich für *A. variegatum* und Dermatophilose als europäische Rinder (Koney et al., 1994b).

Eine besondere Rolle in bezug auf Resistenz gegen Zecken spielen trypanotolerante Rinderrassen wie die autochthonen westafrikanischen N'Dama. Möglicherweise führen die gleichen Faktoren zu einer effektiveren zellulären Immunantwort wie auch zur Trypanotoleranz, z. B. das Komplementsystem (Authié und Pobel, 1990). N'Dama zeigten einen geringeren Befall mit *A. variegatum* und *Hyalomma spp* als trypanosuszepible Gobra-Zebus, die Zecken erreichten auch geringere Sauggewichte und wiesen eine schlechtere Fruchtbarkeit auf (Claxton und Leperre, 1991, Mattioli et al. 1993). Bei trypanotoleranten Rindern wurden außerdem effektivere Hautreaktionen gegen Zecken beobachtet mit Mastzelldegranulation, stärkerer Freisetzung von Entzündungsmediatoren und höheren Aktivitäten costimulatorischer Zytokine (Willadsen, 1980; Sileghem et al. 1993; Mattioli et al., 2000).

Zebus zeigten gleichzeitig Resistenz gegen *A. variegatum*, *R. microplus* und *R. appendiculatus* und Hautreaktionen vom verzögerten Typ, während empfängliche europäische Rinder gegen *R. microplus* nur eine Reaktion von Soforttyp zeigten (Jongejan et al., 1989; Latif et al., 1991; Bechara et al., 2000). Rosenberg (1984) stellte höhere Sauggewichte von *A. variegatum* nach mehrmaligen Infestationen fest. Es ist somit unklar, ob Rinder oder andere Wiederkäuer eine Immunität gegen *A. variegatum* aufbauen können.

Unterschiede in der Proliferationsbereitschaft der T-Lymphozyten bei Holstein-Frisian-, Zebu- und westafrikanischen N'Dama- Rindern beschreiben Koney et al. (1994b), ähnlich Turni et al (2002) bei Zebu- und Hereford- Rindern. Ramachandra und Wikle (1995) und Turni et al. (2002) zeigten Unterschiede in der Funktion von Makrophagen und Monozyten und in der Zytokinproduktion bei Zebu- Rindern gegenüber europäischen Rassen.

Auch höhere Werte peripherer Leukozyten oder Eosinophile (Merlin 1986; Claxton und Leperre, 1991) werden für rassentypische Unterschiede verantwortlich gemacht.

Unterschiede in der Resistenz gegen Zecken können also rasseabhängig durch eine insgesamt stärkere Immunantwort (zugrundeliegende Reaktionsfähigkeit) bedingt sein oder auch durch inhibitorische Faktoren des Zeckenspeichels.

#### 2.4.4. Immunsupprimierende Faktoren

Koney et al. (1994b) vermuteten, dass die Immunsuppression durch einen im Serum befallener Tiere enthaltenen löslichen Faktor verursacht wurde, da durch Übertragung von Serum zeckeninfestierter, immunsupprimierter Holstein-Friesian-Rinder eine Immunsuppression bei nicht von Zecken befallenen Zebus und N'Dama- Rindern ausgelöst werden konnte. Diese Faktoren können entweder aus dem Zeckenspeichel stammen oder vom Wirt.

Verschiedene Auslöser für die Immunsuppression wurden bisher in Betracht gezogen.

Ein möglicher immunsupprimierender Faktor könnte Prostaglandin E<sub>2</sub> sein (Ribeiro et al., 1985; Ramachandra et al., 1992; Inokuma et al. 1994). Es inhibiert die IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion und T-Lymphozyten-Proliferation und kommt in hohen Konzentrationen im Zeckenspeichel vor (Bowman et al., 1996). In vitro hemmt es die Zytokinproduktion von Th1-Zellen, aber nicht von Th2-Zellen (Betz und Fox, 1991, Oliveira et al., 2011). Sá-Nunes et al. (2007) identifizierten PGE<sub>2</sub> aus dem Speichel von *I. scapularis* als Inhibitor der dendritischen Zellen und deren Zytokinproduktion (IL-12, TNF- $\alpha$ ) und infolgedessen der Stimulation der T-Zellen bei C57BL/6-Mäusen. Auch bei Rindern scheint durch im Speichel von *R. microplus* enthaltenes PGE<sub>2</sub> die T-Zell-Proliferation beeinflusst zu werden (Inokuma et al., 1994).

Eine bedeutende Möglichkeit der Beeinflussung des Zytokingleichgewichts ist die Verstärkung des Th2-Zytokins und Immunsuppressors IL-10, das bei der durch SGE unterdrückten IFN- $\gamma$ - Produktion in Maus-Splenozytenkulturen als Auslöser identifiziert wurde (Kopecký et al., 1999). IL-10 wirkt nicht direkt auf die Funktion der CD4+-Zellen ein, sondern hauptsächlich auf die Funktion der akzessorischen Zellen, v.a. Makrophagen, und hemmt dadurch die Aktivierung der T-Zellen (Ding et al., 1993). Die Proliferation aller bovinen Th-Zell-Klone konnte durch exogenes (humanes) IL-10 gehemmt werden (Brown et al., 1994).

Hajnická et al. (2001) beschreiben zytokinbindende Proteine als Strategie zur Manipulation des Immunsystems, die in einer Hemmung der Funktion der jeweiligen Zielzellen resultiert. Auch die Besetzung des Zytokinrezeptors durch Zeckenspeicheldrüsenprodukte ist möglich. Verschiedene zytokinbindende Proteine sind bisher bekannt. Für *D. reticulatus* und *A. variegatum* wurden zytokinbindende Aktivitäten für IL-8 und weitere Zytokine beschrieben (Hajnická et al. 2001, 2005). Bei *I. scapularis* existiert ein IL-2-bindender Faktor mit weitreichenden Auswirkungen auf das Immunsystem, da IL-2-Rezeptoren auf T- und B-

Zellen, Makrophagen, NK-Zellen vorkommen und alle diese Zelltypen inhibiert werden (Gillespie et al., 2001). Gegen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 konnte keine bindende Aktivität erkannt werden. Diese könnten möglicherweise aber auch auf der Ebene ihrer Produktion kontrolliert werden (Ramachandra & Wikle, 1992; Zeidner et al. 1997).

Ein Protein von 36 kDa, das die Proliferation der T-Zellen durch einen bisher unbekannten Wirkungsmechanismus supprimiert, wurde 1995 aus den Speicheldrüsen von *D. andersoni* isoliert (Bergman et al., 1995, 2000). Urioste et al. (1994) beschrieben bei *I. dammini* ein Protein von 5 kDa, das die Proliferation und IL2-Produktion der T-Zellen und die Funktion der Makrophagen hemmte. Ribeiro et al. (2011) und Nene et al. (2002) beschrieben bei *A. variegatum* vier zur selben Familie gehörende Proteine, darüber hinaus fanden sie bei Studien über das Sialotranskriptom von *A. variegatum* zur Familie der IGF-bindenden Proteine gehörende Sequenzen, die möglicherweise auch ins Immunsystem eingreifen können. Aus den Speicheldrüsen von *A. variegatum* wurden ca. 700 kodierende cDNA- Sequenzen identifiziert, die in 22 Familien von Proteinen aufgeteilt wurden. Die Funktion der meisten dieser Proteine ist unbekannt, viele sind nur bei *A. variegatum* bekannt (Francischetti et al., 2009).

## 2.5. Rinderrassen

(Quelle: <http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5537e/x5537e0c.htm>,  
<http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5468e/x5468e04.htm>)

In dieser Arbeit wurden westafrikanische Somba-Rinder und Zebus bezüglich ihrer Immunreaktion gegen *A.variegatum* untersucht. Sie vertreten im Norden Togos die häufigsten Rinderrassen. Beide gehören der Art *Bos primigenius* an, jedoch den verschiedenen Unterarten *Bos p. taurus* und *Bos p. indicus*, in die sie sich vermutlich schon vor ca. 600.000 Jahren aufgespaltet haben. Zum *Bos taurus*-Typ zählt die buckellose Rasse West African Shorthorn mit dem lokalen Vertreter Somba, zum *Bos indicus*-Typ verschiedene Zebu-Rassen.

### 2.5.1. West African Shorthorn



Abb. 2: Somba-Rinder in der Umgebung von Sokodé, Togo (Foto: G.Feldmann)

Buckellose Rinder mit kurzen Hörnern breiteten sich ab 2750 v. Chr. von Vorderasien ausgehend entlang der Nord-, Nordwest- und Westküste Afrikas bis zum Golf von Guinea aus; hier wurden sie schon um 500 v.Chr. in Felszeichnungen abgebildet.

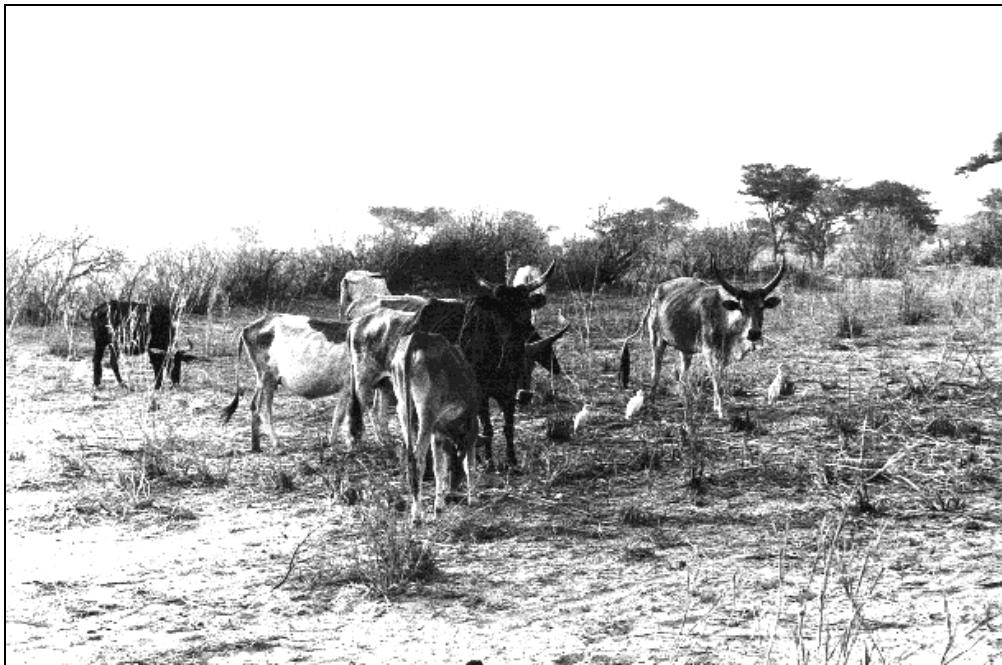
Heute kommen sie entlang der westafrikanischen Küste von Liberia bis Kamerun vor, in Togo werden sie durch die lokale Variante, genannt Somba, vertreten. Die Somba stellen die einheimische Rasse im Norden Togos und Benins dar, sie entstammen der Atakora-Gebirgsregion in Benin und kommen im Norden des Landes vor, wo in der Dapaong-Savanne und in der Region um Kara auch insgesamt die höchste Rinderdichte herrscht. Somba gehören wie die Baoulé in Burkina Faso oder Ghana Shorthorn mit einer Widerristhöhe von ca. 90-100 cm zum größeren Typ der West African Shorthorn. Sie leben in der subhumiden Guinea- oder Sudano-Guinea-Savanne, einer Busch- und Grassavanne, die auch in der Trockenzeit noch gute Futterqualität bietet. Der Körper ist kompakt gebaut (Lebendgewicht durchschnittlich 190 kg bei 90–100 cm Widerristhöhe) mit guter Bemuskelung und einem relativ großen Kopf, der kurze Hörner trägt oder hornlos ist. Das Fell ist meistens schwarz oder schwarzgefleckt, seltener braun, rot oder beige.

Somba werden als Fleisch- und auch als Milchlieferanten genutzt, daneben sind sie für rituelle Zwecke von Bedeutung (rituelle Schlachtung bei Heirat, Beerdigungen, Initiationsriten) oder als Teil der Aussteuer.

Somba- Rinder haben ähnlich den N'Dama-Rindern eine natürliche Toleranz gegen Trypanosomose und sind in beschränktem Ausmaß tolerant gegenüber Zeckenbefall.

Sie stellen den größten Anteil an der gesamten Rinderpopulation Togos von ca. 214.000 Tieren dar, wegen der zunehmenden Einwanderung und Einkreuzung von Zebus zur Verbesserung der Produktivität nimmt dieser Anteil stetig ab. Im Jahr 1978 waren es ca. 67 % des Gesamtbestandes, im Jahr 1984 64% (Shaw und Hoste, 1987); aktuelle Zahlen existieren nicht.

## 2.5.2. Zebus



**Abb. 3:** Zebu-Rinder, Louga, Senegal (Foto:G.Feldmann)

Buckelrinder erreichten Westafrika erst später als die buckellosen Rinder (vermutlich ca. 700 n. Chr.), die Migrationsrouten verliefen wahrscheinlich quer durch den afrikanischen Kontinent entlang des nördlichen Rands des Regenwalds (Payne, 1990).

Die in Togo anzutreffenden Zebu-Rinder gehören verschiedenen zeboiden Rassen an: Maure, Azawak (Kurzhorntyp), Adamawa (Mittellanghorntyp), Senegal Fulani, Sudanese Fulani, White Fulani (Lyrahorntyp), Red Bororo (Langlyrahorntyp). Sie sind mittelgroße bis große Tiere mit langen Gliedmaßen und schmalem Brustkorb, einem langen und schmalen Kopf und sehr variabel ausgebildeten, meist kräftig und lang entwickelten Hörnern (bis zu 120 cm beim Red Bororo). Die Haut ist lose, faltenreich mit Hautanhängen und einem ausgeprägten Triel und meist dunkel pigmentiert. Es dominieren helle Fellfarben, von weiß, hellgrau, gesprenkelt, bis zu rotweiß, braunweiß, schwarzweiß, teilweise auch gedeckt rot (Red Bororo). Das wichtigste und auch namengebende Unterscheidungsmerkmal gegenüber den Shorthorn-Rassen ist der auffällige, gut ausgeprägte Brustbuckel.

Zebus dienen zur Milch- und Fleischproduktion mit teilweise sehr guter Milchleistung (z.B. Azawak) und werden auch zu Zugzwecken genutzt.

Zebus sind widerstandsfähiger gegen Rinderpest als andere Rassen, daher konnten sie sich im Anschluss an Seuchenzüge weiter ausbreiten. Im Jahr 1978 wurde der Bestand mit 2% des Gesamtbestandes angegeben, damals gab es in der Région Centrale und Région Kara keine Zebus. Im Jahr 2004 war das Verhältnis von Zebus zu buckellosen Tieren bei Schlachtrindern annähernd gleich (eigene Beobachtungen), da vermutlich Zebus aus den nördlicheren Landesteilen und dem angrenzenden Burkina Faso eingeführt wurden.

Auch für Zebus wurde eine Resistenz gegenüber Zecken postuliert (Neubert, 1983; Legel, 1989).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Untersuchungsgebiet und Untersuchungszeitraum

Die Untersuchungen wurden im Labor des Tropeninstituts der Universität Tübingen durchgeführt, das dem „Centre Hospitalier Régional“ in Sokodé, Togo, Westafrika angegliedert ist. Die benötigten Blutproben wurden am regionalen Schlachthof von Sokodé entnommen.

Sokodé ( $8^{\circ}59'N$   $1^{\circ}08'E$ ) liegt in der „Region Centrale“ auf einer Höhe von 340 m. Es herrscht ein tropisches Klima mit einer Regenzeit im Jahr, diese dauert etwa von April bis Oktober. Die Temperatur beträgt  $26^{\circ}C$  im langjährigen Mittel, der Niederschlag liegt bei 1200-1500 mm pro Jahr.

Sokodé als zweitgrößte Stadt des Landes dient als Warenumschlagplatz für landwirtschaftliche Erzeugnisse aus der Umgebung. In der Region nördlich von Sokodé betreiben Rinderzüchter, die zum großen Teil dem Volk der nomadischen Peulh angehören, Viehhaltung auf traditionelle Weise.

Die Entnahme der Blutproben und alle Laborarbeiten erfolgten von Mai bis Juli 2004.

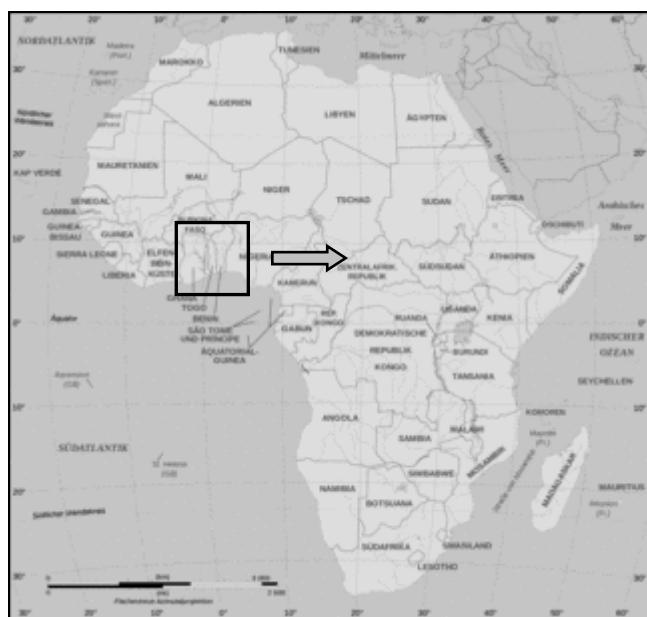


Abb. 4: Karte von Afrika



Abb.5: Karte von Togo

## 3.2. Tiere

### 3.2.1. Rinder

Für die Untersuchungen wurde von 46 Schlachtrindern Blut entnommen. Davon zählten 16 Tiere zur Rasse Somba, 30 Tiere waren vom Zebu-Typ. Es wurden weibliche und männliche Tiere im Alter von ein bis fünf Jahren untersucht. Alle Tiere stammten aus der Umgebung von Sokodé und wurden unter ähnlichen Bedingungen in traditioneller Weidehaltung gehalten.

Ein Tier aus der Gruppe der Zebu-Rinder wurde wegen seines schlechten Allgemeinzustands von den Untersuchungen ausgeschlossen, ein anderes Tier wegen unklarer Rassezugehörigkeit (möglicherweise Zebu-Kreuzung).

### 3.2.2. Zecken

Die Zecken der Spezies *A. variegatum* wurden an frei lebenden Weiderindern in der Umgebung von Sokodé von Hand gesammelt. Zur Bereitung des Antigenextraktes wurden ca. 1000 Zecken verschiedener Saugzustände verwendet, hauptsächlich weibliche, zumindest 2-3 Tage angesaugte, bis zu vollgesaugten Tieren, da bei diesen die Ausbeute an Speicheldrüsengewebe am größten war. Zu einem geringeren Teil kamen auch männliche Zecken zur Verwendung. Die gesammelten Zecken wurden bis zur Präparation in einer feuchten Kammer gehalten.

## 3.3. Methoden

### 3.3.1. Präparation der Speicheldrüsen, Erstellung des Antigenextraktes

Vor Beginn der Präparation wurden die Zecken für ca. 2 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um sie in ihrer regen Beweglichkeit zu reduzieren. Nun wurden die Zecken in einer Petrischale mit dem Rückenschild auf breitem Klebeband fixiert und mit einem Skalpell direkt hinter dem Capitulum, am Hinterende und an einer Seite aufgeschnitten und aufgeklappt. Unter dem Binokular wurden mit einer Pinzette vorsichtig die glasig-ödematösen Speicheldrüsen gefasst, kurz in kaltem sterilen PBS (PBS Tablets, Sigma-Aldrich, Steinheim) gespült und in ein Gefäß mit eiskaltem PBS gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Speicheldrüsen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Gepoolte Speicheldrüsen wurden aufgetaut, nochmals mit kaltem PBS gespült, darauf mit einer geringen Menge PBS in einen Gewebehomogenisator gegeben und auf Eis manuell zerkleinert. Die resultierende trübe Flüssigkeit wurde bei 2000 U/min

zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zweimal sterilfiltriert (Millipore 0,45 und 0,22µm). Der verbleibende Bodensatz wurde für molekularbiologische Untersuchungen aufbewahrt und ebenso wie das gewonnene Antigenextrakt bei –20°C tiefgefroren.

Der Proteingehalt des Antigenextraktes wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt (Micro BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA).

### **3.3.2. Blutentnahme**

Die Blutentnahme fand am örtlichen Schlachthof von Sokodé an zur Schlachtung durch Schächten bestimmten Rindern statt. Um Einflüsse von zusätzlichen parasitären, viralen und bakteriellen Erkrankungen zu minimieren, wurden die Blutproben nur von Rindern mit gutem Allgemeinzustand entnommen. Nach dem Eröffnen der V. jugularis im Verlauf des Schlachtvorganges wurde das Blut in sterilen 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One Cellstar) aufgefangen, in die zur Verhinderung der Blutgerinnung 0,5 ml des Antikoagulans Heparin-Natrium (Liquemin N 25 000, Roche) vorgelegt worden war. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung ins Labor gebracht.

### **3.3.3. Lymphozytenisolierung**

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Im Labor wurden jeweils 20 ml des heparinisierten Blutes mit der gleichen Menge Zellkulturmedium (RPMI, Biochrom mit 10 % BSA, Sigma) verdünnt. Für die Auf trennung der zellulären Blutbestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden in sterilen 12-ml-Zentrifugenröhrchen je 3 ml Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin) vorgelegt und vorsichtig mit je 7 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Sodann wurden die Proben bei 2000 U/min für 40 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren konnten die angereicherten Lymphozyten als weiße Schicht zwischen Plasma und Trennlösung mit einer Pasteurpipette (Transferpetten, Falcon) abgesaugt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden. Anschließend wurden aus der obersten Schicht 0,5 ml Plasma für serologische Untersuchungen und aus der untersten für molekularbiologische Untersuchungen 0,5 ml Zellen abgenommen, mit 0,5 ml Guanidin-Isothiocyanat (RNA Stabilization Reagent, Roche) vermischt und für eventuelle weitere Untersuchungen bei –20° gelagert. Um die Trennlösung zu entfernen, wurden die Röhrchen mit den isolierten Lymphozyten mit Medium aufgefüllt und bei 2000 U/min und Raumtemperatur 15 Minuten zentrifugiert. Nach diesem ersten Waschschritt wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet resuspendiert, mit Medium aufgefüllt und nochmals

zwei ebensolchen Waschschriften unterzogen. Nach dem dritten Waschschriften wurden die Zellen in 5 ml Komplettmedium (RPMI mit 10 % BSA und 10% FCS) aufgenommen.

### 3.3.4. Zellkulturansatz

Zur Zählung der vitalen Zellen wurden jeweils 0,1 ml der Zellsuspension entnommen und 1:10 mit Medium verdünnt. 10 µl der verdünnten Suspension wurden mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt, eine Neubauer-Zählkammer damit gefüllt und unter dem Mikroskop bei 160-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden mit komplettem Kulturmedium auf  $2 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Davon wurden 100 µl pro Vertiefung in 96-Well-Zellkulturplatten mit Flachboden (COSTAR 96-Well Cell Culture Cluster Flat bottom, Corning, NY, USA) pipettiert und in Vierfachansätzen mit jeweils 10 µl der verschiedenen Mitogene, Antigene und Anti-Interleukine stimuliert. Die Bestimmung der Zytokinproduktion wurde in Doppelansätzen mit 200 µl pro Well nach dem gleichen Schema durchgeführt.

Als Positivkontrollen wurden die Mitogene PHA, ConA und LPS verwendet. PHA und ConA sind pflanzliche Lektine, die gebräuchlicherweise zur Stimulation von Lymphozyten eingesetzt werden und hier vorrangig als T-Zell-Mitogene wirken. LPS stammt aus der Zellwand gramnegativer Bakterien und dient als B-Zell-Mitogen. SGE aus den Speicheldrüsen von *A. variegatum* diente als spezifisches Antigen und wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. anti-IL-10 blockiert die Wirkung des immunmodulatorischen Zytokins Interleukin 10. Die optimalen Konzentrationen der Mitogene wurden in Vorversuchen an vier Tieren festgelegt.

Als Negativkontrollen wurden Zellansätze ohne Mitogene und Antigene verwendet.

Phytohämagglutinin (PHA)	6 µg/ml
ConcanavalinA (ConA)	20 µg/ml
Lipopolysaccharid (LPS)	5 µg/ml
Zeckenspeicheldrüsenextrakt (SGE)	30; 15; 3; 1,5; 0,3 µg/ml
Anti-Interleukin 10 (anti-IL-10)	

Die Zellkulturen wurden 48 Stunden bei 37°C, feuchter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.5. Lymphozytenproliferationstest (LTT)**

Nach zweitägiger Inkubation wurden die Proliferationsraten mit dem nicht-radioaktiven BrdU-Proliferations-Assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche Diagnostics) gemessen. Diese Methode basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons Bromdesoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen und Nachweis der Chemilumineszenz. Der Proliferationsassay wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Dazu wurden in die Zellkulturansätze pro Vertiefung 10 µl der BrdU-Labeling-Solution einpipettiert und die Zellkulturen für nochmals 4 Stunden inkubiert. Nun wurde der Überstand mit einer Mehrkanal-Pipette abgesaugt und die am Boden der Zellkulturplatten haftenden Zellen mit einem Haartrockner 15 Minuten lang getrocknet, für 30 Minuten fixiert und für 60 Minuten mit dem gegen BrdU gerichteten Antikörper (Anti-BrdU-Working-Solution) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 25-minütiger Inkubation mit TMB und Abstoppen mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Farbentwicklung bei 450 nm im ELISA-Reader (Bio-Tek Instruments, Mikroplate Reader EL 311) gemessen.

### **3.3.6. Nachweis der *in vitro*- Produktion von IFN-gamma mittels ELISA**

Die Stimulation der Lymphozyten zur Zytokinproduktion wurde in 96-Well-Zellkulturplatten in Einfachansätzen zu je 200 µl durchgeführt. Die Zellen wurden mit den gleichen Mitogen- und Antigen-Konzentrationen wie oben beschrieben inkubiert, ein unstimulierter Ansatz wurde als Kontrolle der spontanen IFN-γ-Produktion mitgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Überstände mit einer Pipette abgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Zum Nachweis diente ein indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA) mit rekombinantem bovinen IFN-μ.

Mikrotestplatten (Deep-Well-ELISA-Platten, Nunc) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 µl des 1. Antikörpers (MCA 2112 mouse anti bovine IFN-μ 2,5 µg/ml, Serotec) in Karbonatpuffer beschichtet. Nach 12 Stunden wurden die Platten gewaschen und zur Blockierung freier Bindungsstellen für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit PBS, 0,5 % BSA inkubiert. Die Überstände (s.o.) wurden aufgetaut und 1:10 verdünnt, als Zytokinstandard wurde rekombinantes bovin IFN-γ (PBP001, Serotec) von 3000 pg/ml ausgehend in 7 Schritten verdünnt. Die Platten wurden gewaschen, darauf wurden 50 µl der verdünnten Überstände oder des Zytokinstandards einpipettiert und bei Raumtemperatur 4 Stunden inkubiert. Nach

dem anschließenden Waschschritt wurden 50 µl des detektierenden 2. Antikörpers (anti-bovines IFN- $\mu$  biotinyliert, Serotec; 1:500 verdünnt) einpipettiert und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen, mit 50 µl einer Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung (Serotec) 90 min inkubiert und nach dem letzten Waschschritt 50 µl des Substrates pNPP zugegeben. Die Platten wurden 30-45 Minuten entwickelt und es wurde bei 405 nm eine kinetische Messung durchgeführt.

### **3.3.7. Bestimmung *A. variegatum*- spezifischer Antikörper (IgM, IgA, IgG1, IgG2)**

*A. variegatum*- spezifische Antikörper wurden per indirektem Festplatten-ELISA in den Seren der Rinder quantitativ nachgewiesen.

Hierzu wurde das *A. variegatum*- Antigenextrakt in einer Konzentration von 5 mg/ ml in Beschichtungspuffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) verdünnt und damit Mikrotestplatten (Costar, hohe Bindungskapazität) mit 50 µl pro Vertiefung über Nacht beschichtet. Die beschichteten Platten wurden mit Waschpuffer (PBS, 1% Tween-20, pH 7,4) gewaschen und zur Blockierung freier Bindungsstellen mit 75 µl PBS, 10 % FCS bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 50 µl der verdünnten Serumproben (Verdünnungspuffer: PBS, 10% FCS, 4 % Tween-20, pH 7,4) in den jeweiligen Verdünnungen (IgA, IgM, IgG1 1:400; IgG2 1:50) in Doppelansätzen zugegeben. Als Leerwert wurde Verdünnungspuffer und als Positivkontrolle eine gut reagierende Serumprobe mitgeführt. Die Platten wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Platten wieder gewaschen, 50 µl des detektierenden Antikörpers (Sheep anti-bovine IgG1 und IgG2, Peroxidase-konjugiert, Dunn Labortechnik, Asbach, Germany) zupipettiert (Verdünnungen bei IgA 1:5000, bei allen anderen Immunglobulinen 1:10000 in Verdünnungspuffer) und erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten intensiv gewaschen, das Substrat Tetramethyl-Benzidin (Dunn, Asbach) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt und jeweils 50 µl pipettiert. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten mit Schwefelsäure gestoppt und bei 450 nm photometrisch gemessen.

### **3.3.8. Hämatologische und parasitologische Beurteilung des Blutausstrichs**

Von allen Tieren wurden Blutausstriche angefertigt, luftgetrocknet und nach Giemsa gefärbt. Bei 500-facher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten ausgezählt und die Ausstriche bei 500- und

1000-facher Vergrößerung auf das Vorhandensein von Blutparasiten (Trypanosomen, Babesien, Theilerien) überprüft.

### **3.3.9. Statistische Auswertung**

Die statische Auswertung erfolgte anhand der Programme Microsoft Excel und Winstat.

Zum statistischen Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen im Lymphozytentransformationstest sowie der Zytokinproduktion wurde der t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Beim Vergleich entsprechender Werte zwischen den beiden Rassen wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Korrelationen zwischen Ergebnissen verschiedener Untersuchungen wurden anhand des Korrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft. Als signifikant unterschiedlich wurden Werte mit  $p \leq 0,05$  gewertet.

## **3.4. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien**

### **Biochrom AG, Berlin**

Biocoll Separating Solution (Ficoll),

Fetal Calf Serum (FCS)

Phytohämagglutinin (PHA-L) pure

RPMI

Serologische Pipetten (steril, 25 ml)

Zentrifugenröhrchen 10 ml

### **Costar, Cambridge, USA**

Zellkulturplatten 96-Well (Flachboden, steril)

### **Dunn, Asbach**

Bovine IgG1 (Peroxidasekonjugiert, heavy chain specific, Schaf)

Bovine IgG2 (Peroxidasekonjugiert, heavy chain specific, Schaf)

TMB-Substratlösung, gebrauchsfertig

**Eppendorf, Hamburg**

Reaktionsgefäß „Safe Lock“, 1,5 ml

**Falcon, New Jersey, USA**

Serologische Pipetten 10 ml

**Gibco (Invitrogen Corporation, Neuseeland)**

RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 25 mM Hepes-Puffer und L-Glutamin

**Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen**

Pipettenspitzen 1000 ml und 200 ml

Polystyrolröhren 12 ml und 50 ml

**Merck, Darmstadt**

Chemikalien

**Millipore, Massachusetts**

Sterilfilter 0,22µm und 0,45µm, geringe Proteinbindung

**Nunc, New York, USA**

ELISA-Platten 96 Well, Deep-Well

Pierce, Rockford, USA

Peroxide Solution

Peroxidase Substrat (TMB)

Proteinbestimmung Micro BCA Protein Assay Reagent Kit

**Roche, Mannheim**

BrdU Cell Proliferation ELISA,

Liquemin N 25 000

RNA Stabilization Reagent

**Roth, Karlsruhe**

Schwefelsäure 0,5 mol/l, 1N

Andere Chemikalien

**Serotec, Düsseldorf**

Mouse anti bovine Interferon Gamma

Mouse anti Bovine IFN-gamma biotinyliert

Streptavidin-Alkalische Phosphatase

Rekombinantes bovines IFN-gamma

Mouse anti-bovine IL-10

**Sigma, St. Louis, USA**

Antibiotic Antimycotic (10 000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B)

Bovines Serum Albumin (BSA)

Phosphate Buffered Saline Tablets (PBS, pH 7,4)

p-Nitrophenyl Phosphate Tablets (pNPP)

Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20)

## 4. Ergebnisse

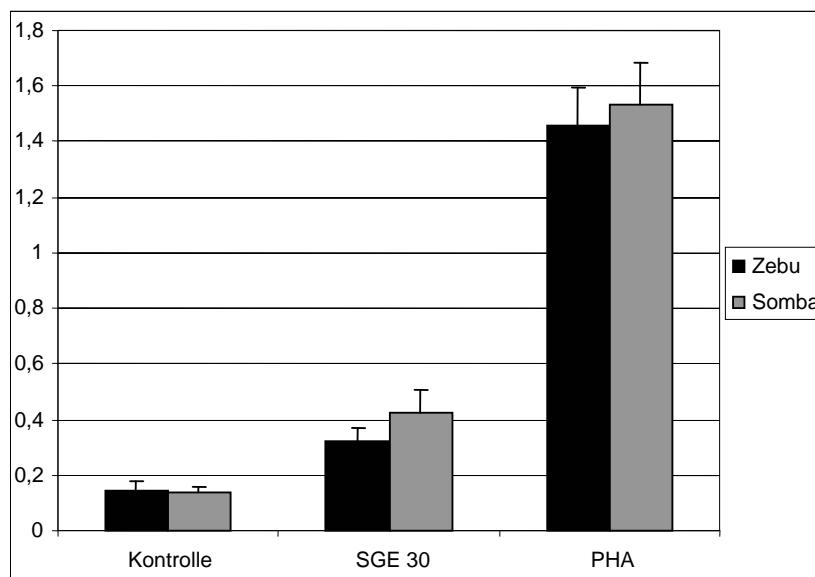
### 4.1. Zelluläre Immunantwort

#### 4.1.1. Lymphozyten-Transformationstest

Im Lymphozyten-Transformationstest wurden Lymphozyten von Zebu- und Somba-Rindern mit dem unspezifischen T-Zell-Mitogen PHA ( $6\mu\text{g}/\text{ml}$ ), mit einem Extrakt aus Zeckenspeicheldrüsen (SGE) oder mit einer Kombination aus PHA und SGE in verschiedenen Konzentrationen (30, 3 und  $1,5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert. Die Proliferation der unstimulierten Zellen sowie der verschiedenen Stimulationen wurden gemessen und mit der unspezifischen Stimulation durch PHA verglichen. Der Lymphozyten-Transformationstest lieferte bei 23 Zebu- und 13 Somba-Rindern gültige Ergebnisse.

Die spontane Proliferation der Lymphozyten war bei beiden Rassen nahezu gleich.

Auf Stimulation mit SGE reagierten Lymphozyten beider Rassen mit einer signifikanten Zunahme der Proliferation ( $p \leq 0,01$ ). Dabei war die parasitenspezifische Proliferation bei Stimulation mit Zeckenantigen niedriger als bei Stimulation mit dem unspezifischen T-Zell-Mitogen PHA ( $p \leq 0,01$ ). Sowohl bei Stimulation mit SGE als auch mit PHA zeigten Lymphozyten der Somba gegenüber denen der Zebus geringgradig höhere Werte (Abb.6).

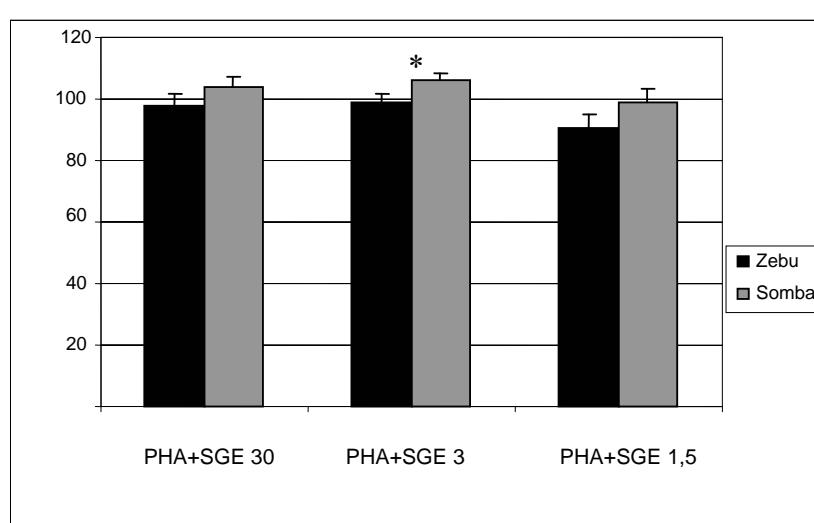


## Ergebnisse

---

**Abb. 6:** Lymphozytenproliferation von Zebu- und Somba-Rindern unstimuliert, bei Stimulation mit Mitogen (PHA 6 $\mu$ g/ml) und Antigen von *A.variegatum* (SGE 30  $\mu$ g/ml). Dargestellt sind Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern.

Bei Zugabe von SGE zu mit dem unspezifischen T-Zell-Mitogen PHA vorstimulierten Lymphozyten kam es bei der niedrigsten Konzentration von 1,5  $\mu$ g/ml zu einer Abnahme der Proliferation (Abb. 7), die aber nicht signifikant war ( $p=0,08$ ). Höhere Konzentrationen zeigten keine Auswirkungen. Insgesamt war die Proliferation bei niedriger Konzentration des Antigens niedriger als bei einer mittleren Konzentration von 3 $\mu$ g/ml ( $p \leq 0,01$ ). Die Proliferation war bei Somba-Rindern bei erheblichen individuellen Schwankungen etwas höher als bei Zebus, die Unterschiede waren jedoch nur bei einer Antigenkonzentration von 3 $\mu$ g/ml signifikant ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 7:** Prozentuale Änderung der Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten bei verschiedenen SGE-Konzentrationen, dargestellt als Stimulationsindices mit zugehörigen Standardfehlern. Signifikante Unterschiede zwischen den Rassen sind mit \* markiert.

Die Reaktivität unstimulierter Zellen auf SGE zeigte eine positive Korrelation zur spontanen Proliferationsfähigkeit, ebenso zur Proliferation auf PHA und die Proliferation gegenüber SGE in verschiedenen Konzentrationen bei PHA- vorstimulierten Lymphozyten, d.h. Tiere mit einer starken Spontanproliferation wiesen auch eine starke Proliferation bei Stimulation mit dem Mitogen und den verschiedenen Kombinationen von Mitogen und Antigen auf.

Ebenfalls wurde bei der Stimulation der mitogenstimulierten Lymphozyten mit SGE ein ähnliches Proliferationsverhalten beobachtet wie bei der Stimulation nur mit dem Mitogen.

Zwischen der Höhe der Proliferation und den entsprechenden Werten der Zytokinproduktion (s.u.) konnte keine direkte Korrelation festgestellt werden.

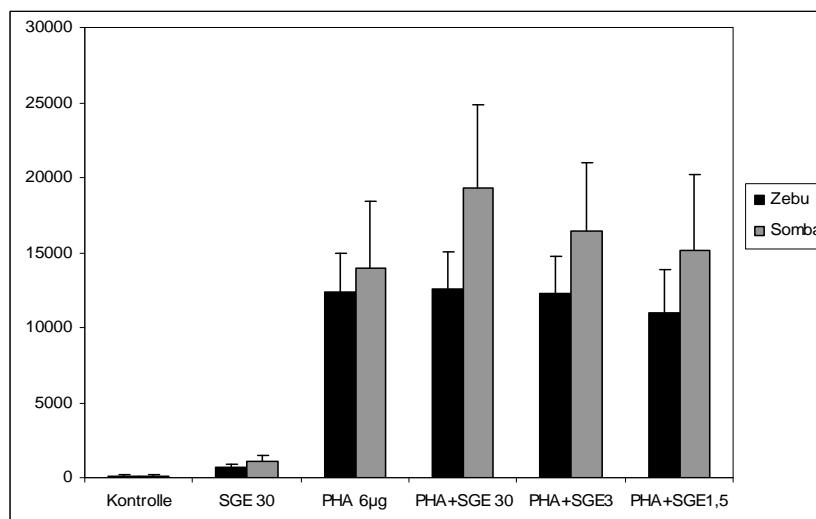
### 4.1.2. Produktion von Interferon gamma

Die Konzentration des Zytokins Interferon-gamma in den Überständen der Lymphozytenkulturen wurde in einem Sandwich-ELISA mit kommerziell erhältlichen Antikörperpaaren gemessen und anhand eines rekombinanten Zytokinstandard berechnet. In die Auswertung wurden Werte von 23 Zebu- und 13 Somba-Rindern einbezogen.

Die Stimulation mit SGE führte zu einer signifikant erhöhten Produktion von Interferon-gamma durch unstimulierte Lymphozyten ( $p \leq 0,01$ ), die aber niedriger war als die Interferon-gamma-Produktion nach Stimulation mit PHA ( $p \leq 0,01$ ).

Bei der Zugabe des Zeckenextraktes in drei verschiedenen Konzentrationen (30, 3 und 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) zu den PHA-stimulierten Lymphozyten ergab sich ein geringer Anstieg der Produktion von IFN- $\gamma$  mit einem dosisabhängigen Effekt. Weder der Anstieg noch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen des Zeckenextraktes waren signifikant.

Die Rinder der Rasse Somba zeigten höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration als Zebus, die Unterschiede waren wegen der starken individuellen Abweichungen jedoch nicht signifikant (Abb. 8).

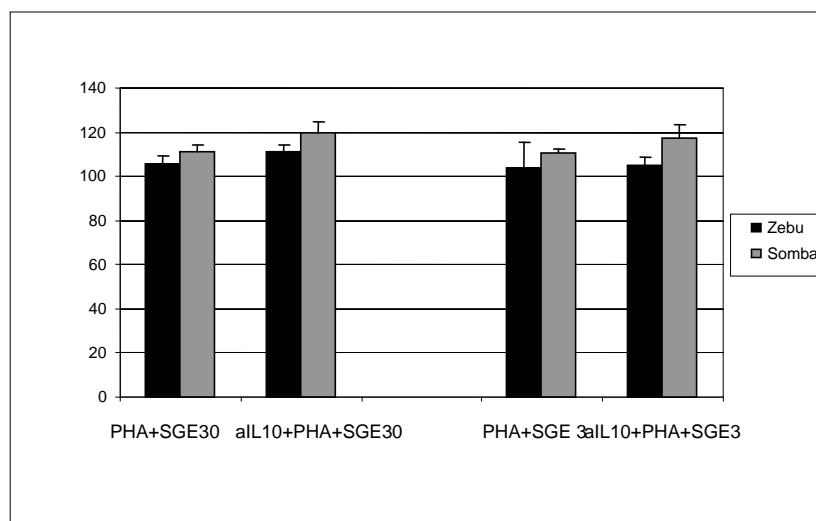


**Abb. 8:** Produktion von Interferon gamma [ng/ml] in Lymphozytenkulturen von Zebu- und Somba-Rindern nach Stimulation mit PHA und SGE in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern.

#### 4.1.3. Untersuchungen mit IL-10-neutralisierendem Antikörper

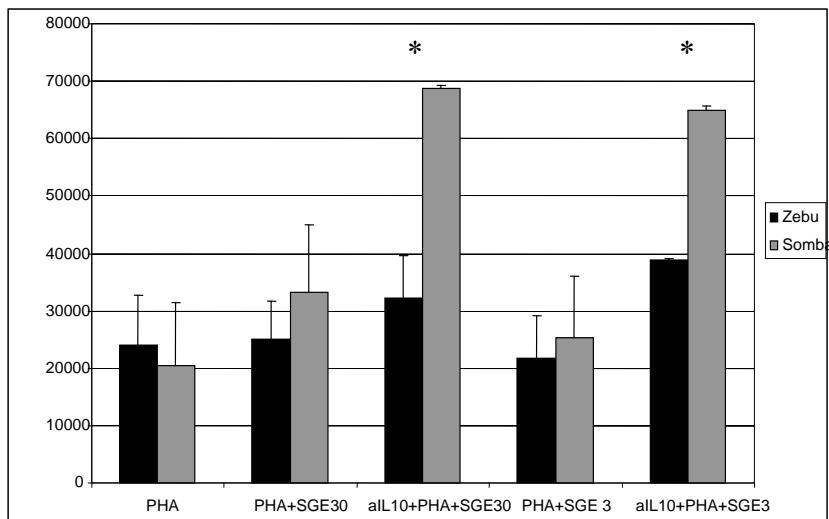
Um eine mögliche Beteiligung einer Th2-Immunantwort zu überprüfen, wurden an Blut von jeweils 5 Tieren jeder Rasse Untersuchungen mit Interleukin-10-neutralisierenden Antikörpern durchgeführt.

Die Proliferation der mit PHA und SGE stimulierten Lymphozyten von Somba-Rindern zeigte bei Zugabe des IL-10-Antikörpers nochmals eine leichte Steigerung (Abb. 9), die aber nicht signifikant war. Bei den Lymphozyten der Zebu-Rinder konnte keine Änderung der Proliferation festgestellt werden. Unterschiede zwischen den Rassen waren nicht signifikant.



**Abb. 9:** Lymphozytenproliferation bei Zebu- und Somba-Rindern nach Stimulation mit PHA (6  $\mu$ g/ml), SGE (30 und 3  $\mu$ g/ml) und IL-10- neutralisierendem Antikörper (2,5 ng/ml). Dargestellt sind Stimulationsindices mit zugehörigen Standardfehlern.

Die IFN- $\gamma$ - Produktion der mit PHA und SGE stimulierten Lymphozyten nahm bei Zugabe des IL-10- Antikörpers bei beiden Rassen zu. Eine signifikante Zunahme der IFN- $\gamma$ - Produktion zeigten nur die Somba- Rinder ( $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,05$ ). Demzufolge waren auch die Unterschiede zwischen den beiden Rassen signifikant ( $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,05$ ) (Abb.10).



**Abb. 10:** IFN-gamma Produktion [ng/ml] bei Zebu- und Somba-Rindern nach Stimulation mit PHA (6  $\mu\text{g/ml}$ ), SGE (30 und 3  $\mu\text{g/ml}$ ) und IL-10- neutralisierendem Antikörper (2,5 ng/ml). Dargestellt sind Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern. Signifikante Unterschiede zwischen den Rassen sind mit \* markiert.

Tiere mit hoher spontaner IFN-gamma-Produktion der Lymphozyten reagierten mit einer verminderten Zellproliferation und Zytokinproduktion in Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers.

Die Proliferation unter Zugabe des neutralisierenden Antikörpers verhielt sich ähnlich wie die Proliferation nach Mitogen- oder Antigen-Stimulation. Auch die IFN-gamma-Produktion nach Zugabe des neutralisierenden Antikörpers war mit der durch Stimulation mit PHA erreichten IFN-gamma-Produktion vergleichbar.

#### 4.1.4. Stimulation und Suppression

Da es bei der Zugabe von SGE zu den PHA-stimulierten Lymphozyten zu starken individuellen Abweichungen kam, die sich zum Teil in einer Stimulation, zum Teil in einer Suppression der Proliferation äußerten, wurden alle Tiere anhand dieser Reaktivität in zwei Gruppen aufgeteilt und auf weitere Unterschiede untersucht.

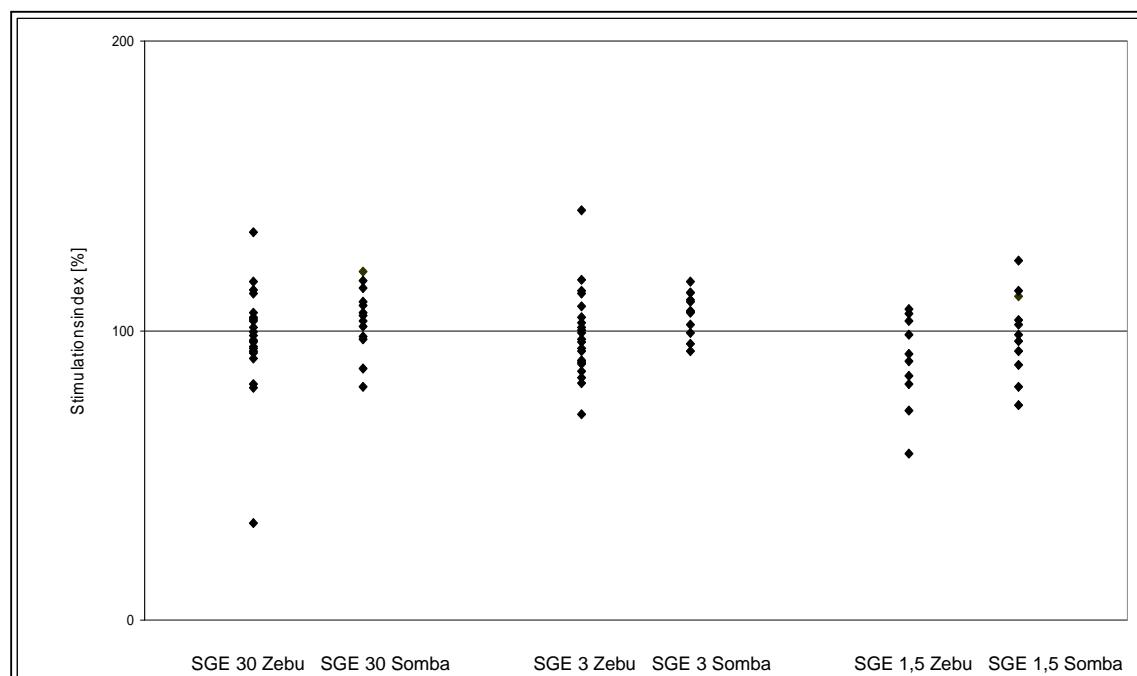
Die Rinder, die bei Stimulation mit PHA und SGE (30 $\mu\text{g/ml}$ ) eine Zunahme der Proliferation zeigten, wiesen einen mittleren Stimulationsindex von 109 auf und lagen damit signifikant höher als die Tiere mit einer Suppression bei einem mittleren Stimulationsindex von 88 ( $p \leq$

## Ergebnisse

---

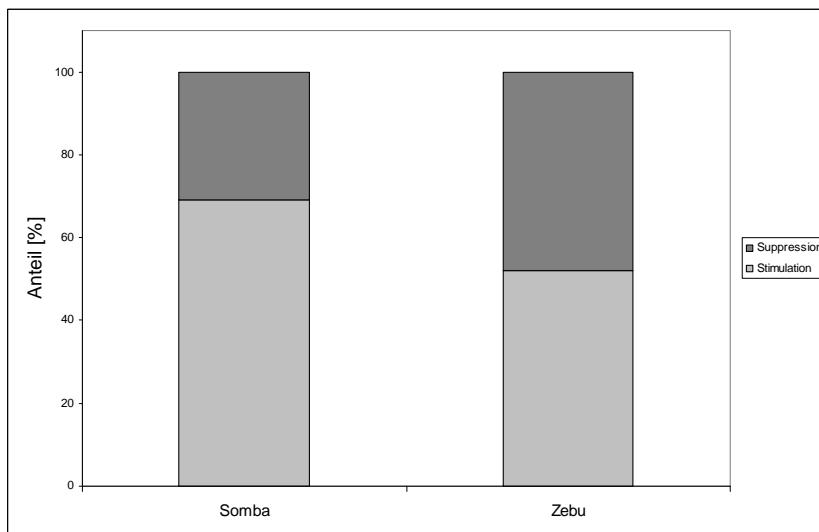
0,01). Auch bei niedrigeren Konzentrationen des Zeckenantigens (3 bzw. 1,5 µg/ml) waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen signifikant (Abb. 11).

Deutliche Differenzen zwischen den beiden Gruppen gab es nur bei den eosinophilen Granulozyten, die bei denjenigen Tieren erhöht waren, die eine Suppression im LTT zeigten ( $p \leq 0,05$ ). Andere Parameter (Zytokinproduktion, Produktion spezifischer Antikörper) zeigten keine Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abb. 11:** Verteilung der Reaktivität der Einzeltiere bei SGE 30 µg/ml, 3 µg/ml, 1.5 µg/ml, dargestellt als Stimulationsindex in %. Werte unter 100 bedeuten eine Suppression, Werte über 100 eine Stimulation der Lymphozytenproliferation.

In der Gruppe der Somba-Rinder reagierten 69 % mit einer Steigerung der Proliferation bei Zugabe von SGE (30 µg/ml) und 31% mit einer Abnahme. In der Gruppe der Zebus waren die Verhältnisse nahezu ausgewogen, es reagierten 52 % mit einer Zunahme und 48 % mit einer Abnahme (Abb. 12).

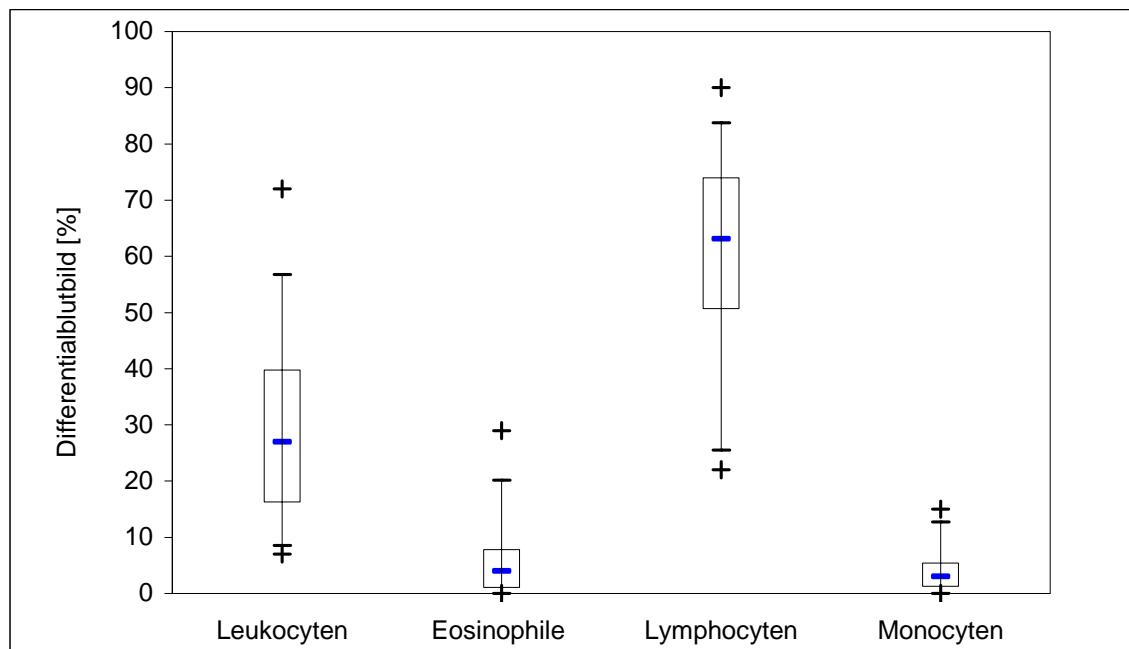


**Abb. 12:** Anteil der Tiere jeder Rasse, die mit einer Stimulation oder Suppression der Lymphozyten durch SGE (30 $\mu$ g/ml) reagierten

#### 4.2. Blutbild

Die Bestimmung der Anzahl der Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und der Monozyten erfolgte durch die Auszählung der nach Pappenheim gefärbten Blutaustriche (Abb. 13). Es wurden Blautausstriche von 26 Zebu- und 18 Somba-Rindern ausgewertet.

Vor allem Neutrophile und Lymphozyten zeigten starke individuelle Schwankungen.



**Abb. 13:** Relativer Anteil verschiedener Blutzellen am Differentialblutbild. Dargestellt sind Median, 25-75%- Intervall, Minimum und Maximum.

#### **4.2.1. Lymphozyten**

Bei 38 der 44 Tiere (86%) waren die Lymphozyten am häufigsten, diese Tiere zeigten das für Rinder typische lymphozytäre Blutbild. Der Mittelwert lag bei 61,56 % und damit im Vergleich zum üblichen Referenzbereich von 45-65% relativ hoch. 19 Tiere (43%) zeigten eine Lymphozytose und 4 eine Lymphopenie (9%). Zwischen den beiden Rassen konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Die Werte von Tieren, die im LTT eine Stimulation durch Zeckenantigen zeigten, unterschieden sich nicht von denen der Tiere, die mit einer Suppression reagierten.

Die Lymphozytenwerte waren positiv mit der Produktion spezifischer IgM- Antikörper korreliert.

#### **4.2.2. Neutrophile Granulozyten**

Sechs Tiere wiesen ein neutrophiles Blutbild auf (14%).

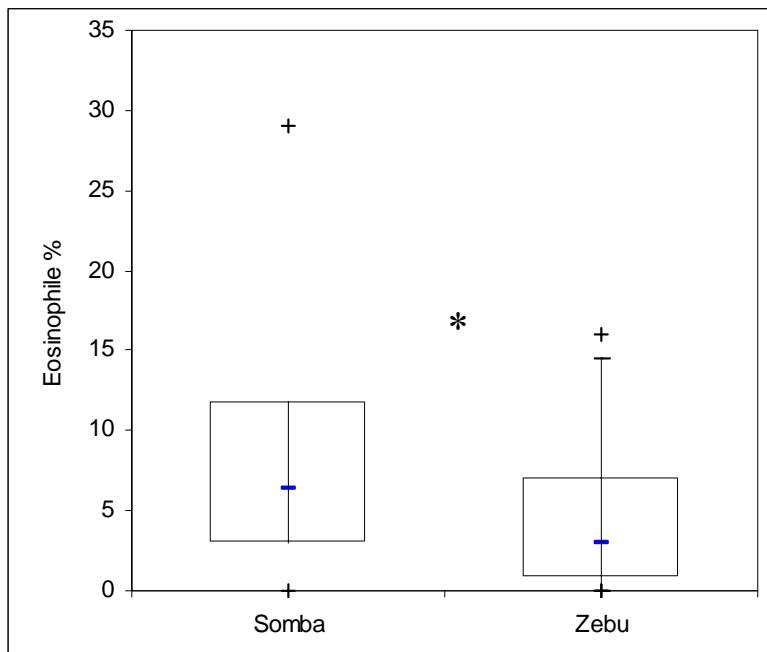
Bei Zebu-Rindern war der Anteil der Neutrophilen mit 30% geringfügig höher als bei Somba-Rindern (27%). 6 Tiere zeigten eine Neutrophilie (14%) und 18 Tiere Neutropenie (41%).

Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Tieren, die im LTT mit Stimulation bzw. Suppression reagierten.

Eine hohe Anzahl von neutrophilen Granulozyten ging mit einer verringerten Produktion parasitenspezifischer IgM-Antikörper einher, ebenfalls war eine niedrigere Reaktivität nicht mitogenstimulierter Zellen auf SGE auffällig.

#### **4.2.3. Eosinophile Granulozyten**

Der Anteil der eosinophilen Granulozyten lag bei Zebu-Rinden bei durchschnittlich 4%, bei Somba-Rindern bei 9%. Zwischen den beiden Rassen besteht damit ein signifikanter Unterschied (Abb. 14).



**Abb. 14:** Relativer Anteil [%] der eosinophilen Granulozyten am Blutbild bei Somba- und Zebu-Rindern. Dargestellt sind Median, 25-75%- Intervall, Minimum und Maximum. Der Unterschied war signifikant.

Außerdem war eine signifikante Erhöhung der eosinophilen Granulozyten bei den Tieren zu beobachten, die eine Suppression im LTT zeigten, gegenüber denen mit einer Stimulation ( $p \leq 0,05$ ). Eine signifikante positive Korrelation bestand auch zu einer verstärkten Spontanproliferation. Tiere mit einer erhöhten Anzahl an eosinophilen Granulozyten wiesen außerdem eine stärkere Produktion von spezifischen IgG1- Antikörpern auf.

16% der Tiere (7 von 44) zeigten eine Eosinophilie. Diese Tiere zeigten bei der Zugabe von SGE zu PHA-stimulierten Lymphozyten auch eine signifikante Abnahme der Proliferation ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.2.4. Monozyten

7 Tiere zeigten eine Monozytose (bei 4 Tieren relative Monozytose durch Neutropenie). Der Monozytenanteil der Zebus lag geringgradig höher als der der Somba-Rinder. Zwischen den Tieren mit einer Stimulation oder Suppression ergaben sich keine Unterschiede in bezug auf die Monozytenwerte.

### 4.3. Parasitenspezifische Immunglobuline

Um anhand der vorherrschenden Immunglobulin-Subklasse Hinweise auf die beteiligte Immunantwort zu erhalten, wurde die spezifische humorale Immunantwort gegen Speicheldrüsenantigene von *A. variegatum* in einem indirekten ELISA untersucht. Ein Homogenisat aus Speicheldrüsen diente dabei als lösliches Antigen. Diese Untersuchungen wurden bei 26 Zebu- und 18 Somba-Rindern durchgeführt.

#### 4.3.1. IgG1

Außer bei einem Zebu war bei allen Tieren IgG1 die dominierende IgG-Subklasse. Bei starken individuellen Schwankungen waren zwischen den beiden Rassen keine Unterschiede festzustellen. Auch zwischen den Tieren mit einer Stimulation oder Suppression ergaben sich keine Unterschiede (Abb. 15).

Bei Rindern mit starker Produktion von parasitenspezifischem IgG1 war sehr häufig auch IgG2 erhöht.

Die IgG1-Produktion war außerdem mit dem Anteil der eosinophilen Granulozyten am Blutbild korreliert.

#### 4.3.2. IgG2

Zebu-Rinder zeigten höhere IgG2-Werte als Somba-Rinder und Tiere mit einer Stimulation durch Zeckenantigene zeigten leicht erhöhte IgG2-Werte, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb.15).

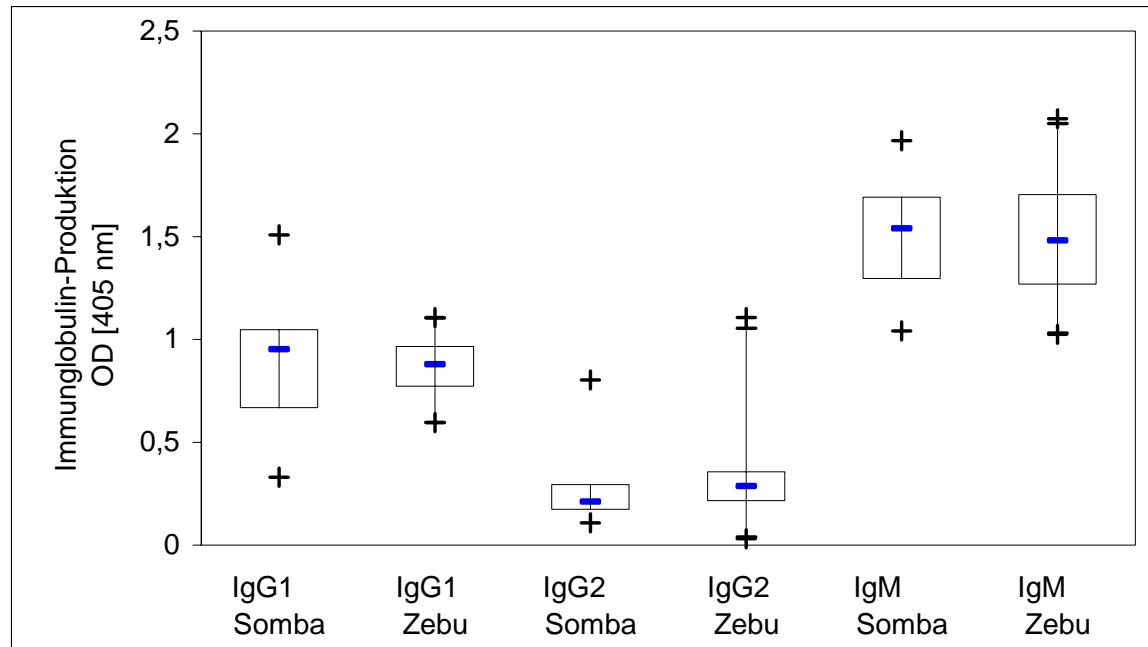
IgG2 zeigte eine positive Korrelation zur Reaktivität auf SGE in niedriger Konzentration.

Die Zunahme der Zellproliferation in Gegenwart des IL-10-neutralisierenden Antikörpers ging mit einer niedrigeren IgG2-Produktion einher.

#### 4.3.3. IgM

Zebus zeigten gegenüber Somba-Rindern leicht niedrigere IgM-Spiegel. Rinder mit einer Stimulation durch Zeckenantigene zeigten niedrigere IgM-Werte als jene mit einer Suppression, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Zur Anzahl der Leukozyten bestand eine positive und zu der der Lymphozyten eine negative Korrelation. Tiere mit höherer IgM- Produktion zeigten eine stärkere Proliferation unstimulierter Zellen gegenüber SGE.



**Abb. 15:** Produktion parasitenspezifischer Immunglobuline bei Somba- und Zebu-Rindern. Dargestellt sind Median, 25-75%- Intervall, Minimum und Maximum.

### 4.4. Parasitologische Untersuchung der Blutausstriche

In fünf Blutproben wurden *Trypanosoma spp.* gefunden. Eine dieser Proben wurde wegen Hämolyse und wegen des schlechten Allgemeinzustandes des betreffenden Tieres von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

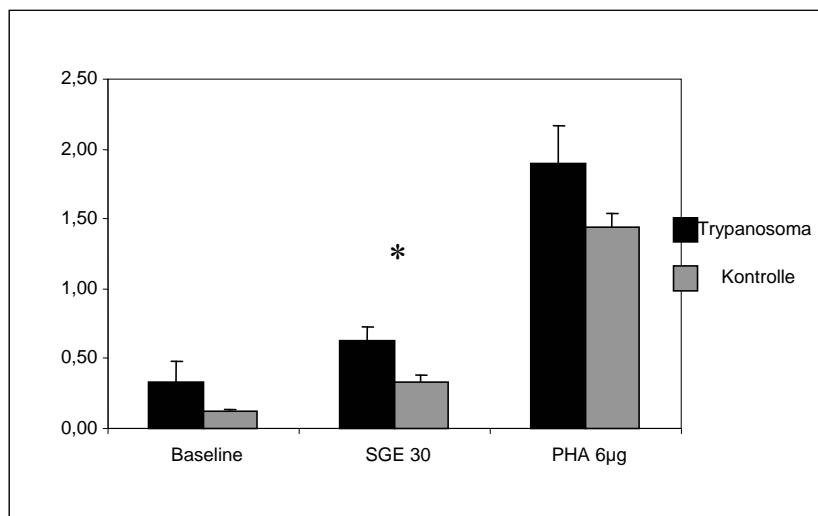
Alle Tiere mit Trypanosomose waren Zebus. Sie zeigten sowohl eine erhöhte spontane als auch unspezifische (PHA) und spezifische Reaktivität (SGE) der Lymphozyten. Signifikant erhöht war die Proliferation nur bei der Stimulation mit SGE ohne Mitogen ( $p \leq 0,05$ ) (Abb.16).

Außerdem konnten bei 61 % der Tiere *Theileria spp.* nachgewiesen werden. Nach dem äußereren Erscheinungsbild sowie nach dem Auftreten des Vektors *A. variegatum* wurden sie der Art *Th. mutans* zugeordnet.

Andere Blutparasiten konnten lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

## Ergebnisse

---



**Abb. 16:** Lymphozytenproliferation bei Stimulation mit Mitogen (PHA 6 $\mu$ g/ml) und Antigen (SGE 30  $\mu$ g/ml) bei Rindern mit oder ohne Trypanosomose. Dargestellt sind Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern. Signifikante Unterschiede sind mit \* markiert.

## 5. Diskussion

### 5.1. Zelluläre Immunantwort

#### 5.1.1. Lymphozyten-Transformationstest

Im Lymphozyten-Transformationstest wurden die spontane und mitogeninduzierte zelluläre Reaktivität und ihre Beeinflussbarkeit durch Zeckenspeicheldrüsenenzyme getestet und im Rassenvergleich beurteilt.

Die spontane Proliferation der Lymphozyten ohne Zusatz von Zeckenantigen oder Mitogenen war bei Zebu- und Somba-Rindern nahezu gleich. Auch Ramachandra und Wikle (1995) erkannten keine Unterschiede zwischen *B. taurus*- und *B. indicus*-Rindern.

Unterschiede zwischen den beiden Rassen zeigten sich weiterhin weder bei allein mitogenstimulierten noch bei allein antigenstimulierten Lymphozyten. Ramachandra und Wikle (1995) fanden dagegen bei *B. indicus*- im Vergleich zu *B. taurus*- Rindern eine um 34,5% höhere unspezifische Reaktivität auf das Mitogen ConA. Sie erklärten mit diesem höheren Ausgangswert einen höheren Grad an Immunität bei Zebu-Rindern, auch wenn das Ausmaß der Suppression bei beiden Rassen ähnlich war. Turni et al. (2002) und Piper et al. (2010) konnten diese Befunde wiederum nicht bestätigen.

Eine Stimulation mit Zeckenspeicheldrüsenantigen führte bei Tieren beider Rassen zu einer Steigerung der Proliferation. Piper et al. (2009) konnten dagegen keine Reaktion auf eine alleinige Stimulation mit SGE von *R. microplus* feststellen, ebensowenig Kovár et al. (2001) bei *I. ricinus*. Dieser Befund weist darauf hin, daß bei Immunreaktionen gegen *A. variegatum* ein von den bisher beschriebenen Zecke-Wirt-Kombinationen abweichendes Proliferationsverhalten vorliegt.

Bei verschiedenen Zeckenspezies wurde bisher eine suppressive Wirkung des Zeckenspeichels auf die Lymphozytentransformation beschrieben. Turni et.al. (2002) fanden bei Brahman-Rindern eine signifikante Reduktion der Proliferation ConA-stimulierter Lymphozyten durch SGE von *R. microplus* (80 µg/ml) um 89% und bei Hereford-Rindern um

41% (n.s.). Bei einer niedrigeren Konzentration (10 µg/ml) war die Suppression weniger ausgeprägt (Brahman 21%, Hereford 34%; n.s.). Ramachandra und Wikle (1995) beschrieben bei ConA-stimulierten Lymphozyten nach Zugabe von SGE der Zecke *D. andersoni* eine signifikante Suppression um 11 – 90%, abhängig von der Saugdauer der Zecken und der im Proliferationsassay eingesetzten SGE-Konzentration. Zwischen taurinen und zeboiden Rindern konnten sie keine Unterschiede beobachten.

Koney et al. (1994b) beschreiben bei von Zecken befallenen Holstein-Friesian-Rindern eine Reduktion der ConA-stimulierten Proliferation auf die Hälfte im Vergleich zu nicht befallenen Tieren. Bei zeckeninfestierten Zebu-Rindern zeigte sich ebenfalls eine Reduktion, von Zecken befallene N'Dama-Rinder hatten dagegen eine den zeckenfreien Zebu-Rindern vergleichbare Proliferation. Damit konnten sie die Hypothese einer Immunsuppression durch Zecken unterstützen, die bei angepassten lokalen Rinderrassen jedoch schwächer oder gar nicht ausgeprägt war.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich bei Zugabe von SGE der Zecke *A. variegatum* zu PHA-stimulierten Lymphozyten bei Einzeltieren Änderungen in Form einer Abnahme um bis zu 43% , aber auch einer Steigerung der Proliferation um bis zu 42% (30 µg/ml: +34, -20; 3 µg/ml: +42, -29; 1,5µg/ml +24, -43). Die Mittelwerte zeigten jedoch keine signifikanten Änderungen. Nach Rassen aufgetrennt lagen die Werte der Somba-Rinder im Mittel höher, signifikant höher waren sie jedoch nur bei einer Konzentration von 3 mg/ml SGE. In der Gruppe der Somba-Rinder reagierten 69 % der Tiere mit einer Steigerung der Proliferation und 31% mit einer Abnahme. In der Gruppe der Zebus waren die Verhältnisse nahezu ausgewogen, es reagierten 52 % mit einer Zunahme und 48 % mit einer Abnahme (n.s.).

Stimulierende Effekte von Zeckenspeicheldrüsenprodukten von *A. variegatum* beschreiben auch Rolníková et al. (2003) bei PHA-stimulierten humanen Lymphozyten. Ihre Befunde reichen von einer Zunahme der Proliferation um 79% bei SGE von ungesaugten weiblichen *A. variegatum* über 34,6% bei 2 Tage gesaugten bis zu einer Abnahme um 57,5 % bei 9 Tage gesaugten weiblichen *A. variegatum*. Auch männliche *A. variegatum* hatten bei PHA-stimulierten humanen Lymphozyten leicht stimulierende Effekte. Bei nicht mitogenstimulierten und bei ConA-stimulierten Lymphozyten überwogen hingegen die supprimierenden Effekte beider Geschlechter, auch bei SGE von *I. ricinus* und *R. appendiculatus* zeigten sich supprimierende Effekte. Es ist bekannt, dass im Verlauf des

Saugaktes neue Proteine in den Speicheldrüsen der Zecken exprimiert werden und sich dadurch die Zusammensetzung der biologisch wirksamen Bestandteile im Speichel ändert (Sonenshine 1991; Sauer et al. 1995). Dadurch können sowohl supprimierende als auch stimulierende Effekte resultieren. Rolníková et al. (2003) vermuteten, dass eine stimulierende Wirkung bei ungesaugten bzw. 2 Tage gesaugten *A. variegatum* nicht im Fehlen immunsupprimierender Substanzen begründet ist, sondern eher im Dominieren der Bestandteile ohne immunsuppressive Eigenschaften.

Mejri et al. (2002) fanden bei Mäusen eine dosisabhängige Inhibition der Proliferation naiver ConA-stimulierter Milzzellen durch SGE. Bei Lymphknotenzellen dagegen, die vorher Kontakt zu Zeckenantigenen hatten, ergaben sich bei geringeren SGE-Konzentrationen stimulierende, bei höheren wiederum supprimierende Effekte. Sie vermuteten, dass wegen der stärkeren und längeren Exposition und daher einer größeren Speichelmenge die suppressiven über die stimulierenden Effekte überwiegen. Hier wird jedoch auch der Unterschied zwischen immunologisch naiven Zellen und Zellen mit vorherigem Antigenkontakt deutlich. Eine Stimulation der Proliferation durch *I. ricinus* beschreiben auch Ganapamo et al (1995) bei Lymphozyten von Mäusen, sie konnten allerdings nur Auswirkungen auf regionale Lymphknoten, aber keinen systemischen Effekt feststellen.

Damit existieren zwischen verschiedenen Zeckenspezies offensichtlich deutliche Unterschiede. Bei *I. ricinus*, *D. andersoni*, *R. appendiculatus* und *R. microplus* wurden überwiegend suppressive Effekte bewiesen (Bergman et al. 1995; Schoeler et al. 2000; Kovář et al. 2001; Turni et al. 2002); im Gegensatz dazu konnten Rolníková et al. (2003) bei *A. variegatum* stimulierende Effekte zeigen, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt.

Bei der Herstellung des Antigenextraktes für die vorliegende Arbeit kamen neben den Speicheldrüsen adulter weiblicher *A. variegatum* zu einem geringen Anteil auch Speicheldrüsen von männlichen Zecken zum Einsatz, die verwendeten weiblichen Zecken wiesen außerdem unterschiedliche Saugzustände auf. Die resultierende Überlagerung könnte die stimulierenden bzw. supprimierenden Effekte daher weniger ausgeprägt erscheinen lassen. Ein Antigenextrakt aus Speicheldrüsen von Zecken mit weniger breit gestreuten Saugzuständen würde möglicherweise zu einem einheitlicheren Ergebnis führen, gibt aber andererseits nicht die natürlichen Verhältnisse wieder.

Die Immunantwort hängt neben der Parasit-Wirt-Kombination und der Dauer ihrer Koevolution auch von anderen Faktoren ab, u. a. dem Grad der Sensibilisierung (Erst- oder wiederholte Infestation), Allgemeinzustand, Alter, Geschlecht des Wirtstieres. In der vorliegenden Untersuchung handelt es sich im Gegensatz zu anderen Studien mit kleinen, gut charakterisierten Gruppen von Versuchstieren (höchstens 5 Tiere pro Rasse, gleiches Alter, gleiches Geschlecht, gleiche Herkunft, standardisierte Aufzucht- und Haltungsbedingungen und kein vorangegangener Kontakt mit Zecken) um eine Feldstudie mit einem sehr weit gefächerten Spektrum an Tieren (Alter 1-5 Jahre, männliche und weibliche Tiere, meist nicht nachvollziehbare Herkunft, traditionelle Haltungssysteme mit freilaufenden Tieren, Kontakt zu Zecken und anderen Ekto- und Endoparasiten, Krankheitserregern und weiteren Umwelteinflüssen), woraus auch ein uneinheitlicher Immunstatus resultiert, mit dem sich möglicherweise die sehr heterogenen Reaktionen (Suppression, keine Änderung, Stimulation der Immunantwort) auf die Stimulation mit Zeckenantigen erklären lassen.

Mäuse können im Verlauf mehrerer Zeckeninfestationen eine partielle Immunität entwickeln und damit immunsupprimierende Faktoren im Zeckenspeichel teilweise neutralisieren (Wikl, 1996). Dossa et al. (1996) beschrieb bei Boran-Rindern die Entwicklung einer Immunität im Verlauf von mehreren Infestationen, gemessen an der Anzahl der erfolgreich saugenden Nymphen und Adulten von *A. variegatum*. Jongejan et al. (1989) und Inokuma et al. (1993) sahen dagegen bei Rindern einen Zusammenhang zwischen der Parasitenlast und dem Grad der Immunsuppression, die mit jedem Befall zunahm. In der vorliegenden Untersuchung konnte jedoch zumindest im Hinblick auf das Alter der Tiere und damit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Immunität (oder im Gegenteil einer Immunsuppression) keine Zusammenhänge mit der Proliferationsfähigkeit gefunden werden. Andere Faktoren, wie der Ernährungs- oder Gesundheitszustand des Tieres, müssen hier aber ebenfalls bedacht werden.

Da das Mitogen PHA hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, ConA hingegen CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten zur Proliferation anregt, können Unterschiede zwischen PHA- bzw. ConA-Stimulation bei der gleichen Zeckenspezies durch die Reaktivität verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen bedingt sein. Rolníková et al. (2003) fanden Unterschiede in der Reaktion humaner Lymphozyten auf SGE von *R. appendiculatus* zwischen der Stimulation mit ConA oder PHA, hier trat nur bei PHA und Inkubation mit 6 Tage gesaugten

weiblichen *R. appendiculatus* eine Stimulation auf, sonst zeigte sich eine Suppression. Auf SGE von männlichen *A. variegatum* reagierten PHA-stimulierte Lymphozyten mit einer leichten Proliferationssteigerung, ConA-stimulierte mit einer deutlichen Suppression.

Auch Katial et al. (1998) beschreiben deutliche Unterschiede im Zytokinmuster in Abhängigkeit vom verwendeten Mitogen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Stimulation könnte also darin begründet sein, dass PHA als Mitogen verwendet wurde, im Gegensatz zu anderen Studien, in denen ConA verwendet wurde.

Ein enger Zusammenhang war zwischen der Reaktion auf unspezifische Stimulation durch Mitogene und den verschiedenen Antigen-Mitogenkombinationen festzustellen, das könnte bedeuten, dass eine starke Reaktion auf SGE- Stimulation hauptsächlich durch die starke Reaktion auf Mitogenstimulation bedingt ist und nur zu einem geringeren Teil durch die spezifische Reaktion gegen SGE-Antigene. Da aber auch zwischen der Reaktion auf alleinige Antigenstimulation und auf unspezifische Mitogenstimulation sowie Mitogen-Antigenkombination ein deutlicher Zusammenhang sichtbar wurde, ist die Reaktion zu einem Teil auch der spezifischen Reaktion gegen Zeckenspeicheldrüsenantigen zuzuschreiben.

### 5.1.2. Produktion von Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ist das wichtigste von Th1-Lymphozyten gebildete Zytokin. Es regt Makrophagen und Natürliche Killerzellen zur Phagozytose und Abtötung von intrazellulären Pathogenen (z.B. Babesien, Theilerien, Mykobakterien) an und ist an der Bildung opsonisierender IgG2 durch B-Lymphozyten beteiligt. Durch IFN- $\gamma$  wird die Produktion von IL-2 und IL-2-Rezeptor ausgelöst, was wiederum Th1-Zellen zur Proliferation anregt. Dagegen wird die Produktion von IL-4 gehemmt und damit eine Th2-Reaktion verhindert.

Ebenso wie die Zellproliferation stieg auch die Produktion des Zytokins IFN- $\gamma$  durch die Stimulation mit Mitogen und Zeckenantigen an. Im Gegensatz zur Zellproliferation zeigten sich hier Anzeichen einer dosisabhängigen Wirkung, die jedoch nicht signifikant war. Die Zunahme der Zytokinproduktion war bei Somba-Rindern stärker ausgeprägt als bei Zebus. Der Unterschied zwischen den Somba- und Zebu-Rindern war bei Kombination von Mitogen mit Antigen deutlicher als bei der Einzelstimulation mit Mitogen oder Antigen (n.s.).

Zwischen der Höhe der Proliferation und den entsprechenden Werten der Zytokinproduktion konnte keine direkte Korrelation festgestellt werden.

Bisher sind auch auf die IFN- $\gamma$ -Produktion vor allem suppressive Effekte der Zeckenspeicheldrüsenantigene bekannt. Kovar et al. (2001) fanden bei ConA- stimulierten humanen PBMC eine signifikante Reduktion der Th1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 nach Zugabe von *I. ricinus*-SGE. Die Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 dagegen erhöhte sich. Ähnliche Verhältnisse, die für eine Th2-Polarisierung der Immunantwort sprechen, beschreiben Zeidner et al. (1997) und Ferreira und Silva (1999) bei Mäusen.

Ganapamo et al. (1995) beobachteten eine starke Produktion des Th2-Zytokins IL-4 und eine geringe Produktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  bei Lymphozyten aus den Lymphknoten der Ansatzstellen bei mit *I. ricinus* befallenen BALB/c- Mäusen. Die Produktion von IFN- $\gamma$  nahm bei wiederholten Infestationen zu.

Ramachandra und Wikle (1992) beschreiben die Suppression der Makrophagenzytikone IL-1 und TNF- $\alpha$  und der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  durch SGE von *D. andersoni* auf Lymphozyten von Mäusen, bei Rindern konnten sie ebenfalls eine Suppression von IL-1 und TNF-alpha feststellen. SGE von *D. andersoni* aus frühen Saugphasen hatten jedoch bei taurinen Rindern stimulierende Effekte auf die IL-1-Produktion. Signifikante Unterschiede in der IL-1-Produktion zwischen den Rassen ergaben sich wie bei der Proliferation auch bei Mitogenstimulierung ohne Antigen, hier produzierten Makrophagen von *B. indicus* um 46% mehr IL-1. Makrophagen von *B. indicus* zeigten ebenfalls eine stärkere basale IL-1-Produktion (Ramachandra und Wikle, 1995). Piper et al. (2009) fanden keine Unterschiede in der Genexpression von IFN-  $\gamma$  bei Holstein-Friesian-Rindern und Brahman-Zebus, dagegen aber eine Zunahme von IL-2, IL-2-Rezeptor und TNF- $\alpha$  bei Brahman-Rindern und erkannten darin eine Resistenzentwicklung auf der Basis einer stabilisierten, T-Zell-medierten Immunreaktion.

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion liefert in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des LTT dagegen Hinweise darauf, dass bei natürlich exponierten autochtonen Rindern durch SGE von *A. variegatum* keine Immunsuppression und typische Th2-Polarisierung verursacht wird. Besonders auffällig zeigt sich das bei der westafrikanischen Lokalrasse Somba.

### 5.1.3. Untersuchungen mit IL-10-neutralisierendem Antikörper

IL-10 ist ein regulatorisches und antiinflammatorisches Zytokin, das von Th2- Lymphozyten und Monozyten gebildet wird. Es inhibiert die T-Zell-Proliferation indirekt durch eine Hemmung der Costimulation durch Makrophagen (Brown et al, 1994; Mbow et al., 1994; Ding und Shevach 1992). Der inhibitorische Effekt kann durch die Zugabe von IL-10-neutralisierenden Antikörpern aufgehoben werden.

Ganapamo et al. (1996) führten die reduzierte T-Zell-Proliferation von *I. ricinus*-infestierten Mäusen neben einer Interaktion mit dem Adhäsionsfaktor Laminin auf die starke IL-10-Produktion dieser Zellen zurück. Kopecký et al. (1999) fanden bei Splenozyten von Mäusen als Reaktion auf *I. ricinus*-SGE eine im Gegensatz zur supprimierten IFN- $\gamma$ -Produktion stark erhöhte Produktion des Th-2-Zytokins IL-10 und postulierten eine Beteilung von IL-10 am suppressiven Effekt von SGE auf die Produktion von IFN- $\gamma$ . Durch IL-10-neutralisierende Antikörper konnte diese Suppression aufgehoben werden.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich nach Zugabe von IL-10-neutralisierenden Antikörpern keine signifikanten Änderungen der Proliferation bei beiden Rassen. Das würde bestätigen, dass keine durch SGE von *A. variegatum* ausgelöste, auf IL-10 beruhende Suppression vorlag.

Im Gegensatz dazu zeigt die IFN- $\gamma$ -Produktion nach Zugabe des IL-10- neutralisierenden Antikörpers eine deutliche Zunahme, vor allem bei Somba-Rindern. Das könnte bedeuten, dass hier eine Th2-Verschiebung bestand, nach deren Ausschaltung das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  ansteigt. Darauf ergaben sich bei den anderen Untersuchungen jedoch keine Hinweise.

Bei Rindern wird IL-10 im Gegensatz zu Mäusen nicht nur von Th2-Zellen gebildet und ist gegen Th1-Zellen gerichtet, sondern von Th0, Th1- und Th2- Klonen. Ebenso konnte auch die Proliferation aller Subpopulationen durch IL-10 unterdrückt und durch exogenes IL-2 wiederhergestellt werden. Die Zytokinexpression der Th0-Zellen war ebenfalls betroffen. Auch die Expression des IL-2-Rezeptors von T-Zell-Klonen wird durch IL-10 unterdrückt, jedoch nicht IL-2 selbst (Chitko-McKown et al, 1995).

Th0-Zellen, die sowohl IFN- $\gamma$  und IL-2 als auch IL-10 und IL-4 produzieren, machen bei Rindern einen großen Anteil der CD4+-Zellen aus (Tizard, 2004). Auch Kemp et al. (1999) beschreiben IL-10 und IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen, wahrscheinlich als regulatorische Zellen, die die Balance zwischen Th1 und Th2-Reaktionen gewähren sollen. Möglicherweise führt

daher die Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers nicht im gleichen Maße zu einer Verschiebung des Zytokinspektrums, wie es von anderen Spezies bekannt ist.

Eine weitere Besonderheit bei Wiederkäuern sind  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die bis zu 50% der zirkulierenden Lymphozyten beim Rind darstellen, beim Menschen und bei Mäusen dagegen nur bis zu 15%, und auch die Funktionen scheinen sich deutlich zu unterscheiden. Insbesondere  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem Epitop WC1 spielen durch ihre Produktion von IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle, sie lösen z.B. bei intrazellulären Infektionen eine Th1-Polarisierung aus und haben wichtige Funktionen bei der T-Zell-Regulation und Antigenpräsentation (Guzman et al, 2012). Die meisten  $\gamma\delta$ -Zellen zeigen den Phänotyp WC1+CD2-CD4-CD8-. Verschiedene Subtypen weisen weitere Unterschiede auf, so zeigen WC1.1-positive Zellen, die vor allem bei Jungtieren vorhanden sind, Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion oder in Th1-polarisierten Kulturen IFN- $\gamma$ -Produktion ohne Proliferation, WC1.2-positive Zellen dagegen zeigten eine schwächere IFN- $\gamma$ -Produktion, aber eine stärkere Proliferation. Beide Typen produzieren IL-10 und TGF- $\beta$ , aber kein IL-4. WC1.1 und WC1.2-positive Zellen haben also zugleich effektorische und regulatorische Fähigkeiten (Rogers et al, 2005).

Maslanka et al. (2012) konnten bei WC1+-Zellen die simultane Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 feststellen, wobei bei WC1+CD25- Zellen die IFN- $\gamma$ -Produktion überwiegt, bei WC1+CD25+ dagegen die von IL-10. Damit haben letztere auch suppressorische Fähigkeiten, diese können aber wegen dem geringen Anteil von ca. 5% der gesamten WC1-Lymphozyten von untergeordneter Bedeutung sein.

Nach Hoek et al. (2009) wirken beim Rind nur WC1(+)-Lymphozyten als regulatorische Zellen und produzieren IL-10, die beim Menschen und bei Mäusen als wichtigste regulatorische Zellen geltenden CD25+-Lymphozyten dagegen nicht, was nochmals die Unterschiede zu den Verhältnissen beim Menschen verdeutlicht.

Eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Produktion in Anwesenheit des IL-10-neutralisierenden Antikörpers, wie sie in der vorliegenden Arbeit auftrat, könnte somit exakt der Situation eines Th1-polarisierten Milieus entsprechen, unter der WC1.1-positive Zellen eine deutliche IFN- $\gamma$ -Produktion, aber keine nennenswerte Proliferation zeigen.

#### **5.1.4. Stimulation und Suppression**

Somba-Rinder zeigten eine stärkere Tendenz zu einer Proliferationssteigerung als Zebu-Rinder. 69 % der Somba reagierten mit einer Steigerung der Proliferation und 31% mit einer Abnahme. In der Gruppe der Zebus waren die Verhältnisse nahezu ausgewogen, es reagierten 52 % mit einer Zunahme und 48 % mit einer Abnahme.

Signifikante Differenzen zwischen den beiden Gruppen gab es nur bei den eosinophilen Granulozyten, die bei denjenigen Tieren erhöht waren, die eine Suppression im LTT zeigten. Leicht erhöhte IgG2-Titer bei Tieren, die auf Zeckenantigene mit einer Stimulation reagierten, verdeutlichen eine Neigung zur Th-1-Antwort. Tiere mit geringeren IgG2-Titern dagegen zeigten die Tendenz zur stärkeren Proliferation in Anwesenheit des IL-10-neutralisierenden Antikörpers, was übereinstimmend auf eine Neigung zur Th2-Antwort bei diesen Tieren hinweist.

### **5.2. Blutbild**

Piper et al. (2009) fanden bei von Zecken befallenen Holstein-Friesian-Rindern leicht erhöhte Leukozytenwerte, die Werte waren auch signifikant höher als bei Brahman-Zebus. Sie werteten dies als Resistenzentwicklung vorrangig im Sinne einer angeborenen inflammatorischen Immunantwort. Ähnlich berichten Rechav et al. (1990) von höheren Leukozytenwerten bei von Zecken befallenen Simmentaler-Rindern als bei Brahman-Zebus, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden. Zwischen Lymphozyten und der Stärke des Zeckenbefalls gab es keine Zusammenhänge (Rechav, 1987).

In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich keine signifikanten Rassenunterschiede in bezug auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Auffällig war bei beiden Rassen die Häufung von Tieren mit einer Lymphozytose. Zwischen der Anzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild und der Reaktion im Lymphozyten-Proliferationstest gab es keine Zusammenhänge. Ein anderer Grund für eine Lymphozytose wäre eine durch Theilerien verursachte Lymphoproliferation.

Zu beachten ist, dass Veränderungen im Blutbild sich allein durch höhere Umgebungstemperaturen ergeben können, so zeigten Zebu-Rinder bei 30°C eine Zunahme

der neutrophilen Granulozyten und gleichzeitig eine Abnahme der Lymphozyten, verglichen mit Werten bei 10°C (Olbrich et al, 1972).

Die wahrscheinlichste Erklärung für verminderte oder erhöhte Leukozyten- und Lymphozytenwerte sind aber Sekundärinfektionen im Zusammenhang mit Zeckenbefall oder davon unabhängige bakterielle oder virale Erkrankungen. Außer den typischen TBD wie Babesiose, Theileriose, Anaplasmosis, Herzwasser, Dermatophilose und den weit verbreiteten Helminthosen kommen im Untersuchungsgebiet häufig Krankheiten wie Fasciolose, Pasteurellose, Brucellose, Stomatitis papularis, Rift-Valley-Fieber, Lumpy-Skin-Disease, Clostridiosen und Dermatomykosen vor, vereinzelt gibt es auch Ausbrüche von MKS, Lungenseuche oder Rinderpest (Lawrence et al., 1990). Für den Einfluss solcher Sekundärinfektionen spricht auch der hohe Anteil der Tiere, die Neutrophilenwerte außerhalb des Referenzbereiches aufweisen. Besonders auffällig war bei 41% der Tiere eine Neutropenie, ein sehr häufiger möglicher Grund dafür könnte eine Trypanosomose sein, der Zusammenhang konnte in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht bestätigt werden. Die bei 16% der Tiere vorgefundene Monozytose spricht auch für das gehäufte Auftreten überstandener oder chronischer Infektionskrankheiten.

Bei einer Th2-Polarisierung gehören neutrophile neben eosinophilen Granulozyten zum vorherrschenden Zelltyp der humoral-allergischen Reaktion, das könnte allerdings vor allem die Verhältnisse an der Ansatzstelle der Zecken betreffen (Constantinoiu et al., 2010).

Nachgewiesene Infektionen in dieser Arbeit waren *Trypanosoma spp.* und *Theileria spp.* Dagegen konnten Babesien nicht nachgewiesen werden, obwohl sie im Untersuchungsgebiet endemisch sind. Möglicherweise lag das daran, dass das Blut aus der V. jugularis entnommen wurde, Babesien aber besser im peripheren bzw. kapillären Blut, z.B. aus dem Ohr, nachgewiesen werden können. Außerdem ist der lichtmikroskopische Nachweis der genannten Blutparasiten vor allem bei inapparenten oder chronischen Infektionen von geringer Sensitivität und Spezifität und liefert keine sichere Diagnose.

Signifikant erhöht waren dagegen in der vorliegenden Untersuchung die eosinophilen Granulozyten der Somba- gegenüber denen der Zebu-Rinder. Das deckt sich mit Beobachtungen von Claxton und Leperre (1991), die bei N'Dama-Rindern mehr zirkulierende Eosinophile fanden als bei Zebu-Rindern, obwohl Zebus mehr Endo- und Ektoparasiten aufwiesen. Rechav et al. (1990) beschreiben im Gegensatz dazu eine Korrelation zwischen

der Zahl der saugenden Zecken und der zirkulierenden Eosinophilen bei Brahman- und Simmentaler-Rindern, hier zeigten die Simmentaler sowohl mehr Eosinophile als auch mehr Zecken. Nach Claxton und Leperre (1991) geht eine Zunahme der Eosinophilen also mit einer Entwicklung von Immunität einher, nach Rechav et al. (1990) nicht. Hier können jedoch auch wieder rassebedingte Unterschiede zutage treten, so fand Rechav (1987) bei Hereford-Rindern keine Auswirkungen der Befallsstärke auf die Zahl der Eosinophilen. Geringere Zahlen zirkulierender Eosinophiler könnten auch eine Auswanderung aus dem Blutstrom und eine Konzentration in der Haut an den Ansatzstellen der Zecken darstellen. An den Ansetzstellen der Zecken gelten Eosinophile neben Basophilen als wichtige Effektorzellen und treten gehäuft bei resistenten Tieren auf (Latif et al., 1991; Carvalho et al, 2010).

Andere Ursachen für eine Eosinophilie könnte auch ein starker Befall mit Parasiten des Gastrointestinaltraktes sein.

Eine Zunahme der Eosinophilen deutet andererseits auf eine humoral-allergische Immunantwort hin. Diese entwickelt sich im Rahmen einer Th2-Reaktion und zeigt sich weiterhin in einer Produktion von IgG1 und einer verminderten Zellproliferation. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Höhere Anteile der Eosinophilen am Gesamtblutbild könnten also eine Neigung der Somba-Rinder zur Th2-Reaktion darstellen. Andererseits könnten die vermehrten Eosinophilen der Somba-Rinder auch wie bei Claxton und Leperre (1991) ein Anzeichen für Immunität sein. Da keine Zeckenzählung am Einzeltier durchgeführt wurde, kann diese Frage nicht abschließend beantwortet werden.

### **5.3. Parasitenspezifische Immunglobuline**

Die humorale Immunantwort läuft unter Bildung spezifischer Antikörper ab. Obwohl bei der Immunreaktion gegen Zecken Antikörper gegenüber der zellulären Immunität eine untergeordnete Rolle spielen und möglicherweise keine protektive Wirkung haben, lassen sich anhand der vorrangig gebildeten Antikörperklassen Rückschlüsse auf den Ablauf der Immunreaktion ziehen. IgG1-Antikörper werden von B-Lymphozyten auf Stimulation durch IL-4 gebildet und gehören damit der Th2-Reaktion an, IgG2 entstehen dagegen nach Stimulation durch das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$ .

Wie auch bei Piper et al. (2009) beschrieben, war IgG1 gegenüber IgG2 der dominierende Antikörpertyp. Zwischen den Rassen gab es bei keiner der Antikörperklassen signifikante Unterschiede, aber eine starke individuelle Streuung. Auch Claxton und Leperre (1991) fanden keine Unterschiede in der Höhe der *A. variegatum*-spezifischen Antikörper, trotz Unterschieden in der Befallsstärke.

Bei Rindern mit starker Produktion von parasitenspezifischem IgG1 war sehr häufig auch IgG2 erhöht, möglicherweise traf das vor allem auf stark von Zecken befallene Tiere zu.

Mejri et al. (2001) fanden bei mehrmals mit *I. ricinus*- Nymphen infestierten BALB/c-Mäusen spezifische IgG1, jedoch keine IgG2 und konnten damit eine Th2-Polarisierung bestätigen. Signifikant erhöhte antigenspezifische IgG1-Produktion beschreiben Piper et al. (2009) bei Holstein-Friesian-Rindern gegenüber Brahman. Da aber IgG1 generell die am häufigsten auftretende Subklasse ist, muss das kein Beweis für eine Polarisierung sein. Die Beobachtung, dass in der vorliegenden Untersuchung Tiere mit höherer IgG1-Produktion ebenfalls einen höheren Anteil eosinophiler Granulozyten im Blutausstrich zeigten, könnte allerdings eine Th2-Polarisierung bedeuten. Piper et al. (2009) werten die höheren IgG1-Titer bei taurinen Rindern als eine, zumindest partielle, erworbene T-Zell-Reaktion.

Neben individuellen Schwankungen könnten auch saisonale Veränderungen im Verlauf der Befallsstärke an der starken Variation der Immunglobulin-Titer verantwortlich sein, was aber wegen des geringen Stichprobenumfangs in der vorliegenden Arbeit nicht bewertet werden konnte. Bei einer Verlaufsuntersuchung könnte auch ein eventueller Wechsel von der frühen Antikörperklasse IgM zu den träger reagierenden IgG beurteilt werden.

Bei der Interpretation der Immunglobulin-Titer darf die Befallsstärke nicht außer acht gelassen werden. So fanden Inokuma et al. (1993) bei starkem Befall mit *R. microplus* eine verringerte Antikörperproduktion, Kashino et al. (2005) beschreiben ebenfalls geringere IgG1- und IgG2-Titer bei suszeptiblen gegenüber resistenten Rindern vor allem bei starkem Befall. So könnte die humorale Immunantwort zumindest bei empfänglichen Rassen supprimiert sein. Piper et al. (2009) fanden jedoch höhere IgG1-Titer bei Holstein-Friesian-Rindern, sie erklären die Unterschiede zu anderen Studien mit Veränderungen im Verlauf der saisonalen Entwicklung der Befallsstärke. Cruz et al. (2008) berichten bei schwerem Befall von einer Erhöhung der IgG-Titer, ein leichter Befall führte zu einer Abnahme, beide

Reaktionen wurden von einer Immunitätsentwicklung begleitet. Möglicherweise spiegeln die Antikörpertiter nur die Befallsstärke wider, ohne etwas über eine Immunität auszusagen. Durch das Infestationslevel kann also die Größenordnung der humoralen Reaktion und vielleicht auch der Immunmechanismus beeinflusst werden, es muss aber nicht generell mit Immunität gekoppelt sein (Cruz et al., 2008). Alle Autoren weisen auch auf eine starke Variation in der Höhe der Antikörpertiter hin.

Die Bedeutung der humoralen Reaktion wird auch durch das Vorhandensein IgG-bindender Proteine im Zeckenspeichel betont (Wang et al., 1999). Ein IgE-bindendes Protein ist dagegen nicht bekannt, auch sind spezifische IgE- Antikörper bei suszeptiblen Rassen erhöht, aber nicht bei resistenten, was auch darauf hinweisen könnte, dass IgG der bedeutende schützende Isotyp ist (Kashino et al 2005).

Zebu-Rinder zeigten geringgradig höhere IgG2-Spiegel als Somba, diese wiederum geringgradig höhere IgG1-Spiegel. Diese Befunde könnten andeuten, dass Zebu-Rinder eher zu einer Th1-Reaktion neigen als Somba.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Speicheldrüsenenzymen von *Amblyomma variegatum* auf die zelluläre und humorale Immunreaktion bei zwei verschiedenen afrikanischen Rinderrassen in einem Feldversuch vergleichend überprüft.

Während bisher gegen verschiedene in tropischen Gebieten auftretende Zeckenspezies bei Rindern typische immunsupprimierende Effekte beschrieben wurden, konnte das bei einer Infestation mit *A. variegatum* weder für Zebu-Rinder noch die taurine Rasse Somba bestätigt werden. Die Ergebnisse aus dem Lymphozyten-Stimulationstest ergaben in Übereinstimmung mit der Produktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  keine Anzeichen für eine Immunsuppression oder eine Verschiebung zur humoral-allergischen, mit verminderter Resistenz gegen Zecken verbundenen Th2- Immunantwort. Untersuchungen mit IL-10-neutralisierenden Antikörpern lieferten außerdem Hinweise darauf, dass statt einer auf IL-10 beruhenden Immunsuppression sogar eine Tendenz zu einer Th1-Polarisierung vorliegen könnte. Zwischen den beiden untersuchten Rassen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede, die taurinen Somba-Rinder ließen anhand der Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion eine stärkere Reaktionsfähigkeit der zellulären Immunantwort vermuten, Zebu-Rinder zeigten dafür bei der Immunglobulinproduktion eher eine Hinwendung zur schützenden Th1-Reaktion. Ob die bei Somba-Rindern in höherer Zahl auftretenden Eosinophilen einer Abwehrschwäche oder eher einer Resistenzentwicklung entsprechen, bleibt fraglich. Es zeigt sich, dass Ergebnisse aus bisher untersuchten Zecke-Wirt-Paaren nicht bedenkenlos übertragen werden dürfen. Neben erheblichen Einflüssen sowohl der Zeckenspezies als auch der Wirtstierart und sogar der Rasse spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle.

Tiere verschiedener Rassen und damit unterschiedlicher genetischer Komposition können in der gleichen Umgebung gegen den gleichen Parasiten parallel Immunität aufbauen, die aber auf unterschiedlichen Mechanismen beruht und sich auch unabhängig voneinander entwickelt hat. In früheren rassevergleichenden Studien wurden taurine Rinderrassen meist mit Rassen europäischen Ursprungs gleichgesetzt, die im Rahmen von Veredelungsprogrammen in den letzten 100-200 Jahren in die tropische Landwirtschaft eingeführt wurden. Im Unterschied hierzu stellt die taurine Rinderrasse Somba eine autochthone westafrikanische Rinderrasse dar, daher lässt sich möglicherweise auch nicht die für Zebu-Rinder häufig postulierte bessere Widerstandsfähigkeit bestätigen. Insgesamt zeigen beide Rinderrassen eine gute Anpassung an ihre Umgebung und damit auch die Herausforderung durch den Parasiten *A. variegatum*.

## 7. Summary

In the present study the effects of salivary gland extracts of the tick *Amblyomma variegatum* on the cellular and humoral immune response of two different breeds of African cattle were investigated in a field trial in central Togo, West Africa.

Ticks of tropical regions are known to have immunosuppressive effects in cattle, but there is no evidence for the same effect in West African (*B. indicus*) or Somba (*B. taurus*) cattle naturally infested by *A. variegatum*. Lymphocyte proliferative responses consistent with elaboration of IFN-gamma did not show immunosuppression or a TH2 polarization correlated with tick susceptibility. Investigations with IL-10-neutralizing antibody indicate that there may be a slight TH1 polarization. Furthermore, between the two breeds of cattle there are no significant differences. Somba cattle may have a more vigorous immune response with lymphocyte proliferation and cytokine production, on the other hand Zebu cattle tend to a production of immunoglobulin subclasses according with the TH1 profile. It is not clear whether the higher counts of eosinophilic granulocytes in Somba cattle are sign of resistance or susceptibility.

Results obtained from other tick-host-constellations cannot directly be conferred on *A. variegatum* infestations in African cattle. Immune reactions are influenced by host or tick species and other factors.

Animals of different breeds and genetic backgrounds challenged with the same parasite in the same environment can develop similar degree of resistance based on different mechanisms. In contrast to former comparative studies with European *B. taurus* breeds introduced in tropical management systems in the last centuries, West African Somba cattle are representing a indigenous breed. This may explain why the higher degree of tick resistance postulated for Zebu cattle can not be confirmed in this study.

Finally it can be concluded that both breeds of African cattle are suitable for traditional agriculture in tropical regions, particularly for the challenge by *A. variegatum*.

## **8. Literaturverzeichnis**

- Agbede, R.I., Kemp, D.H., 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. *Int. J. Parasitol.* 16, 35-41.
- Allen, J.R., Khalil, H. M., Wikle, S.K., 1979. Langerhans cells trap salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *J. Immunol.* 122, 563-565.
- Andrade, B.B., Texeira C.R., Barral, A., Barral-Netto, M., 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 77, 665-693. doi: 10.1590/S0001-37652005000400008.
- Asselbergs, M., Lopes Pereira, C.M., 1989. Damage by *Amblyomma hebraeum* in Local (*Bos indicus*) Cattle in Mozambique. Proceedings of the 6th International conference of Institutions of Tropical Veterinary Medicine. Wageningen, The Netherlands, 358-360.
- Authié, E., Pobel, T., 1990. Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomosis under natural conditions of challenge- early indications of individual susceptibility to disease. *Vet. Parasitol.* 35, 43-59.
- Baron, R.W., Weintraub, J., 1987. Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (de Vill.) and *H. bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Vet. Parasitol.* 24, 285-296.
- Barré N., Garris G., Camus E., 1995. Propagation of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean. *Rev. Sci. Tech.* 14, 841-855.
- Barriga, O.O., Adujar, F., Sahibi, H., Andrzejewski, W.J., 1991b. Antigens of *Amblyomma americanum* ticks recognized by repeatedly infested sheep. *J. Parasitol.* 77, 710-716.
- Barriga, O.O., da Silva, S.S., Azevedo, J.S., 1993. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.* 79, 710-715.
- Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds), 1996. The biology of Disease Vectors. Univ. Pr. of Colorado.
- Bechara, G.H., Morelli Júnior, J., Szabó, M.P., 2000. Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. *Ann. NY Acad. Sci.* 916, 570-575.
- Bergman, D.K., Palmer, M.J., Caimano, M.J., Radolf, J.D., Wikle S.K., 2000. Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J. Parasitol.* 86, 516-525.
- Bergman, D.K., Ramachandra, R.N., Wikle S.K., 1995. *Dermacentor andersoni*: salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to concanavalin A in vitro. *Exp. Parasitol.* 81, 262-271.

- Betz, M., Fox, B.S., 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146, 108-113.
- Borský, I., Hermánek, J., Uhlír, J., Dusbábek, F., 1994. Humoral and cellular immune response of BALB/c mice to repeated infestations with *Ixodes ricinus* nymphs. *Int. J. Parasitol.* 24, 127-132.
- Bowman, A.S., Dillwith, J.W., Sauer, J.R., 1996. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol. Today* 12, 388-396.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brake, D.K., Pérez de Léon A.A., 2012. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary gland of *Rhipicephalus microplus*. *Parasit. Vectors* 38: 5. doi: 10.1186/1756-3305-5-38
- Brossard, M., Wikle, S.K., 2008. Tick immunobiology. In: Bowman, A.S., Nuttall, P.A. (Eds), *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, NY, 186-204. doi: 10.1017/CBO9780511551802.010.
- Brown, S.J., Askenase, P.W., 1981. Cutaneous basophil responses and immune resistance of guinea pigs to ticks: passive transfer with peritoneal exudate cells or serum. *J. Immunol.* 83, 213-223.
- Brown, S.J., Askenase, P.W., 1982. Blood eosinophil and basophil responses in guinea pigs parasitized by *Amblyomma americanum* ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 593-598.
- Brown, S.J., Askenase, P.W., 1986. *Amblyomma americanum*: Physicochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. *Exp. Parasitol.* 62, 40-50.
- Brown, S.J., Worms, M.J., Askenase, P.W., 1983. Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). IV. Differences in blood basophil kinetics in hosts parasitized by ixodid and argasid ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 897-902.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Palmer, G.H., Chantler, S.E., Estes, D.M., 1999. Bovine CD4(+) T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infect. Immun.* 1999 67, 155-164.
- Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C., Estes D.M., 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 45-55.
- Brown, W.C., Suarez, C.E., Shoda, L.K., Estes, D.M., 1999. Modulation of host immune responses by protozoal DNA. *Vet. Immun. Immunopathol.* 72, 87-94.

- Brown, W.C., Woods, V.M., Chitco-McKown, C.G., Hash, S.M., Rice-Ficht, A.C., 1994. Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect. Immun.* 62, 4697-4708.
- Carvalho, W.A., Franzin, A.M., Abatepaulo, A.R., de Oliveira, C.J., Moré, D.D., da Silva, J.S., Ferreira, B.R., de Miranda Santos, I.K., 2010. Modulation of cutaneous inflammation induced by ticks in contrasting phenotypes of infestation in bovines. *Vet. Parasitol.* 167, 260-273.
- Chitko-McKown, C.G., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Brown, W.C., 1995. Interleukin-10 downregulates proliferation and expression of interleukin-2 receptor p55 chain and interferon-gamma, but not interleukin-2 or interleukin-4, by parasite-specific helper T cell clones obtained from cattle chronically infected with *Babesia bovis* or *Fasciola hepatica*. *J. Interferon Cytokine Res.* 15, 915-922.
- Claxton, J., Leperre, P., 1991. Parasite burdens and host susceptibility of Zebu and N'Dama cattle in The Gambia. *Vet. Parasitol.* 40, 293-304.
- Constantinoiu, C.C., Jackson L.A., Jorgensen W.K., Lew-Tabor A.E., Piper E.K., Mayer D.G., Venus B., Jonsson N.N., 2010. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Int. J. Parasitol.* 40, 865-75. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.004.
- Cruz, A.P., Silva, S.S., Mattos, R.T., Da Silva Vaz Jr, I., Masuda, A., Ferreira, C.A., 2008. Comparative IgG recognition of tick extracts by sera of experimentally infested bovines. *Vet. Parasitol.* 158, 152-158.
- de Castro, J.J., 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71, 77-97.
- de Castro, J.J., Newson, R.M., 1993. Host resistance in cattle tick control. *Parasitol. Today* 9, 13-17.
- Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., Shevach, E.M., 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* 151, 1224-1234.
- Ding, L., Shevach, E.M., 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* 148, 3133-3139.
- Dossa, S.C., Kaaya, G.P., Essuman, S., Odulaja, A., Assoku, R.G., 1996. Acquisition of resistance to the tick *Amblyomma variegatum* in Boran cattle, *Bos indicus* and the effects of *Trypanosoma congolense* and *Babesia bigemina* on host resistance. *Vet. Parasitol.* 62, 317-330.

- Eckert, J., Friedhoff K.T., Zahner, H., Deplazes, P. (Eds), 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart, 575 pp.
- Elbl, A., Anastos, G., 1966. Ixodid Ticks (Acarina, Ixodidae) of Central Africa. Volume 1. General introduction. Genus *Amblyomma* Koch, 1844. Ann. du musée Royal de l'Afrique Centrale, Série in 8vo, Sciences Zoologiques, 275 pp.
- Estes, D.M., Brown, W.C., 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 1-10.
- Estes, D.M., Closser, N.M., Allen, G.K., 1994. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell. Immunol.* 154, 287-295.
- Estes, D.M., Hirano, A., Heussler, V.T., Dobbelaere, D.A., Brown, W.C., 1995. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cell. Immunol.* 163, 268-279.
- Ferreira, B.R., Silva J.S., 1998. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 279-293.
- Ferreira, B.R., Silva J.S., 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology* 96, 434-439
- Ferreira, B.R., Szabo, M.J., Cavassani, K.A., Bechara, G.H., Silva, J.S., 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Vet. Parasitol.* 115, 35-48.
- Fivaz, B.H., 1989. Immune suppression induced by the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *J. Parasitol.* 75, 946-952.
- Fivaz, B.H., 1990. Immunological response of the rabbit host to infestation by the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina:Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 9, 219-238.
- Francischetti, I.M., Sa-Nunes, A., Mans, B.J., Santos, I.M., Ribeiro, J.M., 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.* 14, 2051-2088.
- Frisch, J.E., 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* 29, 57-71.
- Fuchsberger, N., Kita, M., Hajnicka, V., Imanishi, J., Labuda, M., Nuttall, P.A., 1995. Ixodid Tick salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 671-676.
- Ganapamo, F., Rutti, B., Brossard, M., 1995. In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* 85, 120-124.

- Ganapamo F., Rutti B., Brossard M., 1996. Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the in vitro responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology* 87, 259-263.
- Ganapamo F., Rutti B., Brossard M., 1997. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site. *Parasitology* 115, 91-96.
- Gillespie, R.D., Dolan, M.C., Piesman, J., Titus, R.G., 2001. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol.* 166, 4319-4326.
- Gueye, A., Mbengue, M., Diouf, A., Sonko, M.L., 1993. Ticks and hemoparasitoses in livestock in Senegal. V. The northern Guinea area. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46, 51-561.
- Guo, X., Booth, C.J., Paley, M.A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S., Montgomery, R.R., 2009. Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infect. Immun.* 77, 2320-2329. doi: 10.1128/IAI.01507-08.
- Guzman, E., Price, S., Poulsom, H., Hope, J., 2012. Bovine  $\gamma\delta$  T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 161-167.
- Hajnická, V., Kocáková P., Slávíková, M., Slovák M., Gasperík, J., Fuchsberger, N., Nuttall, P.A., 2001. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* 23, 483-489.
- Hajnická, V., Vancová, I., Kocáková P., Slovák M., Gasperík, J., Slávíková, M., Hails, R.S., Labuda, M., Nuttall, P.A., 2005. Manipulation of host cytokine network by ticks. A potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130, 333-342.
- Heinze, D.M., Carmical, J.R., Aronson, J.F., Thangamani, S., 2012a. Early immunologic events at the tick-host interface. *PLoS ONE* 7:e47301. doi: 10.1371/journal.pone.0047301.
- Hoek, A., Rutten, V.P., Kool, J., Arkesteijn, G.J., Bouwstra, R.J., Van Rhijn, I., Koets, A.P., 2009. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet. Res.* 40, 6. doi: 10.1051/veteres:2008044.
- Hoogstraal, H. (Ed.), 1956. African ixodidae. Vol. I. Ticks of the Sudan. 1956
- Hoogstraal, H., Aeschlimann, A., 1982. Tick-Host Specificity. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 55, 5-32
- Inokuma, H., Kemp, D.H., Kerlin, R.L., 1994. Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine

- mononuclear cells to mitogen. *Vet. Parasitol.* 53, 293-299.
- Inokuma, H., Kerlin, R.L., Kemp, D.H., Willadsen, P., 1993. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Vet. Parasitol.* 47, 107-118.
- Jongejan, F., Pegram, R.G., Zivkovic, D., Hensen, E.J., Mwase, E.T., Thielemans, M.J., Cossé, A., Niewold, T.A., el Said, A., Uilenberg, G., 1989. Monitoring of naturally acquired and artificially induced immunity to *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks under field and laboratory conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 181-199.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 1994. Ticks and control methods. *Rev. Sci. Tech.* 13, 1201-1226.
- Kashino, S.S., Resende, J., Sacco, A.M., Rocha, C., Proença, L., Carvalho, W.A., Firmino, A.A., Queiroz, R., Benavides, M., Gershwin, L.J., De Miranda Santos, I.K., 2005. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp. Parasitol.* 110, 12-21.
- Katial, R.K., Sachanandani, D., Pinney, C., Lieberman, M.M., 1998. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 78-81.
- Kemp, K., Kemp, M., Kharazmi, A., Ismail, A., Kurtzhals, J.A., Hviid, L., Theander, T.G., 1999. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 500-504.
- Koney, E.B., Morrow, A.N., Heron, I., Ambrose N.C., Scott, G.R., 1994b. Lymphocyte proliferative responses and the occurrence of dermatophilosis in cattle naturally infested with *Amblyomma variegatum*. *Vet. Parasitol.* 55: 245-256.
- Koney, E.B., Walker A.R., Heron, I.D., Morrow A.N., Ambrose N.C., 1994a. Seasonal prevalence of ticks and their association with dermatophilosis on cattle on the Accra plains of Ghana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 47, 163-167.
- Konstatinov, O.K., 1990. Ticks of the ixodidae family as reservoir of arboviruses in the Republic of Guinea. II. Arboviruses. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 43, 15-22.
- Kopecký, J., Kuthejlová, M., 1998. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunol.* 20, 169-174.
- Kopecký, J., Kuthejlová, M., Pechová, J., 1999. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite immunol.* 21, 351-356.
- Kovár, L., Kopecký, J., Ríhová, B., 2001. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T-lymphocytes in human PBMC culture. *J. Parasitol.* 87, 1342-1348.

- Kramer, C.D., Poole N.M., Coons, L.B., Cole, J.A., 2011. Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage cell line, IC-21. *Exp. Parasitol.* 127, 665-671. doi: 10.1016/j.exppara.2010.11.012.
- Kubes M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffová, E., Nuttall, P.A., 1994. Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity in vitro. *Immunology* 82, 113-116.
- Kubes M., Kocáková, P., Slovák, M., Sláviková, M., Fuchsberger, N., Nuttall P.A., 2002. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. *Parasite Immunol.* 24, 23-28.
- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Stepánová, G., Macela, A., 2001. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse mycrophages. *Infet. Immun.* 69, 575-578.
- Latif, A.A., Punyua D.K., Capstick, P.B., Nokoe, S., Walker, A.R., Fletcher, J.D., 1991. Histopathology of attachment sites of *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus* on zebu cattle of varying resistance to ticks. *Vet. Parasitol.* 38, 127-132.
- Lawrence, P.R., Lawrence, K., Dijkman, J.T., Starkey, P.H. (Eds), 1990. Research for development of animal traction in West Africa. Proceedings. Ethiopia, Addis Ababa.
- Legel, S. (Ed.), 1989. Nutztiere der Tropen und Subtropen, Bd 1. Hirzel Verlag, Leipzig.
- Maillard, J.C., Kemp, S.J., Naves, M., Palin, C., Demangel, C., Accipe, A., Maillard, N., Bensaid, A., 1993. An attempt to correlate cattle breed origins and diseases associated with or transmitted by the tick *Amblyomma variegatum* in the French West Indies. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46, 283-290.
- Marufu, M.C., Chimonyo, M., Mans, B.J., Dzama, K., 2013. Cutaneous hypersensitivity responses to *Rhipicephalus* tick larval antigens in pre-sensitized cattle. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 311-316.
- Maslanka, T., Jaroszewski, J.J., Markiewicz, W., Ziolkowski, H., Barski, D., 2012. The presence of CD25 on bovine WC1+ gammadelta T cells is positively correlated with their production of IL-10 and TGF-beta, but not IFN-gamma. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 11-20.
- Mattioli, R.C., Bah, M., Faye, J., Kora, S., Cassama, M., 1993. A comparison of field tick infestation on N'Dama, Zebu and N'Dama x Zebu crossbred cattle. *Vet. Parasitol.* 47, 139-148.
- Mattioli, R.C., Pandey, V.S., Murray, M., Fitzpatrick, J.L., 2000. Immunogenetic influences on tick resistance in African cattle with particular reference to trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) and Trpanosusceptible Gobra zebu (*Bos indicus*) cattle. *Acta Trop.* 75, 263-277.

- Mbow, M.L., Rutti, B., Brossard, M., 1994. Infiltration of CD4+ CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1 alpha and TNF-alpha in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* 82, 596-602.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., Brossard, M., 2001. Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol.* 23, 61-69.
- Mejri, N., Rutti, B., Brossard, M., 2002. Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 88, 192-197.
- Merino, O., Alberdi, P., Perez de la Lastra, J.M., de la Fuente, J., 2013. Tick vaccines and the control of tick borne pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 30. doi: 10.3389/fcimb.2013.00030.
- Merlin, P., 1986. Hematological standards of the Gudali zebu in the high planes northwest Cameroon. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 39, 403-407
- Morel, P.C., 1969. Contribution à la connaissance de la distribution des tiques (Acariens, Ixodidae et Amblyommidae) en Afrique Ethiopienne Continentale. Annexe Cartographique. Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, Paris.
- Morrow, A.N., Arnott, J.L., Heron, I.D., Koney, E.B., Walker, A.R., 1993. The effect of tick control on the prevalence of dermatophilosis on indigenous cattle in Ghana. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46, 317-322.
- Nene, V., Lee, D., Quackenbush, J., Skilton, R., Mwaura, S., Gardner, M.J., Bishop, R., 2002. AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick *Amblyomma variegatum*. *Int. J. Parasitol.* 32, 1447-1456.
- Neubert, H., 1983. Zebuzucht. Karl-Marx-Universität, Leipzig.
- Neumann, L.G., 1899. Révision de la famille des Ixodides. 3e mémoire. Mémoires de la Société Zoologique de France 14, 249-372.
- Norval, R.A., Sutherst R.W., Kurki J., Kerr J.D., Gibson J.D., 1997. The effects of the brown ear-tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, on milk production of Sanga Cattle. *Med. Vet. Entomol.* 11, 148-154.
- Olbrich, S.E., Martz, F.A., Tumbleson, M.E., Johnson, H.D., Hildebrand, E.S., 1972. Effects of constant environmental temperatures of 10 °C and 31 °C on serum biochemical and hematological measurements of heat-tolerant and cold-tolerant cattle. *Comp. Biochem. Physiol.* 41, 255-266.
- Oliveira C.J., Sa-Nunes, A., Francischetti, I.M., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J.S., Santos I.K., Ribeiro, J.M., Ferreira B.R., 2011. Deconstructing tick saliva: non-protein

- molecules with potent immunomodulatory properties. *J. Biol. Chem.* 286, 10960-10969. doi: 10.1074/jbc.M110.205047
- Paine, G.D., 1982. Ticks (Acari: Ixodoidea) in Botswana. *Bull. Entomol. Res.* 72, 1-16.
- Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* 15, 281-286.
- Payne, W.J.A. (Ed.), 1990. *An Introduction to Animal Husbandry in the Tropics*. Blackwell Science, London.
- Pegram, R.G., 1976. Ticks (Acarina, Ixodoidea) of the northern regions of the Somali Democratic Republic. *Bull. Entomol. Res.* 66, 345-366.
- Pegram, R.G., Oosterwijk, G.P., 1990. The effect of *Amblyomma variegatum* on liveweight gain of cattle in Zambia. *Med. Vet. Entomol.* 4, 327-330.
- Piper, E.K., Jackson, L.A., Bielefeldt-Olmann, H., Gondro, C., Lew-Tabor, A.E., Jonsson, N.N., 2010. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. *Int. J. Parasitol.* 40, 431-441.
- Piper, E.K., Jonsson, N.N., Gondro C., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P., Vance, M.E., Jackson, L.A., 2009. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1074-1086.
- Ramachandra, R.N., Wikle, S.K., 1992. Modulation of host-immune responses by tick (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entom.* 29, 818-826.
- Ramachandra, R.N., Wikle, S.K., 1995. Effects of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *B. taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro elaboration and lymphocyte blastogenesis. *J. Med. Entomol.* 32, 338,345
- Randolph, S.E., 1994. Population dynamics and density-dependent seasonal mortality indices of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* in eastern and southern Africa. *Med. Vet. Entom.* 8, 351-368.
- Rechav, Y., 1987. Resistance of Brahman and Hereford cattle to African ticks with reference to serum gamma globulin levels and blood composition. *Exp. Appl. Acarol.* 3, 219.232.
- Rechav, Y., 1990. Resistance of Brahman and Simmental cattle to southern African ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 57, 7-12.
- Ribeiro, J.M., 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.* 64, 347-353

- Ribeiro, J.M., 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp. Parasitol.* 69, 104-106.
- Ribeiro, J.M., Anderson, J.M., Manoukis, N.C., Meng, Z., Francisetti, I.M., 2011. A further insight into the sialom of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics* 12, 136. doi: 10.1186/1471-2164-12-136.
- Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive Properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161, 332-344.
- Ribeiro, J.M., Weis J.J., Telford, S.R. 3rd, 1990. Saliva of *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70, 382-388.
- Rogers, A.N., VanBuren, D.G., Hedblom, E., Tilahun, M.E., Telfer, J.C., Baldwin, C.L., 2005. Function of ruminant gammadelta T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 211-217.
- Rolniková, T., Kazimirová, M., Buc, M., 2003. Modulation of human lymphocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid ticks (Acari:Ixodidae): effect of feeding stage and sex. *Folia Parasitol.* 50, 305-312.
- Rosenberg, R., 1984. Humorale Reaktionen bei Rindern nach mehrmaligem Besatz mit *Rhipicephalus appendiculatus*, *Hyalomma anatomicum anatomicum* und *Amblyomma variegatum* sowie dessen Einfluß auf der Zeckenentwicklung. Inaugural-Dissertation Universität München, 52 S.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2007. Prostaglandin E2 ist a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J. Immunol.* 179, 1497-1505.
- Sauer, J.R., McSwain, J.L., Bowman, A.S., Essenberg, R.C., 1995. Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 245-267.
- Schoeler, G.B., Manweiler, S.A., Bergman, D.K., Wikle, S.K., 2000. Influence of repeated infestation with pathogen-free *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) on in vitro lymphocyte proliferation responses of C3H/HeN mice. *J. Med. Entomol.* 37, 885-892.
- Schoeler, G.B., Manweiler, S.A., Wikle, S.K., 1999. *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestation with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp. Parasitol.* 92, 239-48.
- Schorderet, S., Brossard, M., 1993. Changes in immunity to *Ixodes ricinus* by rabbits infested at different levels. *Med. Vet. Entomol.* 7, 186-192.
- Shapiro, S.Z., Voigt, W.P., Ellis, J.A., 1989. Acquired resistance to ixodid ticks induced by tick cement antigen. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 33-41.

- Shaw, A.P.M., Hoste, C.H., 1987. Trypanotolerant cattle and livestock development in west and central Africa: Trypanotolerant cattle in the national livestock economies. FAO, Rome.
- Sileghem, M.R., Flynn, J.M., Saya R., Williams D.J., 1993. Secretion of co-stimulating cytokines by monocytes and macrophages during infection with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* in susceptible and tolerant cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37, 123-134.
- Sonenshine, D.E. (Ed), 1991. Biology of Ticks. Oxford University Press
- Stachurski, F., 1993. Impact of natural infestation of *Amblyomma variegatum* on the liveweight gain of male Gudali cattle in Adamawa (Cameroon). *Vet. Parasitol.* 49, 299-311
- Stachurski, F., 2000. Invasion of West African cattle by the tick *Amblyomma variegatum*. *Med. Vet. Entomol.* 14, 391-399.
- Strother, G.R., Burns, E.C., Smart, L.I., 1974. Resistance of purebred Brahman, Hereford, Brahman times Hereford crossbred cattle to the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acarina: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 11, 559- 63.
- Sutherst, R.W., Maywald G.F., 1985. A computerised system for matching climates in ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 13, 281-299.
- Tatchell, R.J., Easton E., 1986. Tick (Acari: Ixodidae) ecological studies in Tanzania. *Bull. Entomol. Res.* 76, 229-246.
- Theiler, G., 1962. The ixodoidea parasites of vertebrates in Africa south of the Sahara (Ethiopian region). Project 9958. Report of the Director of Veterinary Services, Onderstepoort.
- Tizard, I.R. (Ed.), 2004. Veterinary Immunology. An introduction. Elsevier, Philadelphia, USA. 494 pp.
- Trigona, W.L., Brown, W.C., Estes, D.M., 1999. Functional implications for signaling via the IL4R/IL13R complex on bovine cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 73-79.
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329-4341.
- Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine* 20, 3560-3568.
- Tuo, W., Estes, D.M., Brown, W.C., 1999. Comparastive effects of interleukin-12 and

- interleukin-4 on cytokine responses by antigen-stimulated memory CD4+ T cells of cattle: IL-12 enhances IFN- gamma production, whereas IL-4 has marginal effects on cytokine expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 741-749.
- Turni, C., Lee, R.P., Jackson L.A., 2002. Effect of salivary gland extracts from the tick, *Boophilus microplus*, on leukocytes from Brahman and Hereford cattle. *Parasite Immunol.* 24, 355-361.
- Turni, C., Lee, R.P., Jackson L.A., 2007. The effects of salivary gland extracts from *Boophilus microplus* ticks on mitogen-stimulated bovine lymphocytes. *Vet.Res. Commun.* 31, 545-552.
- Uilenberg, G., 1990. The spread of the tick *Amblyomma variegatum* in the Caribbean: how can this serious problem be explained and what should be done? *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 43, 297-299.
- Urioste, S., Hall, L.R., Telford, S.R. 3rd., Titus, R.G., 1994. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *J.Exp. Med.* 180, 1077-1085.
- Vančová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Nuttal, P.A., 2010b. Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding. *Vet. Parasitol.* 167, 274-278. doi : 10.1016/j.vetpar.2009.09.029.
- Walker, A.R., Fletcher, J.D., 1987. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. *Int. J. Parasitol.* 17, 1393-1411.
- Walker J.B., 1974. The ixodid ticks of Kenya. London: Commonwealth institute of Entomology. 220 pp.
- Walker, J.B., Olwage, A., 1987. The tick vectors of Cowdria Ruminantium (Ixodoidea, Ixodidae, Genus *Amblyomma*) and their distribution. *Onderstepoort J. vet. Res.* 54, 353-379.
- Wang, H., Nuttal, P.A., 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood feeding parasite. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 286-295.
- Wheeler, C.M., Coleman, J.L., Habicht, G.S., Benach, J.L., 1989. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: development of acute inflammation in the skin and immune responses to salivary gland, midgut, and spirochetal components. *J. Infect. Dis.* 159, 265-273.
- Whelen, A.C., Wikel, S.K., 1993. Acquired resistance of guinea pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by humoral factors. *J. Parasitol.* 79, 908-912.
- Wikel, S.K., 1984. Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation- an overview. *Vet. Parasitol.* 14, 321-339.

- Wikel, S.K., 1996. Tick modulation of host cytokines. *Exp. Parasitol.* 84(2), 304-309.
- Wikel, S.K., Alarcon-Chaidez, F.J., 2001. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Vet. Parasitol.* 101, 275-287
- Willadsen, P., 1980. Immunity to ticks. *Adv. Parasitol.* 18, 295-303.
- Willadsen, P., Jongejan, F., 1999. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today* 15, 258-262.
- Willadsen, P., Kemp, D.H., 1988. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol. Today* 4, 196-198.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, H., Yang, H., Ma, D., Li, J., LI, D., Lai, R., Yu, H., 2010. Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *J. Biol. Chem.* 285, 16606-166013. doi: 10.1074/jbc.M109.094615.
- Yeoman, G.H., 1968. Field vector studies of epizootic East Coast Fever. V. The occurrence of *Boophilus decoloratus* in the East Coast fever zones. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.* 16, 7-20.
- Yonow, T., 1995. The life cycle of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae): a Literature Synthesis with a View to Modelling. *Int. J. Parasitol.* 25, 1023-1060.
- Zeidner, N., Mbow, M.L., Dolan, M., Massung, R., Baca, E., Piesman, J., 1997. Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: introduction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* 65, 3100-3106.

## **9. Verzeichnis der Abkürzungen**

anti-IL-10	Interleukin 10-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
DTH	Delayed Type Hypersensitivity, verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
HRP	Horse Radish Peroxidase
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LT <sub>T</sub>	Lymphozytentransformationstest
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Millimolar
n	Stichprobenumfang
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

## *Verzeichnis der Abkürzungen*

---

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PHA	Phythämagglutinin
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute", Zellkulturmedium
SGE	Salivary Gland Extract, Zeckenspeicheldrüsenextrakt
SI	Stimulationsindex
TBD	Tick Borne Disease
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
Th0,1,2	T-Helfer-Lymphozyten vom Typ 0,1,2
TMB	Tetramethyl-Benzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
WC	Workshop Cluster

## **10. Danksagung**

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München, für sein freundliches Interesse an meiner Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Problemen und für seine Geduld.

Ich danke Herrn Dr. Stefan Geiger für die Vergabe des Dissertationsthemas, den Kontakt zu Herrn Prof. Dr. Peter Soboslay vom Institut für Tropenmedizin in Tübingen, die Einarbeitung in die Thematik und für die Vorbereitung des Auslandsaufenthaltes.

Herrn Prof. Dr. Peter Soboslay danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor in Sokodé und für seine Betreuung und Hilfe bei Problemen. Ebenso geht eine ganz herzlicher Dank an alle afrikanischen und deutschen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die gute und fröhliche Zusammenarbeit und eine unvergessliche, schöne Zeit!

Allen Mitarbeiten am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München danke ich für ein gutes Arbeitklima.

Der Forschungsaufenthalt in Togo wurde durch den Deutschen Akademischen Auslandsdienst finanziert, wofür ich mich hiermit bedanke.

Den größten Dank verdient meine Familie für ihre Unterstützung und Liebe. Ein ganz besonderer Dank an Uwe. Danke, dass ich mich immer auf Euch verlassen kann!