

**Einfluss einer Narkose auf die Vitalität peripherer Leukozyten  
und die Entwicklung eines Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release  
assays für die Untersuchung von Rotwildblut**

von Christina Geiwagner

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

**Einfluss einer Narkose auf die Vitalität peripherer Leukozyten  
und die Entwicklung eines Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release  
assays für die Untersuchung von Rotwildblut**

von Christina Geiwagner  
aus Altötting

München 2018

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

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

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

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

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

**Tag der Promotion:** 10. Februar 2018

**meinen Eltern**

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Immunologie .....</b>	<b>4</b>
1.1	T-Lymphozyten .....	4
1.1.1	Unterteilung der T-Lymphozyten.....	4
1.1.2	Zytokinproduktion.....	7
1.1.3	Bedeutung in der zellvermittelten Immunantwort (CMI) infolge von Tuberkulose (TB) .....	9
1.2	Interferone .....	11
1.2.1	Typ-I-Interferone.....	12
1.2.2	Typ-II-Interferon .....	13
1.3	Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) .....	16
1.4	Einfluss einer Anästhesie auf die Zellen des Immunsystems .....	19
1.4.1	Immunologische Auswirkungen operativer Eingriffe unter Anästhesie ....	19
1.4.2	Direkter Einfluss von Anästhetika auf Immunzellen .....	21
<b>2</b>	<b>Tuberkulose beim Rotwild .....</b>	<b>24</b>
2.1	<i>Mycobacterium caprae</i> und <i>Mycobacterium bovis</i> als Erreger.....	24
2.2	Infektion und Pathogenese .....	27
2.3	Vorkommen.....	30
2.4	Epidemiologie .....	35
2.5	Bedeutung als Zoonose .....	37
2.6	Tuberkulose bei weiteren Wildtieren .....	38
<b>3</b>	<b>Diagnose der Tuberkulose beim Rotwild .....</b>	<b>40</b>
3.1	Post mortem Diagnose .....	40
3.2	Ante mortem Diagnose.....	44
3.2.1	Intrakutantest .....	46
3.2.2	Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) release assay .....	48
3.2.2.1	Geschichtlicher Hintergrund .....	48
3.2.2.2	Prinzip des IFN- $\gamma$ release assays .....	48
3.2.2.3	Vor- und Nachteile des IFN- $\gamma$ release assays gegenüber dem Intrakutantest.....	50
3.2.2.4	Verwendung in der TB-Überwachung von Wildtierpopulationen.....	52

---

III	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>54</b>
1	<b>Tiere.....</b>	<b>54</b>
1.1	Bovine Blutproben .....	54
1.2	Cervide Blutproben .....	59
2	<b>Geräte, Materialien und Reagenzien.....</b>	<b>64</b>
3	<b>Stimulation der Vollblutproben.....</b>	<b>66</b>
3.1	Erstellung einer Positivkontrolle.....	66
3.2	Auswahl geeigneter Stimulanzen.....	67
3.3	Stimulation .....	68
4	<b>Detektion von freigesetztem IFN-<math>\gamma</math> mit einem bovinen IFN-<math>\gamma</math>-ELISA Development Kit .....</b>	<b>69</b>
4.1	Untersuchung der Plasmaproben von Rind und Rotwild.....	69
4.2	Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$ für die Untersuchung von Rotwildplasma.....	73
5	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>75</b>
IV	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>76</b>
1	<b>Vorarbeiten zur Untersuchung der IFN-<math>\gamma</math> Freisetzung aus Plasmaproben narkotisierter Rinder .....</b>	<b>76</b>
1.1	Erstellung einer Positivkontrolle.....	76
1.2	Beurteilung verschiedener Mitogene auf deren Stimulations-Fähigkeit von Leukozyten .....	77
2	<b>Untersuchung der IFN-<math>\gamma</math>-Freisetzung in Blutplasma von Rindern vor und während einer Anästhesie mit Hilfe eines bovinen IFN-<math>\gamma</math> release assays .....</b>	<b>79</b>
2.1	Nahezu identische IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während der Anästhesie .....	80
2.2	Erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentration während der Anästhesie .....	84
3	<b>Untersuchung von Rotwildplasmaproben mit Hilfe eines bovinen IFN-<math>\gamma</math> release assays .....</b>	<b>91</b>
3.1	Messung von freigesetztem IFN- $\gamma$ aus Rotwildplasma.....	91
3.2	Vergleich der gemessenen IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus Rinder- bzw. Rotwildplasma mit dem bovinen IFN- $\gamma$ release assay .....	95

---

3.3	Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$ .....	97
<b>4</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>104</b>
<b>V</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>105</b>
<b>1</b>	<b>Einfluss einer Narkose auf die Vitalität von Rinderleukozyten.....</b>	<b>107</b>
<b>2</b>	<b>Mögliche Auswirkungen verschiedener Anästhesien auf die Zellen des Immunsystems .....</b>	<b>108</b>
<b>3</b>	<b>Anwendbarkeit des bovinen IFN-<math>\gamma</math>-ELISA Development Kit mit Rotwildblut .....</b>	<b>109</b>
<b>4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>114</b>
4.1	Validierung des Tests mit Plasma eines TB-positiven Rotwilds unter Einsatz verschiedener Peptidcocktails als Antigen-Stimulanzen.....	114
4.2	Festlegung adäquater Auswertkriterien.....	116
4.3	Einsatz von IFN- $\gamma$ release assays bei Wildtieren .....	118
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>121</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>123</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>125</b>
<b>IX</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>159</b>
<b>X</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>169</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

APC	antigen presenting cell
bTB	Bovine Tuberkulose
CCT	comparative cervical test
CFP	culture filtrate protein
CIT	cervical intradermal test
CMI	cell-mediated immune response
ConA	Concanavalin A
Ct	cycle threshold
DTM	delayed-type hypersensitivity
E <sub>o</sub>	eosinophiler Granulozyt
EMIDA	Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock
ESAT	early secretory antigen target
FV	Fleckvieh
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGRA	Interferon-gamma release assay
IL	Interleukin
IS	Insertionsfragment
LPS	Lipopolysaccharid
LVG	Lehr- und Versuchsgut
M.	Mycobacterium
mAB	monoklonaler Antikörper
MAC	<i>Mycobacterium-avium-complex</i>
M <sub>c</sub> B	Zelle der Mastzell-/Basophilen –Linie
MHC	major histocompatibility complex
MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis-complex</i>
NK	Natürliche Killerzelle

NTM	Nicht tuberkulöse Mykobakterien
NVL	non visible lesions
OD	optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
PH	Phytohaemagglutinin
PPD	purified protein derivate
PWM	Pokeweed Mitogen
QFT	QuantiFERON-TB Gold in Tube
RD	region of difference
RNI	reaktive Stickstoffverbindung
ROI	reaktive Sauerstoffverbindung
SIT	single intradermal test
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Temperatur
TB	Tuberkulose
Th-Zelle	T-Helferzelle
TMP	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TSN	Tierseuchennachrichtensystem
TST	Tuberculin-Skin-Test
Z	Zeitspanne

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Die zwei Hauptwege der spezifischen Immunität basierend auf der Abhängigkeit/Unabhängigkeit von der Phagozyten-Rekrutierung in der Effektor-Antwort.....	6
Abbildung 2:	T-Zell-Wechselwirkung abhängig von deren Zytokinproduktion.....	8
Abbildung 3:	Darmlymphknoten eines Rindes mit bTB.....	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der diagnostischen Möglichkeiten der Tuberkulose, basierend auf der CMI.....	19
Abbildung 5:	Darstellung eines charakteristischen Tuberkels infolge einer TB-Infektion.....	30
Abbildung 6:	Räumliche Verteilung von <i>M. caprae</i> RD4-Subtypen im Rotwild und Rind.....	33
Abbildung 7:	Amtlich dokumentierte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland in den Jahren 2013-2017.....	34
Abbildung 8:	Darstellung der Zeitspanne (Z) für den Transport des Blutes von den Rindern der einzelnen Narkose.....	56
Abbildung 9:	Vergleichende Darstellung der Temperaturmessung zu den drei verschiedenen Zeitpunkten: vor, während der Narkose und bei Ankunft im Institut.....	57
Abbildung 10:	Beispiel einer Indikation für eine Anästhesie beim Rotwild.....	60
Abbildung 11:	Rotwild unmittelbar nach Beschuss mit dem Blasrohr und kurz vor Eintreten der Anästhesie.....	60
Abbildung 12:	Verabreichung von Atipamezol als Antidot in den Zungengrund.....	61
Abbildung 13:	Blutentnahme bei einem anästhesierten (A) und einem geschlachteten (B) Rotwild.....	62
Abbildung 14:	Vergleichende Darstellung der Temperaturmessung zu den drei verschiedenen Zeitpunkten: während der Anästhesie, Beginn des Rücktransports und Ankunft im Institut.....	63
Abbildung 15:	Vergleichende Darstellung der erhaltenen OD-Werte für die drei erstellten Positivkontrollen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen.....	77
Abbildung 16:	Resultierende OD-Werte infolge der Stimulation von Blut im Zuge der Gewinnung der Positivkontrolle II.....	79

---

Abbildung 17:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rinderplasmaproben vor und während einer Narkose (Narkose von Tier Nr. 11) .....	81
Abbildung 18:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5) am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 13 .....	83
Abbildung 19:	Darstellung der fünf Narkosen von Tier Nr. 3, 4, 5, 11 und 13 mit nahezu identischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während der Anästhesie .....	84
Abbildung 20:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rinderplasmaproben vor und während einer Narkose (Narkose von Tier Nr. 8) .....	86
Abbildung 21:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5) am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 12 .....	88
Abbildung 22:	Darstellung der sieben Narkosen (Tier Nr. 1, 2, 7, 8, 9, 12, und 14) mit erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen während der Anästhesie .....	89
Abbildung 23:	Darstellung der mittleren OD-Werte für den IFN- $\gamma$ Standard in unterschiedlichen Konzentrationen aus allen vierzehn Narkosen inklusive der Positivkontrollen I, II und III (Abschnitt IV, 1.1) .....	91
Abbildung 24:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben zweier anästhesierter und eines toten Tieres .....	93
Abbildung 25:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in Plasma zweier anästhesierter und eines toten Rotwilds für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5) .....	95
Abbildung 26:	Vergleichende Darstellung der gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Plasma von Rindern sowie im Plasma von Rotwild .....	97
Abbildung 27:	Titration des Fangantikörpers .....	98
Abbildung 28:	Titration des Fangantikörpers .....	99
Abbildung 29:	Titration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin) .....	101
Abbildung 30:	Titration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin) .....	102

Abbildung 31:	Titration des Fangantikörpers mAB MT17.1 gegen bovines IFN- $\gamma$ unter Verwendung von Plasma eines narkotisierten Rotwilds im IFN- $\gamma$ release assay .....	112
Abbildung 32:	Titration des Detektionsantikörpers mAB MT307-biotin gegen bovines IFN- $\gamma$ unter Verwendung von Plasma eines narkotisierten Rotwilds im IFN- $\gamma$ release assay .....	113
Abbildung 33:	Darstellung der Diskriminierbarkeit der, im Bovigam® gemessenen Reaktionen auf aPPD bzw. bPPD bei einer Fehlerrate von 3% - 8% .....	117
Abbildung 34:	Darstellung der Diskriminierbarkeit der, im Bovigam® gemessenen Reaktionen auf aPPD bzw. bPPD bei einer Fehlerrate von 3% - 8% .....	118

#### **Abbildungsverzeichnis Anhang:**

Abbildung A1:	Resultierende OD-Werte im ELISA im Zuge der Erstellung von Positivkontrolle II.....	159
Abbildung A2:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Plasma, welchem eine Stimulation mit einem der drei Lektine (PWM, ConA und PH) vorausging.....	160
Abbildung A3:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5).....	161
Abbildung A4:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen.....	162
Abbildung A5:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben des Tieres aus Narkose Nr. 6.....	163
Abbildung A6:	Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben des Tieres aus Narkose Nr. 10.....	164
Abbildung A7:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben eines anästhesierten Tieres (Narkose von Rotwild Nr. 1).....	165
Abbildung A8:	Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben eines anästhesierten Tieres (Narkose von Rotwild Nr. 2) sowie eines geschlachteten Tieres (Rotwild Nr. 3).....	166

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	<i>M-caprae</i> -positive Hirsche des Rotwild-TB-Monitorings in Österreich in den Jagdjahren 2009 - 2015 .....	32
Tabelle 2:	Angezeigte <i>M.-caprae</i> -Infektionen bei Rindern in Tirol und Vorarlberg in den Jahren 2008 - 2015 .....	36
Tabelle 3:	Auflistung der Rinder, von denen Blut genommen wurde (inklusive Positivkontrollen) .....	58
Tabelle 4:	Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Untersuchung der Plasmaproben von Rindern auf freigesetztes IFN- $\gamma$ vor und während einer Narkose .....	71
Tabelle 5:	Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Untersuchung der Plasmaproben von Rotwild. ....	72
Tabelle 6:	Beispielhafte Darstellung der Plattenbelegung im Zuge der Titration des Fangantikörpers: mAB MT17.1 .....	74
Tabelle 7:	IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in Plasmaproben von Rindern .....	87
Tabelle 8:	IFN- $\gamma$ Konzentrationen (pg/ml) in Plasmaproben von Rotwild.....	94
Tabelle 9:	Titration des Fangantikörpers mAB MT17.1 gegen bovines IFN- $\gamma$ .....	100
Tabelle 10:	Titration des Detektionsantikörpers mAB MT307-biotin gegen bovines IFN- $\gamma$ .....	103
Tabelle 11:	Wilcoxon Signed Rank Test .....	104

### Tabellenverzeichnis Anhang:

Tabelle A1:	Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Erstellung einer Positivkontrolle.....	167
Tabelle A2:	Schematische Darstellung der Plattenbelegung für die Auswahl geeigneter Stimulanzen im Zuge der Herstellung einer Positivkontrolle .....	168

## I EINLEITUNG

Interferone (IFN) sind eine Gruppe von Proteinen, denen aufgrund ihrer Schutzfunktion von Zellen gegen verschiedene Antigene besondere Bedeutung zugesprochen wird und welche erstmals von Isaacs und Lindenmann im Jahre 1957 beschrieben wurden (ISAACS & LINDENMANN, 1957). Den Natürlichen Killerzellen (NK) übergeordnet, gelten T-Helfer (Th) Zellen 1 als die Hauptquelle der IFN- $\gamma$ -Produktion und die Haupteffektoren der zellvermittelten Immunantwort (cell-mediated immune response, CMI) gegen intrazelluläre Erreger (FARRAR & SCHREIBER, 1993; ROMAGNANI, 1995). Nach einmaliger Sensibilisierung mit einem Antigen reagieren entsprechende Lymphozyten bei einem erneuten Kontakt mit der Ausschüttung von IFN- $\gamma$  (MURPHY et al., 2009). Immunodiagnostische Tests, wie der Interferon-gamma release assay (IGRA) nutzen diesen Mechanismus für den Nachweis von Infektionen, z. B. mit Mykobakterien in der Tuberkulose (TB)-Diagnostik sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin. Diese Tests basieren auf der post infectionem Detektion von IFN- $\gamma$ , das infolge einer Stimulation von Vollblutproben mit spezifischen Antigenen von T-Zellen freigesetzt wird (ANDERSEN et al., 2000; WOOD & JONES, 2001; PAI et al., 2004). Demzufolge ist die Vitalität von Leukozyten als IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen, essentielle Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit solcher Tests und deren nachfolgender Interpretation.

Die Tuberkulose (TB) betreffend, spielen in Deutschland frei- und in Gefangenschaft lebende Wildtiere, speziell das Rotwild (*Cervus elaphus*), eine zunehmende Rolle als Überträger der Infektion auf das Rind, bei dem die bovine Tuberkulose eine anzeigepflichtige Tierseuche darstellt (BMJV, 2016). Seit 2008 konnten vermehrt Fälle von, mit *Mycobacterium (M.) caprae* infizierten Rindern sowie Rotwild identifiziert und eine Übertragung des Pathogens zwischen den beiden Spezies bewiesen werden (FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015). Daher liegt die Forderung nach ante mortem Diagnostikmöglichkeiten, wie einem IFN- $\gamma$  release assay für die TB-Diagnostik beim Rotwild nahe. Momentan stellt die post mortem Untersuchung der Schlachtkörper die einzige Möglichkeit dar, TB-verdächtige Läsionen beim Rotwild zu identifizieren. Verschiedenste Kontrollprogramme zur Überwachung der Tuberkulose in Wildtierpopulationen stützen sich auf eine Kombination von Schlachtieruntersuchung und

Intrakutantest, wobei der Intrakutantest aufgrund der Notwendigkeit einer, zumindest zweimaligen Manipulation der Tiere als wenig praktikabel anzusehen ist (HARRINGTON et al., 2008). Im Gegensatz dazu erfordert die Durchführung eines IFN- $\gamma$  release assays beim Wildtier nur die einmalige Gewinnung einer Blutprobe und in diesem Zusammenhang eine einmalige Immobilisation der Tiere zur Blutabnahme (WATERS et al., 2006).

Im Hinblick auf die zukünftige Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays für die TB-Diagnostik innerhalb von Rotwildpopulationen ist es wichtig zu wissen, ob die eingesetzten Narkotika im Zuge der Manipulation der Tiere Leukozyten als die Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  in ihrer Funktion beeinträchtigen und aufgrund dessen die Ergebnisse eines solchen Tests beeinflussen. Dass eine Anästhesie Zellen des Immunsystems in ihrer Funktionalität und somit die Immunantwort verändern kann, wurde in mehreren Studien dargelegt (WALTON, 1979; FELSBURG et al., 1986).

Ziel dieser Arbeit war es daher zu testen, ob die, zur Immobilisation des Rotwilds eingesetzten Anästhetika einen Einfluss auf die Vitalität von Leukozyten nehmen. Da eine Blutentnahme unter Anästhesie beim Rotwild problematisch ist, weil es sich um ein Wildtier handelt, wurde dies zunächst anhand von Vollblutproben von anästhesierten Rindern als eng verwandte Spezies überprüft. Die Proben wurden unmittelbar vor und zehn Minuten nach Beginn der Narkose genommen, wobei die eingesetzten Anästhetika jenen zur Immobilisation von Rotwild entsprachen. Gemäß den Angaben eines Wirkungseintritts der verwendeten Anästhetika infolge einer intramuskulären Injektion, wie sie beim Rotwild durchgeführt wird, wurde dieses Zeitfenster für die Blutabnahme gewählt (CLINIPHARM; CLINIPHARM). Nach einer Stimulation der Blutproben mit einem unspezifischen Lymphozyten-Stimulanz, Pokeweed Mitogen (PWM), welches vitale Leukozyten zur IFN- $\gamma$ -Ausschüttung anregt, wurde ein boviner IFN- $\gamma$ -ELISA durchgeführt und anhand der dabei erhaltenen Werte für die optische Dichte und den gegebenen Konzentrationendes IFN- $\gamma$ -Standards des Kits die genauen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der Plasmaproben berechnet. In allen stimulierten Proben der Rinder vor und während der Anästhesie konnte eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung gemessen werden. Dabei waren die erhaltenen Werte entweder nahezu identisch zu beiden Zeitpunkten der Blutentnahme oder geringfügig höher während der Narkose, was die Schlussfolgerung zuließ, dass die verwendeten Narkotika Leukozyten in ihrer

Vitalität und Aktivität in keiner Weise negativ beeinflussen.

Da Rotwild und Rind beide der Unterordnung der Wiederkäuer (*Ruminantia*) angehören, wurde nachfolgend die Vermutung aufgestellt, dass eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen cervidem und bovinem IFN- $\gamma$  besteht. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob der verwendete bovine IFN- $\gamma$  release assay ebenfalls für die Untersuchung von Rotwildblut auf freigesetztes IFN- $\gamma$  verwendet werden kann. Dazu wurden Blutproben von zwei anästhesierten und eines erlegten Rotwilds nach Stimulation mit PWM auf freigesetztes IFN- $\gamma$  mittels bovines ELISA untersucht. Dies resultierte in einer adäquaten Kreuzreaktivität von cervidem IFN- $\gamma$  und den Antikörpern des Kits gegen bovines IFN- $\gamma$ . Die Ergebnisse dieser Studie konnten zeigen, dass der kommerzielle, bovine IFN- $\gamma$ -ELISA Kit für die zukünftige Untersuchung von Rotwildblut auf das Vorkommen von IFN- $\gamma$  verwendet werden kann. Um ein diagnostisches Tool für die TB-Diagnostik beim Rotwild zu erhalten, ist allerdings eine Weiterentwicklung des Tests erforderlich.

## II LITERATURÜBERSICHT

### 1 Immunologie

Da T-Lymphozyten und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) im Zusammenhang mit dieser Studie eine übergeordnete Rolle einnehmen, wird im Folgenden der Fokus auf diese Faktoren der zellvermittelten Immunantwort (CMI) gelegt. Zudem wurde in dieser Dissertation der Einfluss einer Narkose auf die Vitalität von Leukozyten bearbeitet, weshalb auf Zusammenhänge zwischen immunologischen Funktionen und einer Anästhesie näher eingegangen wird. Im Hinblick auf die zukünftige Entwicklung eines diagnostischen Tools für die Tuberkulose (TB) beim Rotwild wurden außerdem immunologische Besonderheiten, die mit einer derartigen Infektion einhergehen aufgeführt.

#### 1.1 T-Lymphozyten

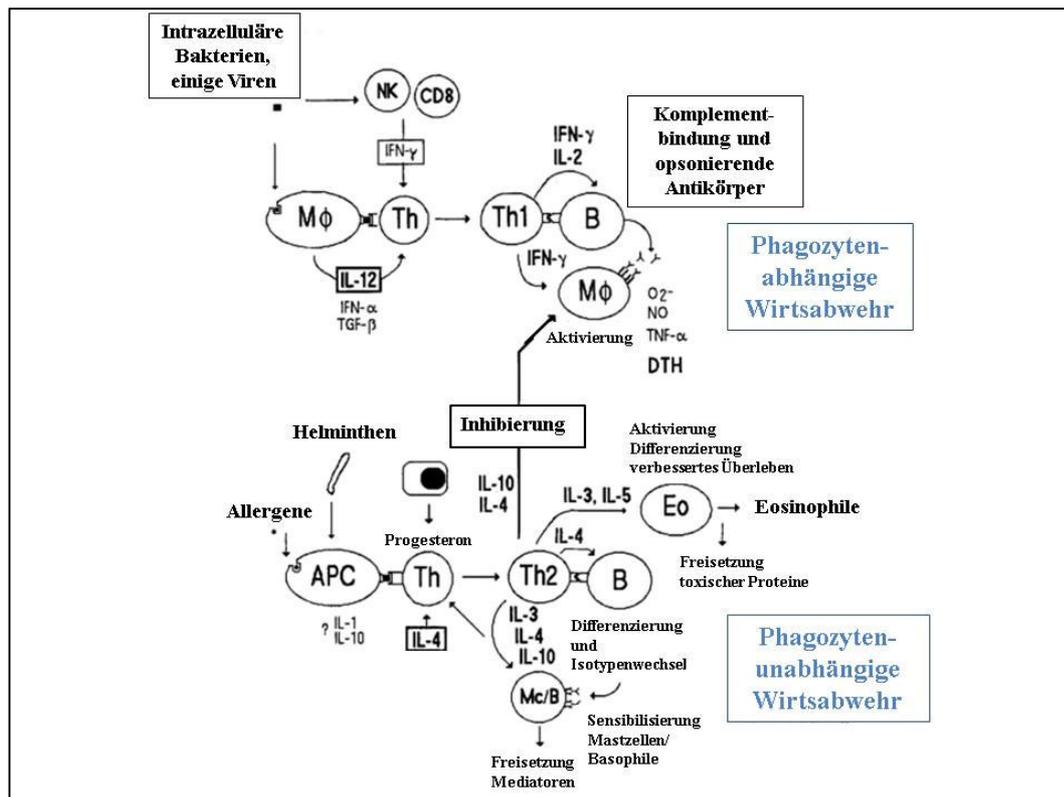
##### 1.1.1 Unterteilung der T-Lymphozyten

Bei den T-Lymphozyten unterscheidet man zwischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen als Helfer- bzw. zytotoxischen T-Zellen sowie zwischen T-Zellen mit einem  $\alpha\beta$ - bzw.  $\gamma\delta$ -Rezeptor auf ihrer Oberfläche.

Die Aktivierung von naiven T-Zellen erfolgt durch den primären Kontakt mit einem Antigen, welches von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen präsentiert wird. Co-stimulierende Moleküle, die zusätzlich zum Antigen für die Aktivierung der naiven T-Zellen notwendig sind, werden ausschließlich von diesen Zelltypen und nur in Zusammenhang mit einer Infektion exprimiert. Anschließend erfolgen eine Proliferation der T-Zellen und deren Differenzierung zu T-Effektorzellen. Dieser Vorgang wird als primäre zellvermittelte Immunantwort bezeichnet (MURPHY et al., 2009). Im Zuge der Infektion entwickeln sich aus einer Teilmenge der Effektorzellen langlebige T-Gedächtniszellen, die im Falle eines erneuten Kontakts mit dem Antigen beschleunigt reagieren können. Dabei können sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen gebildet werden. So besteht bei einem späteren Kontakt mit selbigen Antigen bereits ein Schutz (COWLEY et al., 2005).

Im Zuge der T-Zell-Reifung findet eine weitere Differenzierung in T-Helfer und zytotoxische T-Zellen statt. Erstere tragen auf ihrer Oberfläche einen CD4-Marker (CD4<sup>+</sup>-Zellen) und sind in der Erkennung von Antigenen involviert, die im Phagosom verarbeitet und anschließend in Form von Peptidfragmenten auf einem major histocompatibility complex (MHC)-II-Molekül von antigenpräsentierenden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen präsentiert werden. Zytotoxische T-Zellen hingegen sind durch den CD8-Marker auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet (CD8<sup>+</sup>-Zellen). Sie erkennen Antigene, welche im Zytosol verarbeitet wurden und im Kontext von MHC-I-Molekülen, die auf der Oberfläche von nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, präsentiert werden (SCHLUGER & ROM, 1998; RAMACHANDRA et al., 2009). Im Allgemeinen sind CD4<sup>+</sup>-Zellen dafür zuständig, die Wirtsabwehr dahingehend zu stärken, indem sie Effektorzellen, wie CD8<sup>+</sup>-Zellen, Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aktivieren und an den Infektionsherd rekrutieren. CD8<sup>+</sup>-Zellen agieren dagegen direkt zytotoxisch gegen entsprechende Zielzellen und können deren Apoptose und Lyse einleiten (SCHLUGER & ROM, 1998).

T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>-Zellen) können aufgrund ihres Zytokinprofils weiter unterteilt werden in Th1- und Th2-Zellen (MOSMANN et al., 1986; ROMAGNANI, 1995). Eine nicht determinierte Th0-Zelle repräsentiert eine transiente und multipotente CD4<sup>+</sup>-Zelle, die sich fortlaufend zu einer der beiden Zellarten inklusive deren Zytokinprofil entwickeln kann (BENDELAC & SCHWARTZ, 1991; ROMAGNANI, 1997). In welche Richtung sich die naive Th0-Zelle entwickelt ist abhängig vom vorherrschenden Zytokinmilieu. Infolge einer Interleukin 2 (IL-2) Einwirkung kann sie sowohl zu einer Th1- als auch zu einer Th2-Zelle proliferieren. Während eine frühe Präsenz von Interleukin 4 (IL-4) den potentesten Stimulus für die Differenzierung zu einer Th2-Zelle darstellt, begünstigen Interferone und IL-12 die Bildung einer Th1-Zelle (ROMAGNANI, 1997). Th1-Zellen triggern eine, von Phagozyten vermittelte Wirtsabwehr und eine Th1-Antwort wird infolge von Infektionen bedingt durch intrazelluläre Mikroben induziert. Th2-Zellen sind vorrangig für die phagozyten-unabhängige Wirtsabwehr, vermittelt durch das Immunglobulin IgE und eosinophile Granulozyten, verantwortlich (Abbildung 1) (ROMAGNANI, 1995; RAMACHANDRA et al., 2009).



**Abbildung 1: Die zwei Hauptwege der spezifischen Immunität basierend auf der Abhängigkeit/Unabhängigkeit von der Phagozyten-Rekrutierung in der Effektor-Antwort**

Th = CD4<sup>+</sup>-Helfer T-Lymphozyt, CD8 = CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyt, NK = Natürliche Killerzelle, B = B-Lymphozyt, DTH = Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity), E<sub>o</sub> = eosinophiler Granulozyt, APC = antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell), M<sub>c</sub>B = Zelle der Mastzell- bzw. Basophilen-Linie

Modifiziert nach Romagnani et al. (ROMAGNANI, 1995)

$\gamma\delta$ -T-Zellen (T-Lymphozyten, welche auf ihrer Oberfläche einen  $\gamma\delta$ -Rezeptor tragen) fungieren als zytotoxische T-Zellen und werden von Wiederkäuern in einer weitaus höheren Zahl exprimiert als von Menschen oder Mäusen. In neonatalen Tieren stellen diese Zellen den dominierenden Anteil an T-Zellen im Blut dar (HEIN & MACKAY, 1991). In jungen Kälbern umfassen sie etwa 70 % der Gesamtzahl an zirkulierenden Lymphozyten wohingegen dieser Prozentsatz bei Adulten auf etwa 10 % zurückgehen kann (POLLOCK et al., 2001).

$\alpha\beta$ -T-Zellen (T-Lymphozyten, welche auf ihrer Oberfläche einen  $\alpha\beta$ -Rezeptor tragen) sind in ihrer Funktion ebenfalls zytotoxisch. Sie interagieren mit dem CD1 Rezeptor (ein dem MHC-Rezeptor ähnliches Molekül) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel dendritischen Zellen. Dabei kann dieser Rezeptor Lipide binden (BOOM et al., 2003).

### 1.1.2 Zytokinproduktion

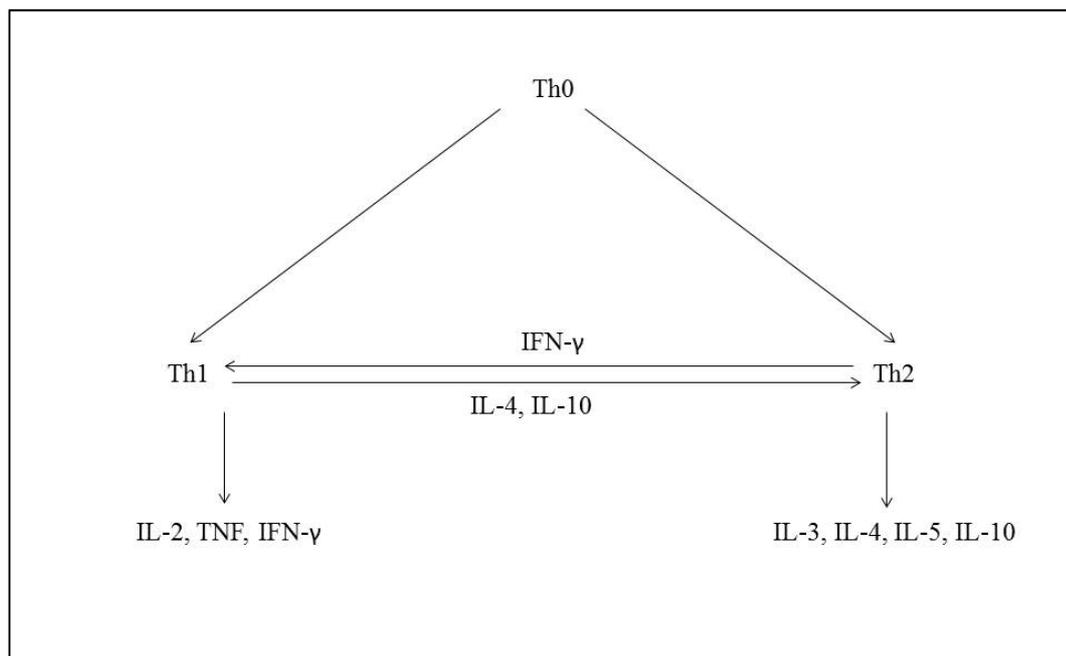
Th0-Zellen können Th1- und Th2-Zytokine produzieren (BENDELAC & SCHWARTZ, 1991).

Th1-Zellen produzieren neben anderen Zytokinen IFN- $\gamma$ , welches aufgrund seiner herausragenden Bedeutung für diese Dissertation nachfolgend genauer erläutert wird (siehe Abschnitt II, 1.2.2) (ROMAGNANI, 1997). Zudem sezernieren sie IL-2, das maßgeblich an der vermehrten Freisetzung von IFN- $\gamma$  beteiligt ist, indem es unter anderem Th1-Zellen aktiviert (SAKAMOTO, 2012). Kasahara et al. fand 1983 heraus, dass IL-2 dazu in der Lage ist, aktivierte CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen, zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Natürliche Killerzellen zur INF- $\gamma$  Produktion anzuregen (KASAHARA et al., 1983). IFN- $\gamma$  wiederum aktiviert Makrophagen, wodurch es zu einer Verstärkung der Immunantwort kommt (SAKAMOTO, 2012). Des Weiteren produzieren Th1-Zellen den sogenannten Tumor necrosis factor (TNF). Dieser kann z. B. zur Nekrose und Apoptose von Tumorzellen führen und wird unter anderem in der Therapie von Melanomen und Sarkomen eingesetzt und spielt als Risikofaktor der Tumor-Genese, -Invasion und -Metastase eine Rolle. Zusätzlich ist er ein Schlüssel-Mediator von sowohl akuten als auch chronischen Entzündungsreaktionen. So kann er zum einen seine eigene Sekretion und zum anderen die Produktion anderer Zytokine und Chemokine induzieren (CHU, 2013).

Th2-Zellen produzieren die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5 und IL-10 (SCHLUGER & ROM, 1998). IL-4 nimmt Einfluss auf ruhende B-Zellen, indem es die Expression an MHC-II-Molekülen steigert und wirkt außerdem als Stimulator für das Wachstum von T-Zellen und Mastzellen. Außerdem kann es die Produktion der Immunglobuline (Ig)G und IgE durch B-Zellen anregen und eine humorale Immunantwort induzieren (PAUL, 1987; MURPHY et al., 2009). IL-10, zunächst in Zusammenhang gebracht mit der Fähigkeit, die Aktivierung und Regulationsfunktionen von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen hemmen zu können, ist ein multifunktionales Zytokin mit diversen Effekten auf nahezu alle

hämatopoetischen Zellen. Als Hauptfunktion wird die Einschränkung und letztendlich die Beendigung einer entzündlichen Reaktion gesehen. Außerdem reguliert es das Wachstum beziehungsweise die Differenzierung von unter anderem B-Zellen, Natürlichen Killerzellen, zytotoxischen- und T-Helfer-Zellen (MOORE et al., 2001).

Beide Th-Zellgruppen können durch die eigens produzierten Zytokine die jeweils andere Th-Zellgruppe in ihrer Aktivität hemmen. Das, von Th1-Zellen sezernierte  $\text{IFN-}\gamma$  wirkt beispielsweise inhibierend auf Th2-Zellen, während IL-10 durch Hemmung der Th1-Zellen und damit auch der  $\text{IFN-}\gamma$  Produktion die Makrophagen-Aktivierung unterdrückt und dadurch immunsuppressiv wirkt (siehe auch Abschnitt II, 1.2.2). Auf der anderen Seite haben die Zytokine jeweils positiven Einfluss auf die jeweilige T-Zell-Subpopulation, z. B. IL-2 auf Th1-Zellen und IL-4 auf Th2-Zellen (RING & THEWES, 1999).



**Abbildung 2: T-Zell-Wechselwirkung abhängig von deren Zytokinproduktion**

Modifiziert nach Ring et al. (RING & THEWES, 1999)

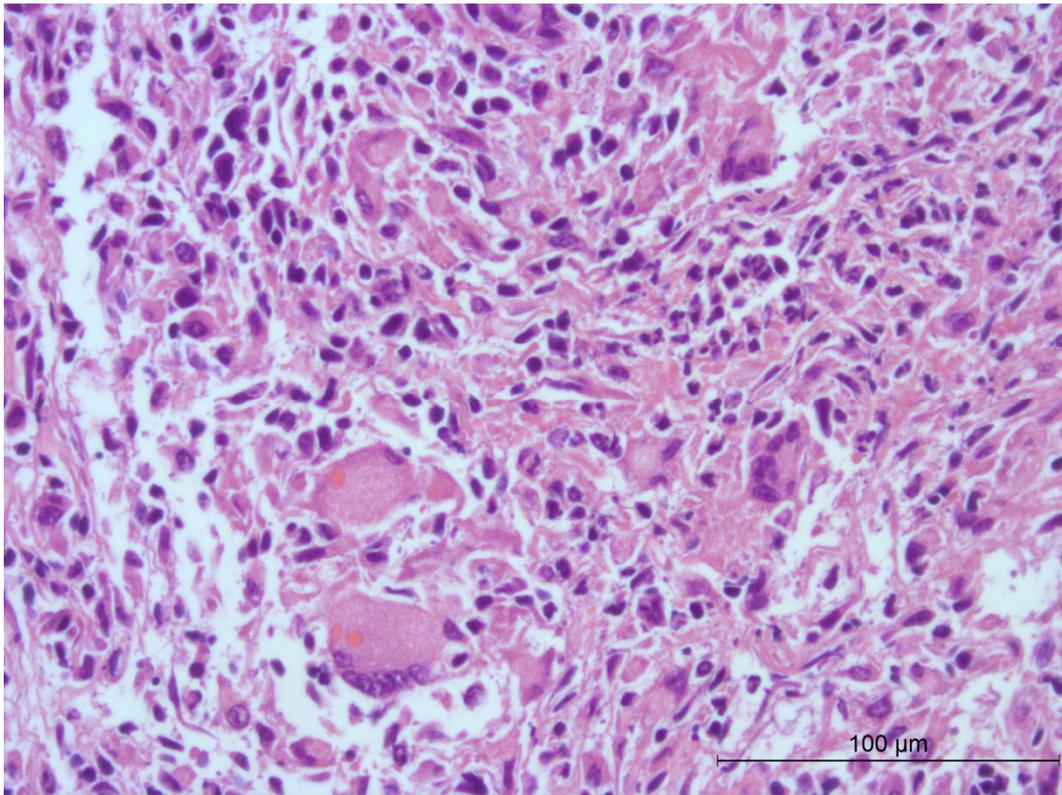
### 1.1.3 Bedeutung in der zellvermittelten Immunantwort (CMI) infolge von Tuberkulose (TB)

T-Lymphozyten sind Bestandteil der zellvermittelten Immunantwort (CMI), die infolge einer TB-Infektion primär auftritt (NEILL et al., 1994). Die Immunantwort nach einer TB-Infektion ist von großer Komplexität und maßgeblich von einer frühen T-Zell-Beteiligung geprägt, was wiederum durch zahlreiche Studien belegt wurde (NEILL et al., 1994; WOOD & ROTHEL, 1994; POLLOCK et al., 2001). Hinsichtlich dessen spielen die erläuterten T-Zell-Untergruppen, wie die  $\alpha\beta$ -T-Zellen, die  $\gamma\delta$ -T-Zellen,  $CD4^+$ -T-Zellen sowie  $CD8^+$ -T-Zellen und Natürliche Killerzellen eine übergeordnete Rolle (SCHLUGER & ROM, 1998; POLLOCK et al., 2001; TORRADO et al., 2011). Dabei sind die  $CD4^+$ -Zellen mit ihren oben beschriebenen Eigenschaften der Antigenerkennung und Produktion von  $IFN-\gamma$  sowie der damit zusammenhängenden Aktivierung von Makrophagen als weitere Effektormoleküle von besonderer Wichtigkeit.  $\gamma\delta$ -T-Zellen produzieren den Botenstoff IL-17, der als bedeutungsvoll hinsichtlich der Granulombildung im frühen Infektions-Stadium erachtet wird (TORRADO et al., 2011). Eine beschriebene Interaktion der  $\alpha\beta$ -T-Zellen mit einem CD1-Rezeptor bzw. dessen Bindung an Lipide erfolgt im Falle der TB mit den charakteristischen Mykolsäuren (BOOM et al., 2003). Das, von Th1-Zellen produzierte IL-2 bewirkt auch im Zuge einer TB- Infektion eine Verstärkung der T-Zell-Antwort und provoziert, wie oben dargestellt eine gesteigerte  $IFN-\gamma$ -Freisetzung. IL-4, von Th2-Zellen produziert, scheint einen modulierenden Einfluss auf die Immunreaktion im Falle einer TB zu haben. Es wird vermutet, dass IL-4 die proinflammatorische Wirkung von  $IFN-\gamma$  eindämmt und dadurch die Ausbildung von Läsionen begrenzt (RHODES et al., 2000). IL-10, ebenfalls von Th2-Zellen produziert ist ein Marker für den fortschreitenden Krankheitsprozess. Witchell und Kollegen vermuten, dass das zunächst unzureichende Level an IL-10 im Laufe der Infektion die proinflammatorische Antwort und dementsprechend auch die pathologischen Veränderungen zu regulieren vermag (WITCHELL et al., 2010).

Die Dynamik der Lymphozyten-Subpopulationen während einer bTB-Infektion konnte in einer Studie mit experimentell infizierten Rindern detaillierter beschrieben werden. Anfangs konnten vor allem  $CD4^+$ -Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen festgestellt werden und in einem späteren Infektionsstadium eine zunehmende Beteiligung an  $CD8^+$ -Zellen (POLLOCK et al., 1996). Wie bereits in Abschnitt II, 1.1.1 erläutert, spielen Th1-Zellen im Zuge einer Infektion mit intrazellulären

Erregern eine herausragende Rolle und prägen dementsprechend auch die Immunantwort im Falle einer TB-Infektion. Die Th1-Zellen setzen IFN- $\gamma$  frei, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen führt und in dem Sinne auch die fortschreitende Bildung von Granulomen fördert (siehe auch Abschnitt II, 1.2.2).

Infolge einer histologischen Untersuchung granulomatöser Läsionen von, mit *M. bovis* infizierten Rindern, konnte bewiesen werden, dass T-Zellen bereits in frühen Stadien identifiziert werden können und mitunter als erste Zellen der CMI im Falle einer TB-Infektion auftreten (CASSIDY et al., 2001). Neben T-Lymphozyten sind unter anderem auch Makrophagen, Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen vom Langhans-Typ sowie neutrophile Granulozyten an der CMI infolge einer Infektion beteiligt (PALMER et al., 2007).



### **Abbildung 3: Darmlymphknoten eines Rindes mit bTB**

Bovine Tuberkulose, verursacht durch *M. caprae*; granulomatöse Entzündung in einem Darmlymphknoten eines Rindes unter Beteiligung mehrkerniger Riesenzellen vom Langhans-Typ; HE-Färbung; Interne Nr.: B5-95-2017

Zur Verfügung gestellt von Dr. Matthias Müller, LGL Erlangen, Sachbereich Pathologie Nord

## **1.2 Interferone**

Interferone sind eine Gruppe von Polypeptiden, die eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr von Infektionen spielen. Interferon (IFN) wurde erstmals 1957 von Isaacs und Lindenmann beschrieben. In Hühnerembryonen konnten sie IFN als eine lösliche Komponente detektieren, welche eine Resistenz gegen virale Infektionen zu induzieren vermag. Der Name „Interferon“ beruht auf ihrer Eigenschaft, dass die Proteine in der Lage sind, in den Zellstoffwechsel befallener Zellen bzw. in die Transkription viraler Nukleinsäuren sowie die Translation viraler messenger RNA störend einzugreifen und dadurch die virale Multiplikation inhibieren (englisch „to interfere“) (ISAACS & LINDENMANN, 1957; NEBERT & FRIEDMAN, 1973; GRESSER, 1977; CAME & CARTER, 1984). Erst 1976 gelang es Knight et al. ein Interferon zu reinigen und erste chemische und physikalische Eigenschaften zu

definieren (KNIGHT, 1976). Das erste Interferon, welches kloniert werden konnte war das humane IFN- $\alpha$  (WECK et al., 1981). In den folgenden Jahren konnten dann auch das humane IFN- $\beta$  (DWORKIN-RASTL et al., 1982) sowie das murine IFN- $\gamma$  (GRAY & GOEDEL, 1983) kloniert werden. Zunächst teilte man die einzelnen Interferone anhand ihrer zellulären Herkunft in Leukozyten-, Fibroblasten- oder Immun-Interferon ein. 1980 erfolgte mit der Erkenntnis, dass Leukozyten- und Fibroblasten-Interferone nicht ausschließlich von entsprechenden Zellen stammen, eine Einteilung gemäß der gemeinsamen Eigenschaften und Kriterien in zwei Klassen: die Typ-I-Interferone IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  (IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$  kamen später hinzu) und das Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$  (STEWART et al., 1980; FARRAR & SCHREIBER, 1993). Diese zwei Klassen scheinen in allen Säugerspezies vorhanden zu sein (PESTKA et al., 1987). Interferone verfügen über eine große Vielfalt an biologischen Funktionen, wobei folgende drei Hauptfelder von herausragender Bedeutung sind: Antimikrobielle und antivirale Aktivität (BARBER, 2001; SMITH et al., 2005), immunmodulatorische Fähigkeiten (BRIERLEY & FISH, 2002) und antitumoröse Wirkung (MILLER et al., 2009; PASQUALI & MOCELLIN, 2010).

### 1.2.1 Typ-I-Interferone

IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$  werden als Typ-I-Interferone zusammengefasst, wobei die beiden Erstgenannten die bedeutendsten Vertreter hinsichtlich ihrer immunologischen Funktion sind (PESTKA, 2000). IFN- $\alpha$  ist durch mehrere Gene kodiert, wohingegen für IFN- $\beta$  in mehreren Spezies bislang nur ein einziges Gen detektiert werden konnte (SICK et al., 1996). Basierend auf der Anordnung der einzelnen Gene und Proteine wird die Abstammung beider Interferontypen von einem gleichen Vorläufer vermutet (FARRAR & SCHREIBER, 1993). Typ-I-Interferone ähneln sich in ihren Eigenschaften bzw. ihren Funktionen und binden unter anderem an die gleichen Rezeptoren der Zielzelle (LUTFALLA et al., 1992). Beiden gemeinsam ist, dass sie infolge einer viralen Infektion von Zellen aktiviert werden. (FARRAR & SCHREIBER, 1993). Die Interferonantwort im Falle einer akuten, viralen Infektion ist wahrscheinlich eine der ältesten, defensiven Reaktionen des Wirts und seine Existenz und Bedeutung ist heutzutage bewiesen (STEWART & LIN, 1979; BOCCI, 1988b). Diese antivirale Wirkung der Typ-I-Interferone ist zehn bis hundertmal stärker als jene des IFN- $\gamma$  und damit als bedeutende Funktion von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  hervorzuheben (FARRAR &

SCHREIBER, 1993). In fast jedem Schritt der Virusreplikation können die Interferone dabei mit ihrer antiviralen Aktivität eingreifen (VILCEK, 1996; ROBEK et al., 2002). Zudem können sie die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche triggern und unterstützen auf diese Weise eine effektivere T-Zell Antwort gegenüber virusinfizierten Zellen (CHANG et al., 1992). Weitere wichtige Eigenschaften der Typ-I-Interferone sind unter anderem ihre Fähigkeit, die Proliferation von T-Gedächtniszellen zu begünstigen (ZHANG et al., 1998), die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten zu fördern (LE BON et al., 2001) und Natürliche Killerzellen zu aktivieren (ORTALDO et al., 1981).

Typ-I-Interferonen wird, hinsichtlich ihrer eben genannten Eigenschaften, große Bedeutung vor allem im humanmedizinischen Bereich zugeschrieben. IFN- $\alpha$  wird zum Beispiel als Therapeutikum im Falle einer Hepatitis C Infektion eingesetzt (DI BISCEGLIE et al., 1989; MCHUTCHISON et al., 1998). In den 1980er Jahren wurde es intensiv in der Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie verwendet, wobei positive Resultate mit hämatologischer Remission der Erkrankung verzeichnet werden konnten (TALPAZ et al., 1983; TALPAZ et al., 1986). Zudem konnten Studien zeigen, dass Typ-I-Interferone lokal eine Vermehrung von Herpesviren unterbinden können (TANAKA et al., 1998; GOODBOURN et al., 2000).

### 1.2.2 Typ-II-Interferon

IFN- $\gamma$ , ehemals Immuninterferon genannt, ist das einzige Typ-II-Interferon und wurde erstmals von Wheelock im Jahre 1965 beschrieben (WHEELOCK, 1965; PESTKA, 2000). IFN- $\gamma$  ist sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene nicht mit den Typ-I-Interferonen verwandt und weist im Gegensatz zu diesen nur eine geringe antivirale Aktivität auf. Auf der anderen Seite ist IFN- $\gamma$  als Immunmodulator 100 – 10 000 mal aktiver als die anderen Interferone. Diese Beobachtungen führten zu der Erkenntnis, dass während IFN- $\alpha$  und - $\beta$  vorwiegend antivirale Agenten mit einer geringen immunmodulatorischen Aktivität sind, IFN- $\gamma$  hingegen primär Immunomodulator mit eingeschränkter antiviraler Aktivität ist (FARRAR & SCHREIBER, 1993). IFN- $\gamma$  wird infolge einer Stimulation durch Antigene, Alloantigene oder T-Zell Mitogene hauptsächlich von T-Zellen produziert, kann aber auch von Natürlichen Killerzellen und cytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Zellen sezerniert werden (MARCUCCI et al., 1981; BOCCI, 1988a; FARRAR & SCHREIBER, 1993; BOEHM et al., 1997). Durch *in vitro* Versuche konnte zudem gezeigt

werden, dass eine Stimulation von T-Zellen und damit eine Induktion der IFN- $\gamma$ -Freisetzung mit Mitogenen, wie z. B. den Lektinen Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (ConA) oder Phytohaemagglutinin (PH) erreicht werden kann (KIRCHNER et al., 1982). Mitogene sind Stoffe, die durch Erhöhung von freiem, zyttoplasmatischem Kalzium als Trigger von intrazellulären Prozessen im Zuge der Mitose wirken (TSIEN et al., 1982). Wie bereits in Abschnitt II, 1.1.2 beschrieben, handelt es sich bei den IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen um Th1-Zellen, welche durch Einwirkung von IL-12 aus einer noch nicht differenzierten Th0-Zelle hervorgehen. IL-12 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten oder Natürlichen Killerzellen im Zuge von Infektionen mit intrazellulären Erregern freigesetzt. Differenzierte Th1-Zellen produzieren nachfolgend IFN- $\gamma$ , das wiederum die Proliferation von Th1-Zellen anregt (MOSMANN et al., 1986; TRINCHIERI, 1995; ROMAGNANI, 1997; SAKAMOTO, 2012). Des Weiteren bewirkt IFN- $\gamma$  eine gesteigerte Expression an IL-12-spezifischen Rezeptoren auf Th1-Zellen und kann zudem eine weitere Produktion von IL-12 seitens Makrophagen veranlassen (TRINCHIERI, 1995; GOLLOB et al., 1997). Dieser positive Feedback-Mechanismus inklusive der Aktivierung von Th1-Zellen und Makrophagen führt somit zu einer Verstärkung der Immunantwort. Als potenter Aktivator von Makrophagen und deren oxidativen Metabolismus besitzt IFN- $\gamma$  antimikrobielle Aktivität (NATHAN et al., 1983). Makrophagen werden durch das Zytokin angeregt, reaktive Sauerstoff (ROI)- und Stickstoffverbindungen (RNI) sowie weitere Zytokine zu bilden mit denen sie Pathogene abtöten können (NATHAN, 1987; DING et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  seinerseits in der Lage ist, eine hohe Syntheserate an NO zu induzieren, allerdings ist diese durch eine Co-Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), welche unter anderem eine bedeutende Eigenschaft der mykobakteriellen Zellwand darstellen, deutlich erhöht (XIE & CALAYCAY, 1992). Im Falle einer Tuberkulose-Infektion erfolgt eine beschriebene, von IFN- $\gamma$ -induzierte Aktivierung von Makrophagen. Diese können allerdings den Erreger nicht erfolgreich eliminieren, wodurch es zu einer Aggregation der Makrophagen und zu den, für die Tuberkulose charakteristischen, Granulomen kommt (BROWN et al., 1969; PIRES et al., 2016). Inwiefern Mykobakterien in der Lage sind, einem Abbau durch Makrophagen zu entgehen, wird in Abschnitt II, 2.2 detaillierter beschrieben. Ein steigendes Niveau an IFN- $\gamma$  korreliert mit fortschreitenden pathologischen Veränderungen während

einer Tuberkulose-Infektion (WITCHELL et al., 2010).

Insgesamt verfügt IFN- $\gamma$  auf immunologischer Ebene über ein weitreichendes Wirkspektrum. Die Eigenschaften dieses Zytokins umfassen die Regulation mehrerer Aspekte der Immunantwort, Stimulation der bakteriziden Aktivität von Phagozyten (vor allem im Zusammenhang mit intrazellulären Bakterien), Stimulation der Antigenpräsentation über MHC-I- und MHC-II-Moleküle, Unterstützung der Leukozyten-Endothel-Interaktion, Induktion von Komponenten der Komplement-Kaskade, Effekte auf Zell-Proliferation und -Apoptose sowie die Stimulation und Unterdrückung zahlreicher Gene. Des Weiteren bewirkt IFN- $\gamma$  eine Aktivierung der T-Lymphozyten und B-Zellen und kann antiviral sowie antiproliferativ wirken (BARKER et al., 1990; BOEHM et al., 1997). Seine Aktivität entfaltet IFN- $\gamma$  über einen spezifischen Rezeptor, der z. B. bei Mensch und Maus auf fast allen Zellen exprimiert wird (ANDERSON et al., 1982; CELADA et al., 1985; LITTMAN et al., 1985; AGUET & MERLIN, 1987).

IFN- $\gamma$  wird klinisch als Therapeutikum in der Humanmedizin genutzt, wobei dessen Einsatz aufgrund fehlender Informationen bezüglich der genauen biologischen Wirkung sowie der lokalen Effekte des Zytokins noch limitiert ist. IFN- $\gamma$ -assoziierte Nebenwirkungen äußern sich grippeähnlich wie z. B. durch Fieber oder Kopfschmerzen (MILLER et al., 2009). Hinsichtlich der Prävention eines Krebs-Rezidivs konnten mit Instillation von IFN- $\gamma$  positive Erfolge erzielt werden, indem es die Vermehrung von T-Zellen sowie Natürlichen Killerzellen bewirkt. Dies führte wiederum zu einer verbesserten Prognose, unter anderem in der Therapie von Eierstock-Krebs (GIANNOPOULOS et al., 2003; MARTH et al., 2004). Auch im Bereich der Tuberkulose-Therapie wurde ein erfolgreicher Einsatz von IFN- $\gamma$  beschrieben. Condos et al. zeigte in einer Studie die Gewichtszunahme bei, mit *M. tuberculosis* infizierten Probanden infolge einer IFN- $\gamma$ -Therapie. Zusätzlich konnte eine Abnahme des „mycobacterial burden“ in der Atemluft bei Patienten mit einer offenen Tuberkulose und ferner noch eine Reduktion der Größe einzelner Läsionen festgestellt werden (CONDOS et al., 1997). IFN- $\gamma$  wurde zudem als nützliche und gut verträgliche Unterstützung in der Therapie von Infektionen mit Mykobakterien des *Mycobacterium-avium*-Komplexes (MAC) definiert (MILANÉS-VIRELLES et al., 2008). Bei Patienten mit einer fortgeschrittenen HIV-1-Infektion wurde versucht, opportunistische Infektionen durch Verabreichung von IFN- $\gamma$  zu reduzieren, wobei positive Resultate in

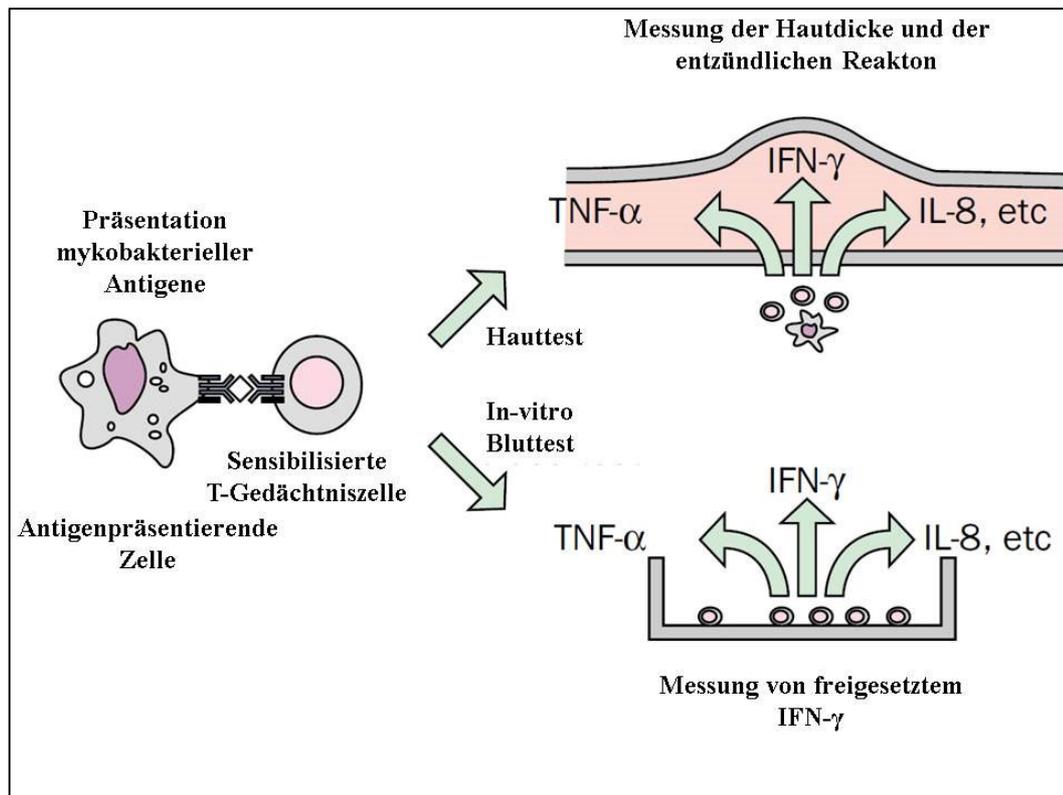
Zusammenhang mit Candida-, Herpes- oder Cytomegalovirus-Infektionen festgestellt werden konnten (RIDDELL et al., 2001). Darüber hinaus wurde eine positive Wirkung von IFN- $\gamma$  in Zusammenhang mit Mukoviszidose (MOSS et al., 2005), Osteopetrosis (KEY JR et al., 1995), oder Pilzinfektionen, bei denen IFN- $\gamma$  zu einer gesteigerten anti-fungalen Aktivität von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führte, beschrieben (MILLER et al., 2009).

### 1.3 Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV)

Der Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ (oder delayed-type hypersensitivity, DTH) liegt im Gegensatz zu den Hypersensitivitätsreaktionen vom Soforttyp, welche durch Antikörper verursacht werden, eine Aktivierung antigenspezifischer T-Effektorzellen zu Grunde. Die DTH wird definiert als die Rekrutierung von T-Zellen in Gewebe, um dort infolge einer Antigenstimulation Zytokine zu produzieren, die eine lokale Entzündungsreaktion vermitteln (MURPHY et al., 2009). Generell kann man zwei Formen der Typ-IV-Reaktion unterscheiden: Die erste wird durch lösliche Antigene (oder Hapten-Carrier-Komplexe) ausgelöst und geht mit einer bevorzugten Th1-Erkennung von Antigenen einher, die von dendritischen Zellen oder Monozyten präsentiert werden, wodurch es zur Freisetzung von Th1-Zytokinen, wie IFN- $\gamma$  kommt. Der zweite Mechanismus beruht auf der zytotoxischen Zerstörung der Zielzelle durch Th1- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Erkennung der Antigene über zellassozierte MHC-Moleküle. und es erfolgt eine zytotoxische Zerstörung der Zielzelle (DAY, 2005). Die DTH läuft in drei aufeinander folgenden Stufen ab: Zunächst wird das eingedrungene Antigen von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, verarbeitet und auf der Zelloberfläche durch MHC-Moleküle präsentiert. Anschließend wandern sensibilisierte T-Zellen, die durch das Antigen von einem vorangegangenen Kontakt geprägt wurden zur Injektionsstelle und werden aktiviert. In der dritten Phase setzen entsprechende Zellen Mediatoren, die Zytokine frei, was zur Expression von Adhäsionsmolekülen durch das lokale Gefäßendothel führt und eine weitere Chemotaxis von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten zum Ort der Antigenexpression induziert. Die Effektorfunktion der rekrutierten T-Zellen ist gekennzeichnet durch die Aktivierung von Makrophagen oder der Zerstörung der Zielzellen durch Zytokine. Es kommt zu einer lokalen Entzündungsreaktion und zu einer Ansammlung von Flüssigkeit und Proteinen an der Antigen-Eintrittsstelle. Da die Entwicklung einer solchen lokalen

Entzündungsreaktion bis zu 72 Stunden in Anspruch nehmen kann, spricht man von einer Hypersensitivität vom verzögerten Typ (DAY, 2005; MURPHY et al., 2009). Die frühere Annahme, dass nur CD4<sup>+</sup>-Zellen eine DTH vermitteln können, konnte durch mehrere Studien widerlegt und eine mögliche Beteiligung von sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an der Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion bewiesen werden. Beide Unterklassen können im Falle eines Antigenkontakts Th1- und Th2-typische Zytokine produzieren. Der Hauptunterschied liegt in der Kommunikation mit MHC-Molekülen (siehe auch Abschnitt II, 1.1.1). Während CD8<sup>+</sup>-Zellen Antigene erkennen, welche von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, interagieren CD4<sup>+</sup>-Zellen mit MHC-II-Molekülen und reagieren somit auf Antigene, die auf diese Weise dargestellt werden. Intrazelluläre Pathogene, wie z. B. Mykobakterien oder Listerien können zur Aktivierung des CD4<sup>+</sup>-determinierten Weges inklusive Interaktion mit MHC-II-Molekülen führen und parallel die CD8<sup>+</sup>-vermittelte Richtung einleiten und somit die Immunabwehr in zweierlei Hinsicht ankurbeln (MUNK & EMOTO, 1995; KALISH & ASKENASE, 1999). Bezüglich des Zytokinprofils der CD4<sup>+</sup>-Zellen unterscheidet man, wie bereits beschrieben, die Zytokine, welche von Th1-Zellen und jene, die von Th2-Zellen produziert werden. Dabei sind die Th1-Zellen hauptsächlich für die Vermittlung von DTH-Antworten verantwortlich, während die Th2-Zellen eine unterstützende Rolle bei der Produktion von Antikörpern einnehmen (COFFMAN et al., 1986; KALISH & ASKENASE, 1999). Das, von Th1-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  spielt bei der DTH eine übergeordnete Rolle. IFN- $\gamma$  bewirkt die Transformation von Monozyten in Makrophagen und die Induktion von endothelialen und interzellulären Adhäsionsmolekülen sowie von Keratinozyten der beteiligten Hautregionen. Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel wird lokal die Durchlässigkeit der Blutgefäße erhöht. Dadurch können Plasma und akzessorische Zellen im betreffenden Bereich eindringen und es kommt zu einer sichtbaren Schwellung an den entsprechenden Hautstellen. Des Weiteren führt IFN- $\gamma$  zu einer gesteigerten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und fördert die Produktion vom, IFN- $\gamma$ -induzierbaren Signalprotein „Protein 10“ durch Keratinozyten, das für die Anlockung weiterer Leukozyten und die Bildung eines Leukozyteninfiltrats verantwortlich ist (GRIFFITHS et al., 1989; KALISH & ASKENASE, 1999; MURPHY et al., 2009). IFN- $\gamma$  selbst agiert ebenfalls als potenter Stimulator der Lymphozyten-Migration. Nach einer IFN- $\gamma$ -Injektion konnte eine Stimulation der Lymphozyten-Bewegung in Richtung des

Injektionsbereichs festgestellt werden (ISSEKUTZ et al., 1988). Mc Cluskey et al. konnten ferner aufzeigen, dass der Großteil an Zellen, die das Infiltrat im Injektionsbereich bilden, nicht sensibilisiert ist und auch erst kürzlich proliferiert ist. Dies ließ darauf schließen, dass die delayed-type hypersensitivity Reaktion von einer kleinen Anzahl sensibilisierter Zellen auf Seiten des Antigens ausgelöst wird und nachfolgend eine fortschreitende Immunantwort induziert wird (MCCLUSKEY et al., 1963). Wie bereits beschrieben sind die Lymphozyten Haupteffektoren und von primärer Bedeutung im Falle einer DTH, während Makrophagen hauptsächlich als migrierende Immunzellen am Reaktionsort eine Rolle spielen (BLOOM & BENNETT, 1966). Das Prinzip der DTH wird in der Tuberkulose-Diagnostik eingesetzt. Als Prototyp gilt dabei der Intrakutantest oder Tuberkulin-Test, bei dem nach Injektion eines Antigens (meist als Peptidcocktails zusammengesetzt) eine DTH ausgelöst wird. Hatte der Proband zuvor Kontakt zu entsprechenden Mykobakterien, kommt es zu einer T-Zell-abhängigen, lokalen Entzündungsreaktion (MONAGHAN et al., 1994; MURPHY et al., 2009). Ähnlich wie bei der DTH macht man sich beim IFN- $\gamma$  release assay den Mechanismus der zellvermittelten Immunantwort (CMI) zu Nutze, wobei sensibilisierte T-Zellen im Falle eines erneuten Kontakts mit dem Antigen Zytokine, v. a. IFN- $\gamma$  freisetzen (Abbildung 4); (WOOD et al., 1990). In beiden Fällen wird durch Zugabe eines Antigens intrakutan (im Falle des Intrakutantests) oder zu Vollblutproben (IFN- $\gamma$  release assay) geprüft, ob im Vorfeld ein Kontakt zu dem Pathogen bestand und dies anhand einer messbaren Reaktion (v. a. durch IFN- $\gamma$  hervorgerufen), detektiert. Auf beide Untersuchungsmethoden wird im Zuge der TB-Diagnostik nachfolgend genauer eingegangen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der diagnostischen Möglichkeiten der Tuberkulose, basierend auf der CMI**

Modifiziert nach Andersen et al. (ANDERSEN et al., 2000)

## 1.4 Einfluss einer Anästhesie auf die Zellen des Immunsystems

### 1.4.1 Immunologische Auswirkungen operativer Eingriffe unter Anästhesie

Die Suppression des Immunsystems infolge chirurgischer Eingriffe wurde im humanmedizinischen Bereich bereits umfangreich behandelt und brachte weitreichende Erkenntnisse (BRÖCKER & MACHER, 1981; MARKEWITZ et al., 1992; FAIST et al., 1996). Zunächst ging man davon aus, dass eine derartige postoperative Suppression aufgrund verursachter Traumata oder z. B. durch Stresshormone entsteht und erachtete eine Anästhesie als eher unwahrscheinliche Ursache bzw. schrieb ihr lediglich eine unterstützende Wirkung zu (PARK et al., 1971; JUBERT et al., 1973; WALTON, 1979; WANG et al., 1980). In diesen frühen Studien wurde unter anderem der Einfluss von Corticosteroiden, die als Folge entstandener Traumata vermehrt freigesetzt werden, mitverantwortlich für eine Immunsuppression gemacht und diskutiert. Dabei stieg bei größeren

Operationen der Plasmacortisolspiegel, wohingegen dies bei kleineren Eingriffen ausblieb (CARTER & JAMES, 1970; CULLEN & VAN BELLE, 1975; SLADE et al., 1975). Dass Corticosteroide Einfluss auf immunmodulatorische Funktionen, wie z. B. die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten, haben können, konnte bestätigt werden (MISHLER & EMERSON, 1977; SAUER et al., 1995). Im Zusammenhang mit einer Operation kann durch geeignete Analgesie und damit der Verringerung des peri- und postoperativen Schmerzes sowie des stressbedingten Cortisolspiegels das Ausmaß einer Immunsuppression gesenkt werden (BEILIN et al., 2003; PAGE, 2005). In Folgestudien wurde bewiesen, dass eine Anästhesie durchaus mitverantwortlich an einer Beeinträchtigung der Immunabwehr sein kann (BRAND et al., 1998; KUROSAWA & KATO, 2008). Ferner konnte die Anästhesie sogar als alleinige Ursache einer derartigen Immunsuppression definiert werden (MELAMED et al., 2003). Es wird sogar beschrieben, dass bis zu zwölf Stunden post operationem die Anästhesie den primären Einfluss auf immunmodulatorische Vorgänge nimmt, während die Effekte der Operation in diesem Zusammenhang erst einige Zeit danach dominieren. Zudem scheint die Anästhesie bei Eingriffen, in welchen nur kleine Inzisionen vollzogen werden, hauptverantwortlich für immunologische Veränderungen zu sein (NELSON & LYSLE, 1998). Generell kann sich eine Immunsuppression infolge eines operativen Eingriffs sowohl auf der Ebene des unspezifischen bzw. spezifischen Immunsystems auswirken als auch von zellulärer oder humoraler Natur sein (WALTON, 1979; MARKEWITZ et al., 1992; FAIST et al., 1996). In Zusammenhang mit einer einhergehenden Immunsuppression aufgrund bestehender Krankheiten wirkt eine, der Anästhesie zurechenbare Dysfunktion von Immunzellen, wie NKs oder Lymphozyten, beschleunigend auf das Wachstum und die Metastase bösartiger Zellen (KUROSAWA & KATO, 2008). Im Vergleich zu den genannten Forschungsergebnissen aus dem humanmedizinischen Bereich, existieren wenig äquivalente Studien in der Tiermedizin. Felsburg et al. konnte in einer Studie mit Hunden auf die alleinige Auswirkung einer Anästhesie auf canine periphere Blutlymphozyten rückschließen, indem eine Beteiligung anderer Einflüsse und Faktoren wie z. B. Traumata, Blutverlust oder Erkrankungen ausgeschlossen wurden. Zu mehreren Zeitpunkten nach einer Narkose wurden periphere Leukozyten infolge einer Stimulation gezählt, was in einer deutlichen Verringerung der Anzahl bis zu vier Stunden danach und anschließender Regeneration, welche nach 24 Stunden abgeschlossen war, resultierte (FELSBURG et al., 1986). Eine

weitere Studie beschäftigte sich z. B. mit dem Einfluss angewandter Narkotika auf immunologische Zellen des Schweines, wobei bei verschiedenen Leukozytenpopulationen zwar ein geringfügiges Absinken bezüglich der Anzahl vermerkt werden konnte, das allerdings nicht signifikant war (GEIST, 2006). Ferner wurde die Auswirkung zweier unterschiedlicher Anästhesieformen in Kombination mit oder ohne chirurgischen Eingriff auf Immunzellen untersucht. Diese Studie führte unter anderem zu der Erkenntnis, dass die Leukozytenzahl infolge chirurgischer Eingriffe höher ist als ohne operativen Eingriff. Zudem konnten z. B. deutlich höhere T-Zell-Konzentrationen nach Operationen unter Verwendung einer Kombinationsanästhesie im Vergleich zum alleinigen Einsatz eines reinen Inhalationsanästhetikums detektiert werden (SCHÄFER, 2012). Letztendlich korrelieren Faktoren, wie z. B. die Dauer einer Narkose, die Art und das Ausmaß eines Operationstraumas sowie der bestehende Immunstatus des Probanden mit einer veränderten Immunantwort und einer postoperativen Immunsuppression (SALO, 1992; NELSON & LYSLE, 1998; HEIMLICH et al., 1999).

#### **1.4.2 Direkter Einfluss von Anästhetika auf Immunzellen**

Narkotika und Lokalanästhetika können immunmodulatorische Funktionen auf der Zellebene beeinflussen. Eine Veränderung der Membranfunktionen, Motilität und Mitose der Zellen bewirken demnach einen Funktionsverlust von z. B. T- und B-Lymphozyten, an deren Membran die Antigenerkennung stattfindet. Zellen des spezifischen und unspezifischen Effektorsystems werden in ihrer Motilität eingeschränkt und die, für die Entstehung spezifischer Klone und unspezifischer Effektorzellen notwendige Mitose wird unterbunden (BRÖCKER & MACHER, 1981). Prägnante immunmodulatorische Wirkungen einzelner Zellen des Immunsystems, wie cytotoxische Effekte, Phagozytose, Chemotaxis, Zelladhärenz und Migration sowie oxidative und lysosomale Funktionen können beeinträchtigt werden (BRÖCKER & MACHER, 1981; MARKOVIC & MURASKO, 1993; CHANG et al., 2005).

Der Einsatz einer Kombinationsanästhesie bestehend aus Ketamin und Xylazin hat sich für die Immobilisation verschiedenster Wildtiere, wie unter anderem dem Rotwild (*Cervus elaphus*) (MARCO & LAVÍN, 1999), Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) und Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) (KREEGER et al., 1986; KREEGER et al., 1990), dem Polarbär (*Ursus maritimus*) (RAMSAY et al., 1985) oder dem Rotluchs (*Lynx rufus*) und Ozelot (*Leopardus pardalis*) (BELTRÁN &

TEWES, 1995) bewährt. Auch in Deutschland wurde diese Anästhesie standardmäßig, bekannt als die „Hellabrunner Mischung“, bei Wildtieren eingesetzt (WIESNER, 1982; ABDERHALDEN et al., 1998), wobei die dabei eingesetzte Form von Xylazin als Trockensubstanz (Rompun®) kommerziell nicht mehr zur Verfügung steht. Als Alternative kann Xylased ebenfalls als Trockensubstanz und analoger Xylazin-Konzentration bezogen und zur Immobilisation von Wildtieren eingesetzt werden (BIOVETA). Aufgrund des sehr geringen Mortalitätsrisikos bei unterschiedlichsten Tierarten und der Möglichkeit zur Antagonisierung stellt diese Mischung eine gute Möglichkeit für die Immobilisation von Spezies, wie dem Rotwild, dar und wird als Narkose für diese Tierart hauptsächlich eingesetzt. Zudem ist es für lebensmittelliefernde Tiere zugelassen (WIESNER, 1998). Für die Immobilisation von sowohl Rotwild als auch Rind während dieser Studie wurde eine Kombinationsanästhesie aus Ketamin und Xylazin verwendet. Im Folgenden werden bereits untersuchte Einflüsse dieser und weiterer Narkotika auf Zellen des Immunsystems beschrieben.

Für Ketamin als Injektionsanästhetikum wurden negative Einflüsse auf neutrophile Granulozyten, inklusive deren Hemmung in ihrer chemotaktischen Aktivität sowie in ihrer Produktion von Oxidantien festgestellt (ZHALER et al., 1999; WEIGAND et al., 2000). Zudem schwächt es nachweislich die Adhärenz von Zellen bzw. deren Migration und hemmt die Phagozytose und inflammatorische Zytokinproduktion von Makrophagen (CHANG et al., 2005). Melamed et al. beschrieb suppressive Effekte von Ketamin auf NKs und gleichzeitig eine induzierende Wirkung auf eine gesteigerte Metastase von Tumorzellen (MELAMED et al., 2003). In einer Studie mit Bozova Greyhounds wurde der Einfluss einer Kombinationsanästhesie aus Ketamin und Xylazin auf unterschiedliche Zellen untersucht, wobei keine signifikanten Einflüsse auf hämatologischer sowie biochemischer Ebene identifiziert werden konnten (CAMKERTEN et al., 2013). Die intramuskuläre Injektion von Xylazin kann bei Ziegen zu einer Reduktion der totalen Erythrozyten- und Leukozytenzahl führen, eine Senkung von Hämatokrit und Hämoglobin bewirken und einen Anstieg von Neutrophilen bei relativer Senkung der Lymphozytenzahl induzieren (KUMAR & THURMON, 1979). In einer Studie mit Weißwedelhirschen wurde hingegen eine unveränderte Leukozytengesamtzahl unter Einfluss von Xylazin beobachtet (PRESIDENTE et al., 1973). Bei der epiduralen Applikation von Ketamin in Kombination mit Xylazin konnte bei Ziegen eine unveränderte Leukozytenzahl beobachtet werden, während diese im

Fälle einer subarachnoidalen Verabreichung abnahm (KINJAVDEKAR et al., 2000; SINGH et al., 2007). Ebenfalls eine Reduktion der Gesamtleukozyten ist für Rinder, Büffel und Hunde im Falle einer epiduralen Applikation von Xylazin bekannt (SINGH et al., 2005; MOULVI et al., 2011; MWANGI et al., 2014).

Neben Ketamin und Xylazin sind für weitere Anästhetika nachfolgende immunologische Einflüsse und Wirkungen bekannt.

Barbiturate als Injektion können die Anzahl zirkulierender Leukozyten verringern (USENIK & CRONKITE, 1965) und durch den Einsatz von Muskelrelaxantien kann es zu einer Lymphopenie von humanen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen kommen (PALACIOS et al., 2004).

Kitamura und Kollegen konnten eine erhöhte Immunsuppressivität von Inhalationsnarkosen gegenüber Injektionsnarkosen bestätigen. Während es unter Einsatz von Inhalativa, wie Sevofluran zu einer vermehrten Lymphopenie kam, konnte dies bei der Verwendung von Propofol ausgeschlossen werden. Bei Letzterem war sogar eine Lymphozytose zu verzeichnen (KITAMURA et al., 2008). Inhalationsanästhetika scheinen die Effektorfunktionen von, sowohl dem spezifischen als auch unspezifischen Immunsystem zu unterdrücken (HOMBURGER & MEILER, 2006). Bereits 1973 konnte Bruce et al. sowohl akute als auch chronische Auswirkungen von Halothan auf Leukozyten in Form einer Verringerung von deren Aktivität sowie Mitosesuppression definieren (BRUCE, 1973). Ferner konnte ein Zusammenhang einer Leukopenie mit der überdurchschnittlich langen Exposition von Agenzien, u. a. Hydrocarbonate oder Halothan festgestellt werden und wurde dabei als Folge der nachteiligen Wirkung der Anästhetika auf verschiedenen Stufen des Zellzyklus gewertet (WALTON, 1979). Neben den genannten Nebenwirkungen von Halothan auf Leukozyten, beeinträchtigt es zudem, wie auch Isofluran, Natürliche Killerzellen in ihrer Funktion. Diese werden in ihrer IFN- $\gamma$ -induzierten zytotoxischen Aktivität durch entsprechende Anästhetika inhibiert (MARKOVIC & MURASKO, 1993). Weitere Studien zeigten, dass Halothan eine Verminderung der Antikörperproduktion in Organen bewirken kann und in Kombination mit einer Infektion zur Erhöhung der Letalität führt, indem die Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit von Granulozyten und Makrophagen gestört wird (BRUCE, 1966; HUMPHREY et al., 1969; DUNCAN et al., 1976). Des Weiteren wurde eine transiente Leukopenie bzw. Leukozytose infolge von Narkosen mit Diethylether oder Chloroform beschrieben,

indem diese entweder direkt toxisch wirken oder für eine Umverteilung der Leukozyten sorgen (SMITH et al., 1947; WALTON, 1979).

Im Falle von Epiduralanästhesien geht man von einer geringeren Immunsuppression als vergleichsweise bei Inhalations- oder Injektionsanästhesien aus. Bei Einsatz einer epiduralen Schmerztherapie scheint die T-Zell-Kompetenz post operationem besser erhalten zu bleiben (VOIGT, 2007). Hashimoto et al. konnte in einer Studie zeigen, dass durch eine epidurale Betäubung der stressbedingte Effekt einer Operation auf zirkulierende Lymphozyten verringert ist (HASHIMOTO et al., 1995). Jedoch kann auch hier eine transiente und signifikante Beeinträchtigung der Lymphozytensubpopulationen und der Aktivität Natürlicher Killerzellen auftreten (YOKOYAMA et al., 2001). Für Lokalanästhetika ist eine Beeinträchtigung lysosomaler Enzyme sowie der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Freisetzung durch neutrophile Granulozyten beschrieben. Ferner kann die Verdauung von Immunkomplexen durch Makrophagen gestört werden (GOLDSTEIN et al., 1977; BRÖCKER & MACHER, 1981). Eine Lokal- wie auch eine Epiduralanästhesie können allerdings auch postoperativ zu einer verringerten Suppression der Lymphozytenproliferation als auch zu einer abgeschwächten proinflammatorischen Zytokin-Antwort führen (BEILIN et al., 2003).

Beeinträchtigte Funktionen der Zellen normalisieren sich mit Entzug des Narkotikums und sind reversibel. Langfristige Schäden der Zellfunktionen scheinen nicht durch verabreichte Narkotika begründet zu werden (BRÖCKER & MACHER, 1981).

## **2 Tuberkulose beim Rotwild**

### **2.1 *Mycobacterium caprae* und *Mycobacterium bovis* als Erreger**

In der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung, RindTbVo) wird die Rindertuberkulose als nachgewiesene Infektion von Boviden mit *M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* oder *M. microti* definiert (RINDTB-VO, 2017). Bei den Rindern handelt es sich dabei um eine anzeigepflichtige Tierseuche (BMJV, 2016). *M. caprae* wurde 2004 als eigenständiger Erreger der Rindertuberkulose in die Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen aufgenommen (BMJV, 2004). *M. bovis* und *M. caprae* werden als Erreger der Rindertuberkulose als gleichermaßen bedeutend in Deutschland angesehen (FLI, 2015).

*Mycobacterium caprae*

Während die bovine Tuberkulose (bTB) in den nördlichen Teilen Deutschlands hauptsächlich von *M. bovis* hervorgerufen wird, dominieren im Süden Infektionen durch *M. caprae*. Seit 2008 werden zunehmend *M.-caprae*-Infektionen sowohl beim Rotwild als auch bei Rindern festgestellt (FINK et al., 2015). Aranaz et al. beschrieb 1999 erstmalig eine erfolgreiche Isolierung von *M. caprae* aus Gewebeproben von Ziegen in Spanien (ARANAZ et al., 1999). Zunächst nahm man eine große phylogenetische Ähnlichkeit mit *M. tuberculosis* an und ordnete *M. caprae* dieser Spezies als *M. tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov. unter. Niemann et al. deklarierte 2002 diese Behauptung als fehlerhaft. Er stellte die Annahme auf, dass die Subspezies *M. caprae* von *M. bovis* abstammt. Als Begründung führte er an, dass sich beide nur in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Pyrazinamid unterscheiden und ansonsten in Wachstum sowie biochemischen- und genetischen Eigenschaften übereinstimmen. Von diesem Zeitpunkt an sprach man von *M. bovis* subsp. *caprae* (NIEMANN et al., 2002). Im gleichen Jahr konnte Brosch et al. den Unterschied zwischen beiden Spezies dahingehend definieren, indem er herausfand, dass *M. bovis* die „region of difference 4“ (RD4) fehlt (BROSCH et al., 2002). Eine Evaluations-Studie des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) basierend auf der An- bzw. Abwesenheit sogenannter „regions of difference“ lies darauf schließen, dass *M. caprae* älter als *M. bovis* ist. Somit konnte der einstige Entdecker von *M. caprae* diese auch offiziell als eigenständige Spezies definieren (ARANAZ et al., 2003). Mittlerweile können einzelne *M.-caprae*-Isolate weiter unterteilt werden. Domogalla et al. führte eine genauere Untersuchung der RD4-Region von *M. caprae* durch und stellte fest, dass man diese Spezies in mindestens vier heterogene Vertreter unterteilen kann (DOMOGALLA et al., 2013). Bis dato konnten noch mehr Subtypen identifiziert werden, wodurch mittlerweile sieben genetische Variationen der RD4-Sequenz von *M. caprae* bekannt sind. Die Erkenntnisse bedeuten gleichzeitig einen Fortschritt in der Erhebung epidemiologischer Daten (RETTINGER et al., 2015; BRÖCKL, 2017).

Das Wirtsspektrum von *M. caprae* ist, wie jenes von *M. bovis*, weitreichend. Für diese Arbeit spielen vor allem Infektionen von *M. caprae* beim Rotwild (*Cervus elaphus*) eine übergeordnete Rolle (PRODINGER et al., 2002). Doch auch Fälle beim Menschen (PRODINGER et al., 2014), Rind (*Bos taurus*) (PRODINGER et al., 2002), Schaf (*Ovis aries*) und Ziege (*Capra aegagrus hircus*) (RODRÍGUEZ

et al., 2011), Wild- und Hausschwein (*Sus scrofa* und *Sus scrofa domestica*) (NARANJO et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2011) wurden beschrieben. Zudem konnten Infektionen von verschiedenen Zootieren wie Dromedaren (*Camelus dromedarius*) und Bisons (*Bison bison*) identifiziert werden (PATE et al., 2006).

### *Mycobacterium bovis*

*M. bovis* wurde 1970 von Alfred Karlson und Erwin Lessel benannt (KARLSON & LESSEL, 1970). Vor allem wurde *M. bovis* bei Rindern (*Bos taurus*) (THAKUR et al., 2012) isoliert, wobei diese Spezies als am empfänglichsten für den Erreger gilt. Aber auch bei zahlreichen anderen Tieren sowie beim Menschen kann es zu einer Infektion mit *M. bovis* kommen (COUSINS et al., 2003). So wurde das Bakterium unter anderem auch beim Rotwild (*Cervus elaphus*) (DE LISLE & HAVILL, 1985; ALDWELL et al., 2000; LÓPEZ-OLVERA et al., 2013), Rehwild (*Capreolus capreolus*) und Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) (ZANELLA et al., 2008a) sowie Dammwild (*Dama dama*) (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2012), europäischen Wildschwein (*Sus scrofa*) in Spanien (NARANJO et al., 2008; GALINDO et al., 2009), Fuchskusu/Possams (*Trichosurus vulpecula*) in Neuseeland (NUGENT, 2011), Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) in den USA (NUGENT, 2011) sowie beim europäischen Dachschwein (*Meles meles*) in Großbritannien und Irland (BIELBY et al., 2014; ABDOU et al., 2016) isoliert.

Eine Differenzierung von *M. caprae* und *M. bovis* als Erreger der Tuberkulose u. a. beim Rotwild ist zum einen durch die eben angeführte, unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Pyrazinamiden möglich (NIEMANN et al., 2002). Zum anderen stellt die Betrachtung der „regions of difference“ (RD)-Sequenzen eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit beider MTC-Mitglieder dar. Beide weisen sie gemeinsame Deletionen von RD13, RD12, RD10, RD9, RD8, RD7, RD6, RD5 in ihrem Genom auf (ARANAZ et al., 2003). Allerdings besitzt *M. caprae* eine RD4-Sequenz in verschiedenen Variationen, welche dem Genom von *M. bovis* vollständig fehlt. Auf diese Art und Weise ist eine sichere Differenzierung beider Spezies möglich (ARANAZ et al., 2003; DOMOGALLA et al., 2013). Letztendlich kann eine Unterscheidung von *M. bovis* und *M. caprae* sowie von anderen Mitgliedern des MTC durch die Betrachtung der „single nucleotide polymorphism“

(SNP)s erfolgen. Hierbei werden Polymorphismen auf der Ebene einzelner Nukleotide untersucht (SCORPIO & ZHANG, 1996; BROSCHE et al., 2002; NIEMANN et al., 2002). Diese Methode eignet sich gut, da ein SNP relativ stabil bleibt, wenn er sich einmal klonal etabliert hat (HUARD et al., 2006).

## 2.2 Infektion und Pathogenese

Der pathologische Verlauf der Tuberkulose bei Rind und Wildwiederkäuern ist bislang noch nicht vollends geklärt und stützt sich weitreichend auf Erkenntnisse des Verlaufs der Tuberkulose beim Menschen. Basierend auf Studien, welche sich mit der experimentellen Untersuchung der Pathogenese der bovinen Tuberkulose in Rindermodellen beschäftigt haben und der Tatsache, dass ein Austausch der gleichen Mykobakterien-Subtypen zwischen Rind und Wildwiederkäuern stattfindet, wird nachfolgend die Pathogenese geschildert (NEILL et al., 2001; NEILL et al., 2005; FINK et al., 2015).

Eine Übertragung von Mykobakterien innerhalb und zwischen einzelnen Spezies kann sowohl durch direkten Kontakt als auch indirekt erfolgen. Als häufigste Infektionsquelle wird eine Übertragung via Aerosol beziehungsweise alimentärer Art diskutiert (NEILL et al., 1994; POLLOCK et al., 2006). Wenn auch seltener beschrieben, besteht zudem die Möglichkeit einer Infektion über Wunden (wobei eine Kontamination der Primärwunde mit tuberkulösen Bacilli vorausgesetzt wird) sowie auf kongenitalem, genitalem und iatrogenem Weg (NEILL et al., 1994). Eine Erregerausscheidung durch infektiöse Tiere kann, je nach infiziertem Organ über die Atmung (SMITH, 2003), mit der Milch (FRANCO et al., 2013) und, wenn auch seltener über Se- und Exkrete des Urogenital- und Gastrointestinaltrakts stattfinden (CORNER et al., 2012).

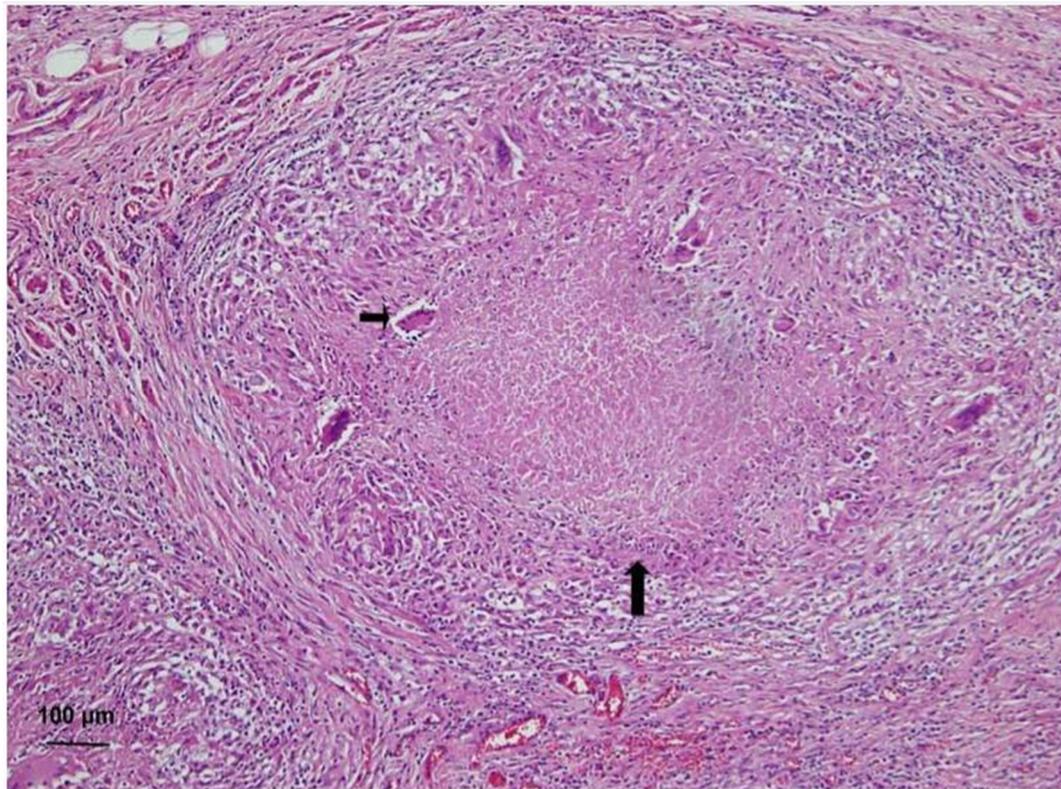
Nach einer Infektion dienen Makrophagen als natürlicher Lebensraum für Mykobakterien. Eine Aufnahme erfolgt dabei entweder über Pinozytose oder über spezifische Rezeptoren (HMAMA et al., 2015). Unter normalen Umständen besitzen Makrophagen die Fähigkeit, Bakterien in frühen Stadien durch Phagozytose und oxidativen Stress zu beseitigen. Die Bildung eines Phagolysosoms nach Fusionierung von Phagosom und Lysosom innerhalb des Makrophagen sowie das Einwirken proteolytischer und lipolytischer Enzyme schaffen eine toxische Umgebung für Bakterien und führen zu deren Abbau (RUSSELL et al., 2009; PIRES et al., 2016). Pathogene Mykobakterien hingegen vermögen die Reifung der

Makrophagen und die Fusion mit Endo- und Lysosom zu unterbinden, wodurch sie abbauenden Enzymen entkommen und in den Makrophagen persistieren können (BROWN et al., 1969; PIRES et al., 2016). Eine zweite Möglichkeit der Mykobakterien sich zu schützen sind Enzyme, die sogenannten Superoxiddismutasen. Diese können reaktive Sauerstoffverbindungen, wie Superoxidanionen, abfangen und in ungefährlichen Sauerstoff sowie Wasserstoffperoxid überführen (CUMMING et al., 2014). Eine Freisetzung und damit die Infektion neuer Zellen erreichen pathogene Mykobakterien durch Herbeiführen einer gezielten Nekrose von Zellen anstelle derer Apoptose. Dabei führen bereits 25 reaktive Bakterien intrazellulär zur Nekrose des Makrophagen (REPASY et al., 2013; WONG & JACOBS, 2016). Diese drei entscheidenden Fähigkeiten der Mykobakterien, ihren Abbau durch Unterbindung der Phagolysosombildung von Makrophagen zu verhindern, freie Sauerstoffradikale abfangen zu können und neue Zellen aufgrund einer herbeigeführten Zellnekrose zu infizieren, sind entscheidende Pathogenitätsfaktoren, die die Schwierigkeit einer Eliminierung des Erregers unterstreichen.

Je nach den oben bereits erwähnten möglichen Übertragungswegen entsteht an der entsprechenden Eintrittsstelle des Erregers zunächst ein sogenannter „Primärkomplex“ unter Beteiligung der regionalen Lymphknoten (WALLGREN, 1948). Für den weiteren Verlauf der Infektion spielt der Status des individuellen Immunsystems eine große Rolle. Dabei kommen drei verschiedene Möglichkeiten in Frage. Bei einer intakten Immunabwehr kann der Erreger in seltenen Fällen eliminiert werden und entstandene Läsionen können vollständig abheilen (NEILL et al., 2001). In den meisten Fällen wird allerdings eine Immunantwort entwickelt, die den Erreger zwar kontrollieren, aber nicht eliminieren kann (WATERS et al., 2011). Es kommt zu einer persistierenden Infektion mit Abkapselung des Erregers, wobei zunächst keine Symptome entwickelt werden. Bei einer andauernden, intakten Immunabwehr kann dieser asymptomatische Zustand sogar über die vollständige Lebensdauer anhalten (SMITH, 2003). Kommt es allerdings zu einer Immunsuppression, so kann es wiederum zu einer Generalisation der Infektion mit Ausbreitung in die verschiedenen Organsysteme bis hin zur offenen Tuberkulose kommen. Von einer infektiösen (offenen) Tuberkulose spricht man, sobald eine Erregerausscheidung stattfindet (PARRISH et al., 1998). Eine derartige Reaktivierung kann durch Unterernährung, zunehmendes Alter und Stress maßgeblich unterstützt werden (RUSSELL, 2007). Liegt bereits zum Zeitpunkt der

Infektion ein schlechter Immunstatus vor, kann es direkt zu einer Generalisation kommen. Durch lympho-hämatogene Dissemination kann der Erreger in die verschiedenen Organsysteme ausstreuen und sich dort manifestieren (Miliartuberkulose) (WALLGREN, 1948).

Namensgebend für die Tuberkulose sind die, im Laufe einer Infektion entstehenden, sichtbaren Tuberkel oder Granulome. Ausschlaggebend für deren Bildung ist die Immunreaktion des Wirtes, wodurch es zur Invasion von Immunzellen in das betroffene Gewebe kommt (RUSSELL, 2007). Läsionen stellen sich in der Regel als kleine feste Knoten dar. Im Zentrum kommt es zur Aggregation von vergrößerten Makrophagen (Epitheloidzellen). Durch deren Fusionierung im Zuge der granulomatösen Entzündung entstehen mehrkernige Riesenzellen vom Langhans-Typ (PUISSEGUR et al., 2004). In der Peripherie dieses Tuberkel-Kerns lagern sich Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten an. Im Laufe der Infektion bildet sich eine fibröse Kapsel um den Tuberkel. Dieser weist zentral eine entstehende, verkäsende Nekrose auf, in deren Bereich zudem eine Mineralisierung beobachtet wurde (NEILL et al., 2001; SAKAMOTO, 2012).



**Abbildung 5: Darstellung eines charakteristischen Tuberkels infolge einer TB-Infektion**

Zu sehen sind zentral eine verkäsende Nekrose (langer Pfeil) sowie umliegende Riesenzellen vom Langhans Typ (kurzer Pfeil)

Modifiziert nach Chien et al. (CHIEN et al., 2016)

### 2.3 Vorkommen

Die Bundesrepublik Deutschland gilt seit 1997 als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (EU-KOMMISSION, 2016); trotzdem treten bis heute immer wieder TB-Fälle bei Rindern und beim Rotwild auf (MENGE et al., 2016). In Teilen Österreichs (Voralberg, Tirol) vermerkte man seit 1999 immer wieder *M. caprae*-Infektionen bei Rind und Rotwild (PRODINGER et al., 2002; SCHOEPF et al., 2012). Entlang der bayrischen Alpenkette und der angrenzenden österreichischen Regionen wird seit 2008 ebenfalls ein Anstieg von *M. caprae*-Infektionen in beiden Spezies festgestellt (FLI, 2013; FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015). Das Rotwild gelangte zunehmend als bedeutender Erregerüberträger in den Fokus, da ein direkter bzw. indirekter Kontakt zwischen Rindern und dem Rotwild auf Alpenweiden nicht zu vermeiden ist (SCHOEPF et al., 2012). In einzelnen Gebieten in Österreich wurden sogar Prävalenzen von bis

zu 40 % bei mit *M. caprae* infiziertem Rotwild festgestellt (KÖSSLER, 2011). Spezielle Wildtier-Monitoring-Programme wurden zur Ermittlung der Tuberkulose-Prävalenz beim Rotwild herangezogen und zeigten diesbezüglich Werte von 1,1 % im Oberallgäu und 2,1 % im Karwendel-Gebiet (GERSTMAIR, 2011). Für die Jagdsaison 2009/2010 ermittelte man für das Rotwild eine *M.-caprae*-Prävalenz von bis zu 23,1 % in Tirol (FINK et al., 2015). Aus Rotwild- und Rinderproben der betroffenen deutsch-österreichischen Regionen (Karwendel, Lechtal) wurde eine Speziesdifferenzierung durchgeführt, welche in einem positiven Nachweis von *M. caprae* resultierte. Dabei wiesen die jeweils regionalen Isolate deutliche Gemeinsamkeiten auf, unterschieden sich allerdings zwischen den einzelnen Gebieten. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Infektion in den einzelnen Regionen seit langem endemisch ist und es lokal zu Veränderungen im Genom von *M. caprae* kam. Dabei scheint es sich um separate Geschehen zu handeln (PRODINGER et al., 2002). Zudem wurde zwischen den Alpenländern Deutschland, Österreich, Schweiz und Italien ein gemeinsames Monitoring, „TB-Alpine-Wildlife“ durchgeführt, das die Dokumentation von Tuberkulose-Infektionen bei Wildtieren mit Schwerpunkt Rotwild als Ziel hatte. Dieses EMIDA (Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock) ERA-Net Projekt ermöglichte eine Beurteilung der Infektionsgefahr, ausgehend von der alpinen Wildtierpopulation. In den ausgewählten Untersuchungsgebieten Tirol und Vorarlberg konnte die geographische Verteilung von, mit *M. caprae* infiziertem Rotwild auf bestimmte Risikogebiete eingegrenzt werden (BMG, 2013). In der Folge wurde dieses Projekt im Rahmen eines bayrischen Tuberkulose-Rotwild-Monitorings entlang der bayerischen Alpenkette fortgesetzt (LGL, 2013). Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der *M.-caprae*-positiven Fälle beim Rotwild, welche im Zuge des TB-Monitorings in den „Hotspot“-Gebieten Tirol und Vorarlberg innerhalb der Jagdperiode von 2009 bis 2015 ermittelt wurden.

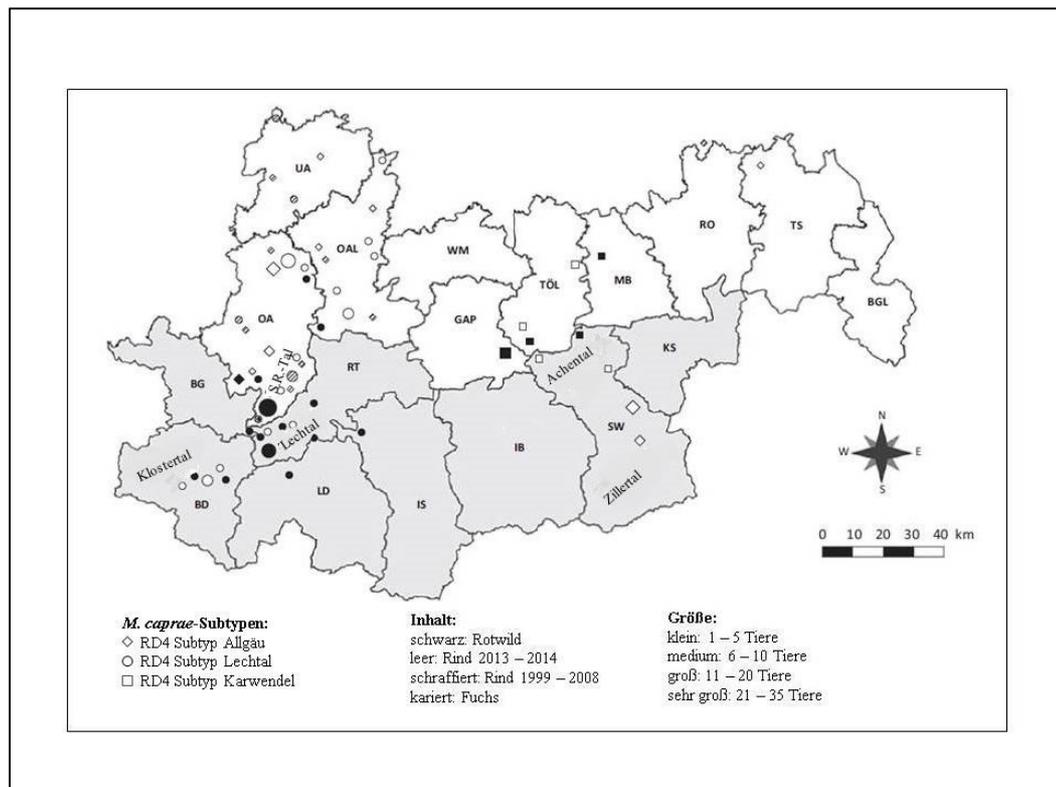
**Tabelle 1: *M.-caprae*-positive Hirsche des Rotwild-TB-Monitorings in Österreich in den Jagdjahren 2009 - 2015**

Gebiete des Rotwild-TB-Monitorings	Anzahl an <i>M.-caprae</i> -positivem Rotwild In den Jagdjahren 2009 – 2015						
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Tirol Seuchengebiet	-	-	82	51	12	15	27
Tirol Karwendel- Screening	-	-	-	0	2	5	2
Vorarlberg	7	4	8	7	24	72	43

Modifiziert nach Bröckl (BRÖCKL, 2017)

Durch die Arbeit von Fink et al. konnte das Rotwild für die österreichische Region offiziell als Reservoirwirt für *M. caprae* definiert werden, was die übergeordnete Bedeutung dieses Erregers beim Rotwild hinsichtlich der TB unterstreicht (FINK et al., 2015). Unter Reservoirwirten versteht man Tiere, die chronisch infiziert sind und den Erreger innerhalb der eigenen Tierspezies oder auf andere Tierspezies übertragen und so zur Ausbreitung und Aufrechterhaltung der Infektion beitragen, wohingegen Überträger, sogenannte „spillover hosts“, den Erreger nur für eine bestimmte Zeit in einer Population halten können und für ein Fortbestehen der Infektion ein erneuter Eintrag von außen nötig ist (CORNER, 2006; NUGENT, 2011). Diese Einteilung ist insofern von Bedeutung, als dass dadurch die Notwendigkeit einer Kontrolle der Wirtsspezies festgelegt werden kann (CORNER, 2006). Zudem wurde eine Übertragung von *M. caprae* zwischen Rind und Rotwild bestätigt. Der Nachweis von, mittlerweile sieben genetisch unterscheidbaren *M.-caprae*-Subtypen in Rindern und Rotwild in definierten deutsch-österreichischen-Regionen belegt eindeutig einen Austausch dieses Erregers zwischen den beiden Wiederkäuerarten in den entsprechenden Gebieten. Abbildung 6 veranschaulicht die räumliche Verteilung der, zunächst bekannt gewordenen vier RD4-Subtypen von *M. caprae* (RETTINGER et al., 2015; BRÖCKL, 2017).

## RD4-Subtypen und Epidemiologie von *M. caprae* in deutsch-österreichischen Regionen



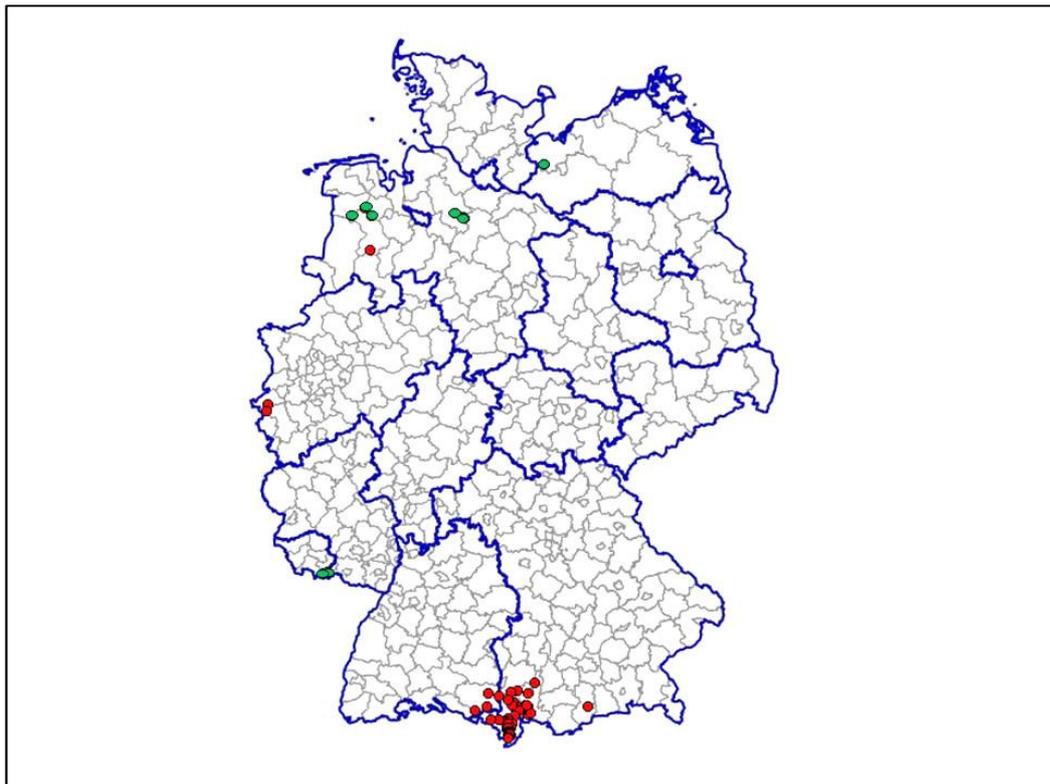
**Abbildung 6: Räumliche Verteilung von *M. caprae* RD4-Subtypen im Rotwild und Rind.**

Hintergrundfarbe: hellgrau, Österreich; weiß, Bayern; UA, Unterallgäu; OAL, Ost-Allgäu; OA: Oberallgäu; WM, Weilheim-Schongau; GAP, Garmisch-Partenkirchen; TÖL, Bad Tölz; MB, Miesbach; RO, Rosenheim; TS, Traunstein; BGL, Berchtesgadener Land; BG, Bregenz; BD, Bludenz; RT, Reutte; LD, Landeck; IS, Imst; IB, Innsbruck Land; SW, Schwaz; KS, Kufstein; S.R.-Tal, Stillach-Rappental

Modifiziert nach Rettinger et al. (RETTINGER et al., 2015)

Im Tierseuchennachrichtensystem (TSN) werden die einzelnen Erreger der Rindertuberkulose erfasst. Seit der Festlegung von *M. caprae* als eigenständige Spezies (ARANAZ et al., 2003), wird dieser Erreger gesondert gelistet. Abbildung 7 zeigt die räumliche Verteilung der vom TSN registrierten Fälle boviner Rindertuberkulose, verursacht durch *M. bovis* bzw. *M. caprae*, in Deutschland in den Jahren 2013-2017. Die dabei konzipierten Daten zeigen einen eindeutigen Schwerpunkt von *M.-caprae*-Infektionen im Süden Deutschlands,

wohingegen im Norden *M. bovis* vorrangig als Verursacher der Rindertuberkulose gilt (FLI, 2016a). Die Dominanz an *M.-caprae*-Infektionen im Süden unterstreicht die, in diesen Gebieten zunehmend dokumentierten TB-Fälle im Rotwild, verursacht durch selbigen Erreger. Diese essentiellen Punkte, dass das Rotwild als offizielles Reservoir von *M.-caprae*-Infektionen definiert wurde und eine Übertragung auf Rinder stattfindet, zeigt die Notwendigkeit einer Kontrolle von *M.-caprae*-Infektionen in Rotwild-Populationen.



**Abbildung 7: Amtlich dokumentierte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland in den Jahren 2013-2017**

Es ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle von *M. bovis* (grün dargestellt) und *M. caprae* (rot dargestellt) zu erkennen.

Datenquelle: TSN, Abfragedatum 01.04.2017

Auch in der Schweiz gibt es Rotwildpopulationen, welche endemisch mit *M. caprae* infiziert sind. Aufgrund der geographischen Lage wird eine Verbindung mit den genannten Fällen in Tirol bzw. Voralberg diskutiert. Ein vermehrtes Auftreten von TB im Rotwild wird in Zusammenhang mit einer vielfach praktizierten, supplementären Fütterung dieser Wildtierpopulation und damit deren

Wachstum gebracht (SCHILLER et al., 2011).

Vermehrt auftretende Tuberkulosefälle unter anderem bei Rot- und Schwarzwild wurden ferner für die Normandie beschrieben (ZANELLA et al., 2008a).

In Spanien, einem EU-Mitgliedsstaat ohne anerkannten, tuberkulosefreien Status gilt das Rotwild ebenfalls als bestehendes Wildtierreservoir und potentielle Infektionsquelle von Rinderbeständen mit bTB (ARANAZ et al., 2004). Durch gezielte Überwachungs- und Bekämpfungsmaßnahmen konnte Spanien eine deutliche Senkung der TB-Prävalenzen in Rinder- und Wildtierpopulationen erreichen (SCHILLER et al., 2011).

Studien ergaben, dass die größte Gefahr einer Übertragung von TB in der EU von dem Rind-Rotwild-Wildschwein-System ausgeht, was die Rolle des Rotwilds als Reservoir und damit Überträger hervorhebt (HARDSTAFF et al., 2014).

#### **2.4 Epidemiologie**

*M. bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* können als Erreger beim Rotwild zur Tuberkulose führen (PRODINGER et al., 2002; WATERS et al., 2008; RINDTB-VO, 2017), wobei das Rotwild als offizielles Reservoir von *M. caprae* gilt. (FINK et al., 2015). Wie in Abschnitt II, 2.3 bereits beschrieben, wurden in den letzten Jahren vermehrt *M.-caprae*-Fälle sowohl beim Rotwild als auch beim Rind in definierten deutsch-österreichischen Gebieten beschrieben. Damit in Zusammenhang vermutete man aufgrund der regionalen Lage auch *M.-caprae*-Fälle beim Rotwild in der Schweiz (SCHILLER et al., 2010). Über die genaue Übertragungsrouten ist dabei wenig bekannt (FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015). Die erhöhte Tuberkulosedichte im Rotwild führte man hauptsächlich auf eine Überpopulation des Schalenwilds in den von Tuberkulose betroffenen Jagdrevieren zurück. Durch verstärkten Tierkontakt aufgrund Winter- bzw. Zusatzfütterung wurde der Ausbreitung des Erregers zusätzlich Vorschub geleistet. Als ursächlich für den Eintrag von *M. caprae* in die Nutztierpopulation betrachtete man den Kontakt zwischen den Wildtieren und Rindern während der Alpengperiode (BMGF, 2013; FINK et al., 2015). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für die Übertragung von *M. bovis* zwischen Rind und anderen Wildtieren, durch deren direkten bzw. indirekten Kontakt auf Weideflächen gemacht (BROOK et al., 2013). Eine verstärkte Zusatz- und Winterfütterung, die unter anderem zu einer gesteigerten Tierdichte führt, wurde

als Ursache für eine erhöhte *M.-bovis*-Prävalenz in Wildtierpopulationen definiert (MILLER & SWEENEY, 2013; PALMER, 2013). Als mögliche Infektionsquellen werden kontaminierte Fütterungsstellen, inklusive Wassertränken und Salzlecksteine, sowie infektiöse Exkrete auf den zugänglichen Flächen in Betracht gezogen (CORNER, 2006). Das Rotwild konnte bereits als offizielles Reservoir von *M. caprae* und wesentlicher Tuberkuloseüberträger auf das Rind identifiziert werden. Aufgrund eines fehlenden epidemiologischen Zusammenhangs zwischen vielen bTB-Fällen bei Rindern in Österreich, schlussfolgerte man daher einen Erregereintrag durch diese Spezies (KÖSSLER, 2012). Tabelle 2 veranschaulicht die in den „Hotspot“-Gebieten Tirol und Vorarlberg angezeigten positiven *M.-caprae*-Fälle bei Rindern.

**Tabelle 2: Angezeigte *M.-caprae*-Infektionen bei Rindern in Tirol und Vorarlberg in den Jahren 2008 - 2015**

Untersuchungsgebiet <sup>e</sup>	Anzahl der <i>M.-caprae</i> -positiven Rinder im Zeitraum von 2008 - 2015							
	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
	Tirol (Bezirke Reutte, Landeck, Imst und Innsbruck-Land)	21	6	6	3	25	4	3
Vorarlberg	-	0	3	0	0	6	8	4

Modifiziert nach Bröckl (BRÖCKL, 2017)

Um dem Infektionsdruck durch das Rotwild entgegenzuwirken wurde landesweit eine Rotwild-TBC-Verordnung in Österreich erlassen, welche durch Kontrolle der Wildtierfütterung sowie Reduktion der Wildbestände in ausgewiesenen Risikogebieten eine Bekämpfung und Überwachung ermöglichen sollte (BMGF, 2017). Studien beschreiben die Möglichkeit einer umgekehrten Übertragung von Rinderpopulationen auf Wildtiere (BENGIS et al., 2002; MILLER et al., 2013). In den beschriebenen Fällen konnte ein Zusammenhang von humanen

*M.-caprae*-Infektionen und dem Auftreten des Erregers in den Tierbeständen ausgeschlossen werden (BMG, 2014). Dass eine *M.-caprae*-Infektion beim Menschen eine TB-Erkrankung auslösen kann und daher als Zoonose von Bedeutung ist, ist bestätigt (PRODINGER et al., 2002; HANSEN et al., 2012). In Spanien konnte infolge der Identifizierung des gleichen caprinen Genotyps in Ziegen und beim Menschen eine direkte Übertragung von *M. caprae* zwischen diesen Spezies bewiesen werden (GUTIÉRREZ et al., 1997; PRODINGER et al., 2002).

## 2.5 Bedeutung als Zoonose

Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent mit Tuberkulose infiziert (WHO, 2016). Das heißt, diese Menschen hatten Kontakt zu Mykobakterien, zeigen aber bisher keine aktive Erkrankung und fungieren nicht als Überträger. Man spricht von einem Risiko von etwa 10 % der infizierten Menschen, während ihres Lebens an TB zu erkranken, wobei eine Immunsuppression durch HIV, Unterernährung sowie Diabetes dieses Risiko entscheidend erhöht. Weltweit ist die Tuberkulose beim Menschen eine von den zehn häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2015 erkrankten 10,4 Millionen Menschen an TB und 1,8 Millionen starben in derer Folge (WHO, 2016). Nach einer Stagnation mit langsam ansteigender Tendenz, verzeichnete man vor allem im Jahr 2015 einen enormen Anstieg der Fallzahlen von, an TB erkrankten Menschen (RKI, 2015b). Vorrangig wird als Ursache eine zunehmende Migrationsrate angeführt (RKI, 2017). Grundsätzlich ist eine Infektion des Menschen durch die Mitglieder des MTC aufgrund des breiten Wirtsspektrums möglich (WIRTH et al., 2008). Der Großteil, der an Tuberkulose erkrankten Menschen wird auf eine Infektion mit *M. tuberculosis* zurückgeführt (MACK et al., 2009), wobei hauptsächlich eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt (MORRISON et al., 2008) und dies im Kontext der Zoonose eine untergeordnete Rolle spielt. *M. bovis* und *M. caprae* besitzen das höchste zoonotische Potential unter den MTC-Mitgliedern (MULLER et al., 2013). Hierbei sind sowohl eine direkte Übertragung vom Tier auf den Menschen und umgekehrt (FRITSCHÉ et al., 2004), als auch indirekt durch den Konsum tierischer Produkte und Lebensmittel, wie z. B. Rohmilch (DE LA RUA-DOMENECH, 2006) beschrieben. Vor allem Angestellte in Zoos sowie auf landwirtschaftlichen Betrieben und Veterinäre sind durch den unmittelbaren Kontakt mit eventuell infizierten Tieren einem erhöhten Risiko ausgesetzt. Nach wie vor gilt der Verzehr

von kontaminierten Rohmilchprodukten als bedeutende Infektionsquelle des Menschen mit zoonotisch bedeutsamen Mykobakterien (TORRES-GONZALEZ et al., 2013). In den heutigen Industrieländern wurde durch die Einführung der Pasteurisierung der Milch (HARRINGTON & KARLSON, 1965) diese Gefahr nahezu vollständig getilgt (THOEN et al., 2006). Die Beurteilung inwiefern *M. bovis* und *M. caprae* als Verursacher an der humanen Tuberkulose maßgeblich beteiligt sind, ist insofern erschwert, als dass bei der Diagnose häufig keine definitive Speziesermittlung erfolgt (THOEN et al., 2006) und diese Fälle statistisch als Infektion mit *M. tuberculosis* einfließen (ACMSF, 2002). Der Anteil an durch *M. bovis* verursachten humanen Tuberkulosefällen in Deutschland lag mit einem definitiven Nachweis in 54 Fällen 2015 bei 1,5 %. Humane Infektionen durch *M. caprae* wurden nicht separat erfasst und fallen statistisch unter die 11,4 % der nicht weiter differenzierten MTC-Infektionen (RKI, 2015a). Im Zeitraum zwischen 1999 und 2001 ergab eine Auswertung von *M.-bovis*-Humanisolaten einen 31 prozentigen Anteil daraus an *M. caprae*. Das bereits in Abschnitt II, 2.3 beschriebene Nord-Süd-Gefälle, wobei *M. bovis* vermehrt im Norden und *M. caprae* im Süden vertreten sind, war auch hier ersichtlich (KUBICA et al., 2003). *M. caprae* kann ebenfalls über erkrankte Tiere, Rohmilch und Rohmilchprodukte übertragen werden und beim Menschen unter anderem Lupus vulgaris (TAR et al., 2009), die häufigste Form der Hauttuberkulose sowie pulmonale und extrapulmonale Formen der Tuberkulose auslösen (PRODINGER et al., 2002; BLAAS et al., 2003). Zudem wurde 2012 ein Fall der tuberkulösen Meningitis, hervorgerufen durch *M. caprae*, bei einer Person aus Süddeutschland veröffentlicht (HANSEN et al., 2012).

## 2.6 Tuberkulose bei weiteren Wildtieren

*M. bovis* und *M. caprae* gelten, wie auch *M. tuberculosis*, *M. africanum* und *M. microti* als Erreger der Tuberkulose (RINDTB-VO, 2017) und sind Hauptverursacher der TB in domestizierten Tierpopulationen (PESCIAROLI et al., 2014). Die einzelnen Mitglieder des MTC unterscheiden sich zwar in ihrer Wirtsspezifität, wobei die Erreger der Tuberkulose, v. a. *M. bovis* ein breites Wirtsspektrum aufweisen (BASS et al., 2013; FINK et al., 2015). So kann es nachweislich zu einer Infektion von z. B. Rind (THAKUR et al., 2012), Afrikanischen Büffeln (*Syncerus caffer*) (PALMER, 2013), Wildwiederkäuer (NUGENT, 2011), Dachs (BIELBY et al., 2014; BYRNE et al., 2014), Haus- und

Wildschwein (NARANJO et al., 2008; PALMER, 2013), Fuchskusu (PALMER, 2013), Mensch (FRITSCHKE et al., 2004) etc. kommen. Durch die geringe Wirtsadaptation des Erregers an das Rind kommen Infektionen weltweit in verschiedenen Wildtierpopulationen vor, welche zur Ausbreitung der Erkrankung beitragen und eine Kontrolle der Krankheit schwierig machen (CHAMBERS, 2013; PALMER, 2013).

Großbritannien gilt nicht als tuberkulosefreies Land und muss nach wie vor hohe Prävalenzen der bovinen Tuberkulose verzeichnen. Bis zum Austritt aus der EU, wiesen Irland mit 4,37 % und das Vereinigte Königreich mit 3,27 % die höchsten Herdenprävalenzen aller Mitgliedstaaten auf (SCHILLER et al., 2011). Nach wie vor wird eine ansteigende Tendenz beschrieben, was die Forderung nach stetig steigenden Bekämpfungsmaßnahmen begründet (REYNOLDS, 2006). Dabei stellt der Dachs als Wildtierreservoir eine herausragende Gefährdung bezüglich des Eintrags der bovinen Tuberkulose in die Rinderbestände dar (GORMLEY & CORNER, 2013). Zunächst versuchte man in Gebieten mit einer sehr hohen TB-Infektionsrate bei Dachsen durch Reduktion der Populationen den Infektionsdruck und damit die Gefahr der Übertragung auf Rinderherden einzudämmen (WILSON et al., 2011; GORMLEY & CORNER, 2013). Es konnten zwar in den entsprechend bejagten Gebieten geringe Erfolge aufgrund einer abnehmenden Inzidenz der Infektion in Rinderbeständen verzeichnet werden, allerdings blieb weitflächig dieser Erfolg aus. Vielmehr wurde insgesamt trotzdem eine tendenziell steigende bTB-Inzidenz in den Rinderpopulationen beobachtet und dadurch das Programm offiziell gestoppt (WILSON et al., 2011). Des Weiteren steht der Dachs in Irland und dem United Kingdom unter Naturschutz, was diese Form der bTB-Bekämpfung deutlich einschränkt (GORMLEY & CORNER, 2013). Gegenwärtig verfolgt man die Strategie, die Infektionsquelle Dachs zu minimieren, indem man die Möglichkeit einer flächendeckenden und kosteneffektiven Vaccination fokussiert, wobei sich kommerziell verfügbares BCG in ersten Studien bereits als sicher erwies (LESELLIER et al., 2006) und zu einer schützenden Immunität führte (CORNER et al., 2008). Da eine Manipulation der Tiere im Zuge der Verabreichung der Vakzine notwendig ist, sollen weitere Entwicklungen auf einen, oral verfügbaren Impfstoff abzielen (WILSON et al., 2011). Auch hier verzeichneten erste Studien bereits positive Resultate (CORNER et al., 2010).

In Spanien stellt nicht nur das Rotwild, sondern auch das Wildschwein ein Reservoir der bovinen Tuberkulose und damit eine potentielle Gefahr der Eintragung von *M. bovis* in Rinderpopulationen dar (siehe Abschnitt II, 2.3) (NARANJO et al., 2008). Neben der Bejagung von Wild und deren Abgrenzung von Weideflächen der Rinder, wird auch hier die Entwicklung wirksamer und einfach anwendbarer Vakzine in den Fokus gestellt, um bestehende Infektionsherde zu minimieren (BALLESTEROS et al., 2009). Wie in Abschnitt II, 2.3 beschrieben, stellt das Rind-Rotwild-Wildschwein-System europaweit das meist vertretene System bezüglich der bTB-Übertragung dar (HARDSTAFF et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

Auch außerhalb Europas ist die Rindertuberkulose eine Gefährdung der Tiergesundheit. So sind der Fuchskusu und das Frettchen in Neuseeland ein Reservoir an *M. bovis* (CORNER, 2006; NUGENT, 2011) und damit potentielle Infektionsquelle für dortige Rinderherden (TWEDDLE & LIVINGSTONE, 1994; GRIFFIN et al., 2004).

In den USA gilt der Weißwedelhirsch als chronisch mit *M. bovis* infiziert und wird offiziell als Wildtierreservoir der bovinen Tuberkulose betrachtet (NUGENT, 2011; WATERS & PALMER, 2015).

In Australien gelten sowohl das Wildschwein als auch der Wasserbüffel als potentielle Infektionsquelle von *M. bovis* (CORNER, 2006).

### **3 Diagnose der Tuberkulose beim Rotwild**

Die Diagnostik der bovinen Tuberkulose, u. a. der Nachweis von *M. caprae* beim Rotwild, stützt sich im Allgemeinen auf die für das Rind beschriebenen Möglichkeiten zur Feststellung von TB (FLI, 2016b; RINDTB-VO, 2017). Grundsätzlich kann eine Einteilung der diagnostischen Methoden in post mortem und ante mortem Methoden erfolgen.

#### **3.1 Post mortem Diagnose**

Die post mortem Untersuchung von Schlachtkörpern stellt gegenwärtig die einzige Möglichkeit dar, um beim Rotwild TB-verdächtige Läsionen nachweisen zu können. TB-Kontrollprogramme bei Wildtieren werden in verschiedenen Ländern in Form einer Kombination aus Schlachttieruntersuchung und Intrakutantest durchgeführt (WATERS et al., 2008).

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung wird das Augenmerk auf die für die Tuberkulose klassischen Granulome gerichtet. Derartige Veränderungen sind allerdings erst in fortgeschrittenen Stadien visuell eindeutig zuzuordnen und können in einem frühen Infektionsstadium nicht sicher detektiert werden. Bei Routineuntersuchungen von Rinder-Schlachtkörpern erfolgt die Examinierung oft unzureichend, wodurch positive Tiere nicht erkannt werden. Zudem ist lediglich die Erhebung einer Verdachtsdiagnose möglich, die nachfolgend bestätigt werden muss. Somit erweist sich die Untersuchung der Schlachtkörper zur Detektion von TB als wenig effizient (GORMLEY et al., 2006; RINDTB-VO, 2017). Tiere, welche im Hauttest positiv sind, werden oft bei der Schlachttieruntersuchung nicht als solche erkannt, da sie noch keine makroskopisch sichtbaren Läsionen (non visible lesions, NVL) entwickelt haben. Corner und Mitarbeiter berichteten in einer Studie, dass bis zu 53 % der im Hauttest positiven Tiere in der pathologisch-anatomischen Untersuchung als falsch negativ hervorgehen (CORNER, 1994). Eine weitere Studie ergab eine Sensitivität der post mortem Untersuchung von Schlachttieren von nur 28 % (SCHILLER et al., 2011). Da als primäre Eintrittspforten der Respirations- bzw. Gastrointestinaltrakt gelten, ist eine erste Entwicklung von Läsionen in den dazugehörigen Organen und regionalen Lymphknoten am wahrscheinlichsten (MCCORRY et al., 2005). Grundsätzlich kann in Gebieten mit einer sehr hohen TB-Prävalenz größeres Vertrauen in eine erfolgreiche Detektion von TB-verdächtigen Tieren durch die Untersuchung von Schlachtkörpern gelegt werden, während im Falle einer niedrigen Prävalenz eine sichere Diagnose des Bakteriums mittels sensitiveren Methoden an Wichtigkeit zunimmt. In einer Studie, in der die bTB-Prävalenz bei Rindern bei 19,8 % lag, konnte eine Sensitivität von 78,4 % und eine Spezifität von 99 % erreicht werden. Letztendlich kann eine Infektion mit Erregern der bovinen Tuberkulose erst durch eine nachfolgende Bestätigung mittels bakteriologischer Untersuchung definitiv sichergestellt werden (CORNER, 1994; PUCKEN et al., 2017). Besteht beim Rind der Verdacht auf bovine Tuberkulose infolge der Schlachttieruntersuchung, ist laut RindTbVO (Stand 17.05.2017) ein molekularbiologischer Nachweis mittels Nukleinsäureamplifikationstechnik obligat (RINDTB-VO, 2017). Studien, welche sich mit den pathologisch-anatomischen Veränderungen verschiedener Hirscharten infolge TB beschäftigt haben, konnten eine unterschiedliche Ausprägung der Läsionen verglichen mit jenen beim Rind aufzeigen. Experimentell infizierte Tiere hatten entweder keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen oder wiesen

dünnwandige, abszessähnliche Läsionen mit flüssigem Inhalt auf. Verkalkungen, wie sie beim Rind oftmals beobachtet werden, waren kaum vertreten (PALMER et al., 2002). Infiziertes Rotwild tendiert zu einer Generalisation der Infektion und spielt aufgrund der Neigung zu einer offenen Tuberkulose eine bedeutende Rolle als Überträger (ZANELLA et al., 2008b). Generell sind beim Rotwild neben pathologisch-anatomischen Veränderungen der retropharyngealen, thorakalen und abdominalen Lymphknoten auch visuelle Läsionen in den Tonsillen typisch (MARTÍN-HERNANDO et al., 2010).

Besteht infolge der Schlachtkörperexaminierung von Rindern bzw. von Rotwild der Verdacht auf TB, können nachfolgend weitere post mortem Untersuchungen, wie die mikroskopische Untersuchung, der kulturelle Nachweis von Mykobakterien sowie die Polymerase-Kettenreaktion angeschlossen werden. Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeit, vorhandene Läsionen sicher identifizieren zu können, ist die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises von Mykobakterien als gering zu werten.

Durch den mikroskopischen Nachweis können die Mykobakterien als säurefeste Stäbchen einfach und schnell dargestellt werden. Eine Speziesdifferenzierung ist dabei allerdings nicht möglich (NEUMEISTER et al., 2009). Die geläufigste Methode stellt dabei die Färbung nach Ziehl-Neelsen dar (COOK, 1997). Die Mykobakterien erscheinen als rot gefärbte Stäbchen auf blauem Untergrund (FLI, 2016b). Zudem kann eine Visualisierung mittels Fluoreszenzmikroskop und vorangegangener Färbung der Proben mit Auramin erfolgen. (NEUMEISTER et al., 2009). Mykobakterien lassen sich dabei gelb-rötlich darstellen (HOLANI et al., 2014). Die mikroskopische Darstellung gestaltet sich einfach und schnell. Allerdings schreibt man ihr nur eine geringe Sensitivität zu (STEINGART et al., 2006). Eine weitere Voraussetzung für ein Gelingen der mikroskopischen Untersuchung ist eine ausreichend hohe Bakterienkonzentration in der zu untersuchenden Probe. So ist erst ab einer Bakteriendichte von mehr als  $10^4$  Organismen/ml ein zuverlässiger Nachweis möglich (RÜSCH-GERDES & HILLEMANN, 2008).

Eine definitive Diagnose kann nur mit einer Isolierung des Erregers oder des Nachweises seiner DNA erreicht werden. Als Goldstandard gilt dabei nach wie vor die kulturelle Isolierung des Erregers (NEUMEISTER et al., 2009). In einem positiven Fall gilt die Diagnose als beweisend und wird als Bestätigungstest infolge

anderer diagnostischer Methoden, wie z. B. der Schlachtkörperuntersuchung oder des Intrakutantests herangezogen (RINDTB-VO, 2017). Gebräuchliche Nährmedien zur kulturellen Isolation von Mykobakterien sind die Festnährböden Löwenstein-Jensen und Stonebrink sowie die Flüssigmedien Middlebrook und Kirchner, empfohlen durch das veterinärmedizinische Referenzlabor für Tuberkulose des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) und veröffentlicht in Form der Amtlichen Methodensammlung (FLI, 2016b). Mykobakterien weisen in Flüssignährmedien das bessere Wachstum auf; allerdings ist hierbei die Gefahr einer Kontamination größer. Eine Kombination aus flüssigen und festen Nährmedien erwies sich als Mittel der Wahl (NEUMEISTER et al., 2009; GORMLEY et al., 2014). Die Entwicklung sichtbarer Läsionen erfolgt, wie bereits zuvor beschrieben, erst während des Fortschreitens der Infektion (GORMLEY et al., 2006). Das heißt, auch im Falle der Kultur kann sich das Auffinden von visuellen Veränderungen als limitierender Faktor auswirken, da frühe Infektionsstadien oft mangels positiven Materials unentdeckt bleiben und so eine gezielte Probenahme erschwert ist. Maßgeblich für eine erfolgreiche Anzucht ist zudem die richtige Durchführung (GORMLEY et al., 2014). Enthält das Untersuchungsmaterial zwar Erreger, sind diese aber nicht mehr vermehrungsfähig, kann dies zu falsch-negativen Resultaten führen (WARDS et al., 1995). Das langsame Wachstum der Mykobakterien und der damit verbundene enorme Zeitaufwand stellen zudem weitere Nachteile dieses Verfahrens dar (CARDOSO et al., 2009).

Als molekularbiologische Nachweismethode sieht die Verordnung zum Schutz gegen die Rindertuberkulose die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vor. Der Verdacht eines bTB-positiven Rindes kann unter anderem durch den Nachweis von MTC-DNA bestätigt werden (RINDTB-VO, 2017). Die Durchführung dieser Methode wird ebenfalls in der Amtlichen Methodensammlung des FLI beschrieben. Es können hierbei auch Erreger, die nicht mehr lebensfähig sind, nachgewiesen werden (FLI, 2016b). Das Funktionsprinzip stützt sich auf den Nachweis zweier Genfragmente. So dienen als Zielsequenzen das Gen für eine hypothetische Helicase (HELI), (RODRIGUEZ et al., 1995) sowie das Insertionsfragment (IS) 1081. Taylor und Mitarbeiter gelang es durch den Einsatz des IS 1081 in der PCR eine *M. bovis*-Detektionsrate von 91 % der in Kultur positiven Proben zu erreichen (TAYLOR et al., 2007). Der Nachweis von MTC-Mitgliedern gilt als positiv, wenn die Nukleotidsequenzen beider Genorte amplifiziert werden, wohingegen der Beweis von nur einem der beiden Genorte als fragwürdiges Resultat gewertet wird.

Als interne Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Extraktion dient die Amplifizierung der genomischen DNA des  $\beta$ -Aktin Gens aus dem tierischen Gewebe. Dieses muss mit einem adäquaten Threshold-Cycle (Ct) nachgewiesen werden, um eine Interpretation bezüglich bTB positiv oder negativ zu ermöglichen. Werden für beide Genorte negative Signale sowie ein positives im Falle von  $\beta$ -Aktin erzielt, gilt die Probe als bTB negativ (FLI, 2016b). Im Falle eines positiven Ergebnisses in der PCR kann eine weitere Differenzierung von *M. bovis* sowie *M. caprae* vorgenommen werden. Zur Identifizierung von *M. bovis* dient die RD4-Region (TAYLOR et al., 2007). Diese „region of difference“ ermöglicht eine Differenzierung zwischen *M. bovis* und anderen Mitgliedern des MTC, mit Ausnahme eines bestimmten Genotyps von *M. caprae* (DOMOGALLA et al., 2013). Dieser kann mit der RD4-PCR nach Taylor et al. nicht differenziert werden. In Regionen mit einer erhöhten *M.-caprae*-Prävalenz beim Rotwild kann durch den Einsatz einer, nach Reddington et al. modifizierten real-time PCR eine weiterführende Differenzierung durchgeführt werden und somit eindeutig eine Identifizierung von *M. caprae* erfolgen (REDDINGTON et al., 2011; FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015; FLI, 2016b). Wie bei den anderen Methoden, stellt auch bei der PCR die geringe Wahrscheinlichkeit eines Nachweises im Falle nicht sichtbarer Läsionen einen kritischen Punkt dar. Die inhomogene Verteilung der Mykobakterien im Gewebe und die zufällige Gewebeauswahl, wenn keine makroskopischen Veränderungen sichtbar sind, (STEWART et al., 2013) verringern die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von Mykobakterien bei der DNA-Extraktion, welche der PCR vorgeschaltet ist.

### 3.2 Ante mortem Diagnose

Wie oben erläutert, kann *M.-caprae*-infiziertes Rotwild bislang nur infolge einer Schlachttieruntersuchung als potentiell MTC-infiziert identifiziert werden. Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist dabei die Detektionsrate infizierter Tiere gering und stellt keine adäquate Methode dar, positive Tiere als solche zu erkennen.

Eine klinische Untersuchung von Tieren scheidet als TB Diagnostikmethode infolge der oft langen subklinischen Phase mit fehlenden Krankheitsanzeichen und der erschwerten Durchführung beim Rotwild, das dafür immobilisiert werden müsste aus. Aufgrund der geringen Spezifität und Sensitivität ist auch eine Anwendung beim Rotwild zur Diagnose von TB nicht hilfreich (GORMLEY et al., 2006).

Eine Antikörperbildung erfolgt im Falle einer TB-Infektion erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf. Die Immunantwort der bovinen Tuberkulose zeichnet sich durch eine Verlagerung von einer, zunächst dominierenden, zellvermittelten Immunantwort hin zu einer Antikörperantwort im späteren Krankheitsverlauf aus (RITACCO et al., 1991; POLLOCK et al., 2001; POLLOCK et al., 2005; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Waters und Mitarbeiter beschrieben, dass eine Korrelation zwischen Antikörperantwort und Fortschreiten der Erkrankung sowie pathologischen Veränderungen besteht, was wiederum die späte Antikörperbildung erklärt (WATERS et al., 2011). Generell kann diesbezüglich ein Nachweis infolge einer TB-Infektion schnell und einfach mittels ELISA ermittelt werden, allerdings wurden starke, individuelle Variationen bezüglich der Antikörperbildung festgestellt (ACHKAR & ZIEGENBALG, 2012). Die nach wie vor geringe Sensitivität spricht gegen einen primären Einsatz dieses Testverfahrens in der TB-Diagnostik (SCHILLER et al., 2010; BEZOS et al., 2014). Bis dato konnten verschiedene Studien für etwaige Wildtierspezies, unter anderem für das Rotwild zeigen, dass die Bildung von Antikörpern einen schnelleren und besseren Hinweis auf eine TB-Infektion liefert als dies beim Rind der Fall ist (GRIFFIN et al., 2006; HARRINGTON et al., 2008). So konnten beim Rotwild bereits nach vier Wochen post infectionem Antikörper festgestellt werden (HARRINGTON et al., 2008). Während beim Rind anfänglich eine eindeutige Dominanz der zellulären Immunantwort vorliegt (SCHILLER et al., 2010) und die Bildung von Antikörpern vernachlässigbar ist, scheint diese beim Rotwild besser ausgeprägt zu sein. Selbiges wurde für andere Wildtiere, wie das Warzenschwein, festgestellt (ROOS et al., 2016). Trotz der Tatsache, dass die Antikörperantwort bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich früh ausgeprägt ist, treten auch hier die genannten Nachteile, wie starke individuelle Variationen und eine vergleichsweise geringe Sensitivität auf. Dies spricht dafür, auch beim Rotwild andere Diagnostikmethoden, wie den IFN- $\gamma$  release assay oder den Intrakutantest, als Mittel der Wahl vorzuziehen (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; HARRINGTON et al., 2008).

Um einer weiteren Ausbreitung von *M.-caprae*-Infektionen innerhalb von Rotwildpopulationen entgegen wirken zu können, sind neue ante-mortem-Test-Methoden gefordert, welche eine Detektion infizierter Tiere *in vivo* ermöglichen. Bestehende Methoden sind dahingehend der Intrakutantest sowie der Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release assay.

### 3.2.1 Intrakutantest

Intrakutantests (Tuberkulinhauttests, englisch: Tuberculin-Skin-Test (TST)) gelten nicht nur für die Anwendung beim Rind, sondern auch in Wildtierpopulationen, als internationaler Standard für die ante mortem Diagnose der TB (TRYLICH, 1960; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Die Überwachung und Kontrolle der Tuberkulose unter anderem bei Wildtieren stützte sich vielerorts auf eine Kombination aus Schlachttieruntersuchung und Intrakutantest (WATERS et al., 2008). Der Hauttest basiert auf einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion (siehe Abschnitt II, 1.3) nach intradermaler Injektion von aufbereitetem Tuberkulin, den sogenannten PPDs (purified protein derivative); (WOOD et al., 1990; MONAGHAN et al., 1994). Zunächst eingesetzt als therapeutische Vakzine im Bereich der Humanmedizin wurden diese Proteine nach und nach weiterentwickelt und werden seitdem als diagnostisches Mittel in der Human- und Tiermedizin verwendet (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Neben PPDs erwiesen sich bislang weitere TB-spezifische „peptide cocktails“ als geeignete Stimulanzen (siehe Abschnitt V, 4.1). Aufgrund der zellvermittelten Immunreaktion im Falle einer Infektion, kommt es lokal zu einer Schwellung der Haut. Drei Tage nach der Injektion wird die Hautdicke gemessen, um einen Rückschluss auf eine vorhandene Infektion zu ziehen (SCHILLER et al., 2010). Die einfachste Form des TST ist der single intradermal test (SIT), bei welchem Tuberkulin im Bereich des Halses (cervical intradermal test; CIT) oder der Schwanzregion (caudal fold test; CFT) appliziert wird (MONAGHAN et al., 1994; SCHILLER et al., 2011). Einige Antigene des bovinen PPDs (bPPD), welches in dieser Form des Tests Anwendung findet, kommen sowohl in tuberkulösen als auch in nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) vor. Im Falle eines Kontakts mit NTM kann es demnach zu Kreuzreaktionen im Test und falsch-positiven Ergebnissen kommen (POLLOCK et al., 2005; SCHILLER et al., 2010). Um dies zu verhindern, wurde die Methode modifiziert. Der comparative cervical test (CCT) sieht die Injektion von bovinem PPD und gleichzeitig aviärem PPD (aPPD) vor. Im Falle einer *M. bovis*-Infektion zeigen die Tiere eine gesteigerte Reaktion im Bereich der Injektionsstelle von bPPD. Somit kann eine bessere Differenzierung dahingehend gemacht werden, ob es sich um eine Infektion mit *M. bovis* handelt oder ob die Tiere lediglich nicht tuberkulösen Mykobakterien ausgesetzt waren (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2011). Eine Studie von Queiros und Kollegen zeigte, dass Tiere einer Rotwildpopulation im SIT als positiv hervorgingen, nicht aber im CCT.

Eine Infektion mit MTC-Mitgliedern konnte nachfolgend ausgeschlossen werden, wohingegen die Präsenz von NTM bestätigt wurde (QUEIROS et al., 2012). Die ordnungsgemäße Durchführung und Auswertung des Tests ist in der Verordnung (EG) Nr. 1226/2002 der Kommission vom 8. Juli 2002 zur Änderung von Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG des Rates in der jeweils gültigen Fassung dokumentiert. Ein Ergebnis wird demnach als positiv gewertet, wenn nach 72 Stunden eine Anschwellung der Hautfalte an der entsprechenden Injektionsstelle von mehr als 4 mm festzustellen ist. Beim Simultantest muss die Hautfalte an der Injektionsstelle des bPPD diejenige des aPPD um 4 mm überragen (Stand 2015) (EU-KOMMISSION, 2002; EU, 2015).

Bezüglich der Anwendung beim Rind wird für den Monotest eine Sensitivität von 80,0 – 91,0 % und eine Spezifität von 75,5 – 96,8 % angegeben. Im Vergleich dazu wird beim Simultantest eine Sensitivität von 55,1 – 93,5 % und eine Spezifität von 88,8 – 100 % erreicht (SCHILLER et al., 2010; PUCKEN et al., 2017).

Beim Rotwild gibt es diesbezüglich enorme Variationen, was seinen Nutzen für diese Spezies in der TB-Diagnostik stark limitiert (CHAMBERS, 2013). Eine Studie dazu ergab, dass die Sensitivität und damit der Erfolg dieses diagnostischen Tests beim Rotwild stark von dem gegenwärtigen Infektionsstatus abhängt. Während der ersten sechs Monate post infectionem erreichte man eine Sensitivität von bis zu 80 %, während diese in chronisch erkrankten Tieren deutlich abnahm (GRIFFIN et al., 2004). Ein weiterer bedeutender Nachteil der Anwendung bei Wildtieren ist die notwendige und mehrfache Manipulation zur Injektion und zur Auswertung des Tests, was in der Praxis nur schwierig durchzuführen ist (HARRINGTON et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2009). Außerdem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass zu unterschiedlichen Jahreszeiten die Test-Ergebnisse des TST bei Rotwild variieren (FERNÁNDEZ-DE-MERA et al., 2011).

Um einer fehlerhaften Testinterpretation vorzubeugen, ist eine exakte Durchführung des Testes unerlässlich. Injektionen müssen sorgfältig und unter Berücksichtigung der ordnungsgemäßen Stelle sowie Tuberkulindosis durchgeführt werden. Eine nachfolgende Palpation der Haut bzw. Messung der Hautdicke soll durch die gleiche Person durchgeführt werden, welche auch das Tuberkulin appliziert hat (OIE, 2009). Als weiterer Nachteil des Intrakutantests ist die oftmals fehlerhafte Interpretation der Testresultate durch Veterinäre zu nennen, was zu falschen Ergebnissen führen kann (PUCKEN et al., 2015).

### 3.2.2 Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) release assay

#### 3.2.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Der IFN- $\gamma$  release assay wird als *in-vitro*-Bluttest zum Nachweis boviner Tuberkulose eingesetzt (WOOD & JONES, 2001). Erstmals wurde er in Australien für den Nachweis boviner Tuberkulose bei Rindern in Kombination mit dem Intrakutantest verwendet (WOOD et al., 1991). Wood und Kollegen beschrieben 1990 einen „*in vitro* cellular bio assay“, basierend auf der IFN- $\gamma$ -Freisetzung von sensibilisierten Lymphozyten nach vorangegangener Inkubation mit spezifischen Antigenen (WOOD et al., 1990). Mit der Möglichkeit, speziell bovines IFN- $\gamma$  detektieren zu können, wurde dieses Testsystem von Rothel et al. 1990 verbessert und diente in der Folge als Basis für die heute verfügbaren Tests zur Detektion von IFN- $\gamma$  im Zuge der bTB-Diagnose beim Rind (ROTHEL et al., 1990). Kommerziell erhältliche Testkits (BOVIGAM® TB Kit, BOVIGAM® 2G TB Kit, life technologies) dienen als staatlich anerkannte Nachweisverfahren für die Untersuchung von Rindern auf bTB und werden in der Amtlichen Methodensammlung des FLI als indirekte Nachweismethoden aufgeführt (FLI, 2016b), die eine Verdachtsdiagnose erlauben. EU-Mitgliedstaaten können gemäß der Richtlinie 64/432/EWG zusätzlich zum Tuberculin-Skin-Test den IFN- $\gamma$ -Test genehmigen, um möglichst flächendeckend infizierte Tiere zu identifizieren (Stand 2015) (EU, 2015). Ein Pendant zum Bovigam® wurde bereits erfolgreich für den Nachweis einer *M.-bovis*-Infektion beim Rotwild entwickelt, der sogenannte Cervigam (Pfizer Animal Health) (WATERS et al., 2006; WATERS et al., 2008). Dieser Test ist gegenwärtig nicht mehr verfügbar. In der Humanmedizin wird der QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT) Test als Diagnostikmethode nach entsprechendem Testprinzip angewendet (BOCCHINO et al., 2008; PAI et al., 2014).

#### 3.2.2.2 Prinzip des IFN- $\gamma$ release assays

Der IFN- $\gamma$  release assay basiert auf dem Nachweis einer zellvermittelten Immunantwort infolge einer mykobakteriellen Infektion, unter anderem mit *M. bovis* und *M. tuberculosis* (WOOD & JONES, 2001; SCHILLER et al., 2010; PAI et al., 2014). Generell läuft der Test in zwei Phasen ab (SCHILLER et al., 2010). Zunächst werden Blutproben gewonnen und schnellstmöglich ins Labor transportiert. Dort erfolgt die Stimulation der aliquotierten Blutproben mit entsprechenden Antigenen und eine anschließende Inkubation bei 37 °C für 16 - 24 Stunden (WOOD & JONES, 2001; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006;

SCHILLER et al., 2010). Als Antigene dienten zunächst die in Abschnitt II, 3.2.1 bereits beschriebenen PPDs (WOOD et al., 1990). Im Falle des Bovigam wird dabei bovines PPD (bPPD) sowie aviäres PPD (aPPD) eingesetzt (WOOD & JONES, 2001). In mehreren Studien erwiesen sich TB-spezifische „peptide cocktails“, wie z. B. ESAT-6 (early secretory antigen target 6) und CFP10 (culture filtrate protein 10) als weitere mögliche Stimulanzen in der CMI-basierenden TB-Diagnostik (VORDERMEIER et al., 2002; AAGAARD et al., 2006; BASS et al., 2013). Diese neuen Proteine finden bereits in der Humanmedizin Verwendung, da sie weder im Genom vom BCG-Impfstamm noch in jener der meisten NTM codiert und dadurch spezifischer als die PPDs für den Nachweis von *M. tuberculosis* sind (PAI et al., 2014). Bezüglich des Nachweises von bTB können mit diesem Cocktail *M. bovis* BCG-geimpfte Tiere von infizierten unterschieden werden, allerdings wurde eine geringere Sensitivität bei erhöhter Spezifität gegenüber den PPDs festgestellt (VORDERMEIER et al., 2001; AAGAARD et al., 2006; BASS et al., 2013). Eine Kombination der Proteine ESAT-6, CFP10 und Rv3615c führt zu einer besseren Sensitivität (SIDDEERS et al., 2008). Nach Ablauf der Inkubationszeit mit diesen spezifischen Antigenen werden die Plasmaüberstände abgenommen und können, wenn sie nicht unmittelbar weiter verarbeitet werden bei -20 °C gelagert werden (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; WATERS et al., 2008). Durch die eben beschriebene Stimulation, wird im Falle einer TB-Infektion eine CMI-basierende Immunantwort provoziert. Liegt eine Infektion mit *M. bovis* vor, reagieren sensibilisierte T-Zellen infolge einer Stimulation mit einem *M.-bovis*-spezifischen Antigen mit der Freisetzung des Zytokins IFN- $\gamma$ . Dies entspricht der *in vivo* Reaktion, welche im infizierten Wirt infolge einer Infektion abläuft (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Am Beispiel des Bovigam® wird diese Immunreaktion durch die Stimulation mit bPPD ausgelöst. Liegt eine Infektion mit *M. bovis* vor, setzen sensibilisierte T-Zellen messbares IFN- $\gamma$  in den Proben frei. Liegt hingegen eine Infektion mit *M. avium* oder NTM vor, wird die IFN- $\gamma$  Produktion am höchsten in den Teilproben ausfallen, welche mit aPPD versetzt wurden (WOOD & JONES, 2001; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Eine *M.-bovis*-Infektion ist angezeigt, wenn durch die Stimulation mit bovinem Tuberkulin quantitativ deutlich mehr IFN- $\gamma$  freigesetzt und gemessen wird als bei entsprechend, mit aviärem Tuberkulin stimulierten Proben sowie der Negativkontrolle (WOOD & JONES, 2001; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2010). Selbiges Prinzip liegt den IFN- $\gamma$  release assays in der Humandiagnostik zugrunde. Für die

Stimulation werden entsprechend geeignete Antigene verwendet (WATERS et al., 2008; PAI et al., 2014). Im zweiten Teil des Testverfahrens erfolgt der eigentliche Nachweis des freigesetzten IFN- $\gamma$  mittels Sandwich-ELISA und anschließender Messung der optischen Dichte (OD) anhand eines Spektralphotometers. Die Proben werden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450$  nm ausgewertet. Das freigesetzte IFN- $\gamma$  kann aufgrund der erhaltenen OD-Werte quantifiziert werden und eine Infektion anhand testspezifischen Kriterien festgestellt werden (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2010; BASS et al., 2013).

### **3.2.2.3 Vor- und Nachteile des IFN- $\gamma$ release assays gegenüber dem Intrakutantest**

Hinsichtlich der ante mortem Diagnostik der Tuberkulose in Wildtierpopulationen weist der IFN- $\gamma$  release assay Vorteile gegenüber den traditionell verwendeten Methoden auf. Beim IFN- $\gamma$ -Test als *in vitro* Methode werden einmalig Blutproben benötigt, wodurch eine wiederholte Manipulation der Tiere vermieden werden kann. Dadurch ist die Untersuchung von lebendem Rotwild und anderen Wildtieren im Zuge von Überwachungsprogrammen deutlich einfacher zu bewerkstelligen (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; FERNÁNDEZ et al., 2009; BASS et al., 2013; BEZOS et al., 2014). Im Gegensatz dazu ist beim TST eine wiederholte Immobilisation der Tiere unumgänglich, um nach 72 Stunden die Hautdicke zu messen (siehe Abschnitt II, 3.2.1). Zudem ermöglicht der IFN- $\gamma$ -Test die Untersuchung von mehreren Proben gleichzeitig innerhalb kurzer Zeit, ist kostengünstig und gewährleistet eine Standardisierung der Technik in den einzelnen Laboren (BEZOS et al., 2014). Der Test kann einfach wiederholt werden und bietet eine größere Objektivität bezüglich der Prozedur sowie Interpretation im Vergleich zum TST (SCHILLER et al., 2010). Des Weiteren kann im IFN- $\gamma$ -Test eine Immunantwort merklich früher (nach 1 – 5 Wochen) als dies im TST der Fall ist (nach 3 – 6 Wochen) detektiert werden. Auch der Einsatz definierter Antigene ermöglicht eine Differenzierung zwischen einer IFN- $\gamma$ -Antwort infolge einer Infektion und jener aufgrund einer *M.-bovis*-Vakzination oder durch NTM (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; PAI et al., 2014). Dies ist beim TST nur bedingt durch den Einsatz des CCT möglich; beim SIT ist eine Unterscheidbarkeit dahingehend nicht gegeben (POLLOCK et al., 2005; SCHILLER et al., 2010). Bezüglich Sensitivität und Spezifität des IFN- $\gamma$  release assays existieren stark variierende Angaben. Verschiedene Studien beschreiben dabei eine Sensitivität von

66,9 % bis 100 % und eine Spezifität von 70 % bis 99,6 % (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; CLEGG et al., 2011; BEZOS et al., 2014). Viele Daten zeigen eine erhöhte Sensitivität des IFN- $\gamma$ -Tests im Vergleich zum TST, allerdings parallel eine abnehmende Spezifität (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2010; BASS et al., 2013). In einer weiteren Studie, die verschiedene Diagnostikmethoden der bTB auf Sensitivität/Spezifität überprüfte, wurde für den Bovigam® als IFN- $\gamma$  Test eine nur sehr geringe Spezifität von 6,9 % bei einer hohen Sensitivität von 95,7 % erreicht. Ein zu niedrig gesetzter Cut-Off für die Auswertung der Ergebnisse wurde als mögliche Ursache dieser Diskrepanz zwischen Sensitivität und Spezifität aufgeführt. Durch dessen Erhöhung konnte eine Erhöhung der Spezifität auf 23,5 % bei Erniedrigung der Sensitivität auf 83,3 % verzeichnet werden. Als weitere Ursachen für eine geringe Spezifität wurden ein möglicher Einfluss eines vorangegangenen Intrakutantest sowie Kreuzreaktionen im Falle einer Infektionen mit *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) aufgeführt (BARRY et al., 2011; PUCKEN et al., 2017). Mit Ersatz der PPDs durch die neu entwickelten Antigene als Stimulanzen ist eine Erhöhung der Spezifität gegeben (POLLOCK et al., 2000; SCHILLER et al., 2010; PUCKEN et al., 2017). Als Ursache für diese unterschiedlichen Angaben bezüglich der Sensitivität/Spezifität kann außerdem eine große Variation einzelner Testprotokolle gewertet werden. Viele Faktoren, die das Testergebnis signifikant beeinflussen, z. B. die Erfahrung der durchführenden Personen, der Transport und die Stimulation, wurden bereits definiert und sind als wichtige Elemente in Versuchsprotokolle zu integrieren (SCHILLER et al., 2010; GORMLEY et al., 2013; PUCKEN et al., 2017). Die Einhaltung solcher genauer Vorgaben und die daraus entstehenden logistischen Schwierigkeiten (z. B. Einhaltung einer konstanten Temperatur beim Transport) werden oft als Nachteile des IFN- $\gamma$ -Tests gegenüber dem TST beschrieben (ROTHEL et al., 1992; DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Ebenso werden die genannten Schwankungen der ermittelten Sensitivitäten und Spezifitäten als Schwäche des Tests erwähnt (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006). Eine Studie ergab, dass manche, im Skin-Test positiven Tiere, zu keinem entsprechenden Ergebnis im IFN- $\gamma$ -Test führten (POLLOCK et al., 2005). Generell sollte der Test ausschließlich bei Tieren über sechs Monate angewendet werden, da vorher unspezifische Reaktionen auf mykobakterielle Antigene, getriggert durch Natürliche Killerzellen (NK) auftreten können (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2010).

#### 3.2.2.4 Verwendung in der TB-Überwachung von Wildtierpopulationen

Für die Kontrolle und Überwachung der Tuberkulose sowohl in Rinder- als auch in Wildtierpopulationen standen zunächst die Schlachttieruntersuchung sowie der Intrakutantest zur Verfügung (WATERS et al., 2006; MCNAIR et al., 2007; BASS et al., 2013). Im Laufe der Zeit wurde die Entwicklung von alternativen ante mortem Methoden, wie dem IFN- $\gamma$  release assay, immer mehr fokussiert. Vor allem beim Wildtier spielten begünstigende Faktoren, wie die nur noch einmalig notwendige Manipulation, eine große Rolle (siehe Abschnitt II, 3.2.2.3). Da die dominierende Immunantwort infolge einer TB-Infektion in Wiederkäuern die zellvermittelte ist, betrachtete man die Detektion von IFN- $\gamma$  zunehmend als Alternative bzw. aufgrund der besseren Praktikabilität sogar als Verbesserung gegenüber dem TST (FERNÁNDEZ et al., 2009). Zahlreiche Studien belegen eine erfolgreiche TB-Detektion mit Hilfe des IFN- $\gamma$  release assays in verschiedenen Spezies, wie zum Beispiel bei Rentieren (*Rangifer tarandus*) (WATERS et al., 2006), dem afrikanischen Büffel (*Syncerus caffer*) (GROBLER et al., 2002), dem Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) (PALMER et al., 2004), Rhinozerosen (*Ceratotherium simum*) (MORAR et al., 2007), Afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) (MORAR, 2003) oder in Rotwildpopulationen (*Cervus elaphus*) (WATERS et al., 2008). Ein dem Bovigam® ähnlicher Test, der Cervigam (Pfizer Animal Health), wurde bereits eigens für das Rotwild entwickelt und etabliert (WATERS et al., 2006). Nachfolgend erwies sich dieser auf dem Nachweis von *M. bovis* basierender Test, zudem als valide für die TB-Überwachung bei anderen Spezies, wie dem Rentier oder dem Weißwedelhirsch (PALMER et al., 2004; WATERS et al., 2006; WATERS et al., 2008). Des Weiteren konnten Resultate bei Dammhirschen sowie Elchen erzielt werden, wobei sich diesbezüglich eine weitere Entwicklung des Tests als notwendig herausstellte (WATERS et al., 2008). Für Cervide wurden durch Anwendung eines IFN- $\gamma$ -Tests bei experimentell infizierten Tieren in unterschiedlichen Infektionsstadien oder vakzinierten Tieren gute Resultate erzielt (PALMER et al., 2004; WATERS et al., 2004). Beim TST kann es hingegen auch bei geimpften Tieren zu einer falsch-positiven Reaktion kommen (WATERS et al., 2004). Unterstützt durch weitere positive Resultate aus Studien u. a. für das Rotwild und Büffel, welche den IFN- $\gamma$ -Test mit der traditionellen Methode, dem TST verglichen, bekräftigten eine zukünftige Anwendung eines derartigen *in vitro* assays für das TB-Screening in Wildtierpopulationen (FERNÁNDEZ et al., 2009; GOOSEN et al., 2014). In einer

---

afrikanischen Büffelherde wurde sogar eine exzellente Übereinstimmung der Ergebnisse des IFN- $\gamma$ -Tests mit post mortem Untersuchungen festgestellt (GROBLER et al., 2002).

## III MATERIAL UND METHODEN

### 1 Tiere

#### 1.1 Bovine Blutproben

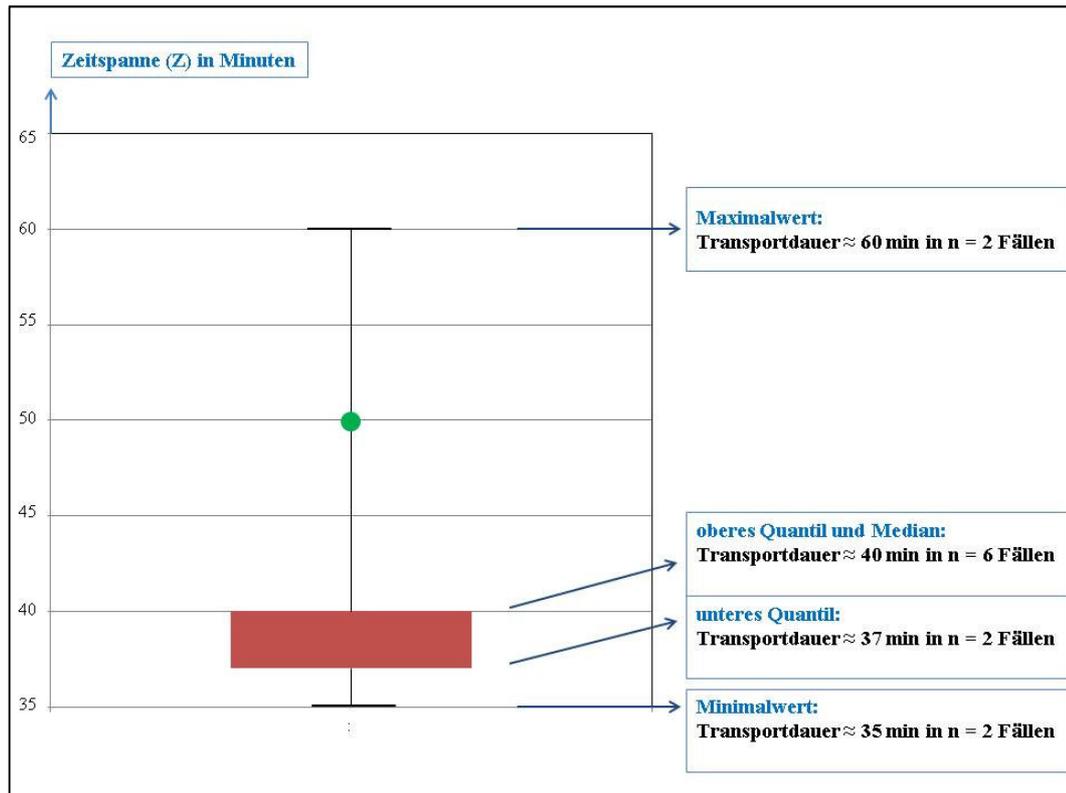
Die Blutabnahme bei Rindern wurde angezeigt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Registrationsnummer: Az. 55.2.1.54-2532.0-92-15). Für die Probengewinnung bei den Rindern bestand eine Kooperation mit der „Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung“ der LMU München in Oberschleißheim.

Zunächst wurde Blut von Rindern aus dem Lehr- und Versuchsgut (LVG) in Oberschleißheim gewonnen, was nach weiterer Bearbeitung als Positivkontrolle für eine erfolgreiche IFN- $\gamma$ -Freisetzung in den Folgeversuchen dienen sollte. Von zwei Rindern in genannter Einrichtung wurden insgesamt drei Blutproben gewonnen, wobei von einem der Tiere wiederholt Blut bezogen wurde. Nähere Informationen bezüglich der Tiere, sind in Tabelle 3 gelistet. Aus den zwei Blutproben des ersten Tieres entstanden die später bezeichneten Positivkontrollen I und II und aus der Blutprobe des zweiten Tieres die im Folgenden deklarierte Positivkontrolle III. Um auf eine maximale Vitalität der Leukozyten und damit eine maximale IFN- $\gamma$ -Ausschüttung im Zuge der Herstellung der Positivkontrolle schließen zu können, wurde ausschließlich Blut von gesunden und klinisch unauffälligen Rindern entnommen. Dabei erfolgte keine Anästhesie dieser Tiere. Die Blutabnahme wurde mit sterilen Kanülen (Terumo 20 G, Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, Österreich) durchgeführt und das Blut in heparinisierten 9-ml Röhrchen aufgefangen (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland). Der Transport erfolgte in einer Styroporbox mit Wärmeakkus (37 °C) unter standardisierten Bedingungen (37 °C, Styroporbox, Temperaturlogger (MicroLite USB logger, Fourtec, USA)). Die genannten standardisierten Bedingungen wurden nach Vorgaben eines kommerziell erhältlichen IFN- $\gamma$  release assays zur Untersuchung von Rinderblut (Bovigam®) festgelegt.

Im Anschluss wurde die Blutgewinnung von Rindern durchgeführt, um den Einfluss einer Anästhesie auf die Vitalität peripherer Leukozyten zu untersuchen. Die Entnahme der Vollblutproben der Tiere erfolgte unmittelbar vor und zehn Minuten nach Einsetzen einer Anästhesie. Dieses Zeitfenster wurde in Hinblick auf

die zukünftige Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays für das Rotwild gewählt, wobei nach der dabei durchgeführten intramuskulären Verabreichung der Anästhetika mit einem Wirkungseintritt dieser nach ungefähr zehn Minuten zu rechnen ist (CLINIPHARM; CLINIPHARM; TOLKSDORF, 1988). Insgesamt wurde Blut von vierzehn Kälbern (Fleckvieh; FV) während, regulär durchgeführter Operationen in der „Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung“ gewonnen und untersucht. Tabelle 3 zeigt eine Auflistung aller Tiere, deren Blut vor und während der Narkose untersucht wurde. Da Infektionen und eine immunsuppressive Therapie die Anzahl zirkulierender Leukozyten verringern (MISHLER & EMERSON, 1977) und damit die Produktion und Freisetzung an IFN- $\gamma$  inhibieren kann (SAUER et al., 1995), wurden Fieber und eine Vorbehandlung der Tiere mit Cortison als Ausschlusskriterien für die Studie festgelegt. Von den untersuchten Tieren hatte ein Kalb eine geringgradig erhöhte Temperatur (Narkose von Tier Nr. 10; Tabelle 3) und ein weiteres wurde laut Vorbericht mit Cortison behandelt (Narkose von Tier Nr. 6; Tabelle 3). Diese zwei Tiere dienten lediglich als Bestätigung des Einflusses der festgelegten Ausschlusskriterien. In der Interpretation der Studie, ob eine Narkose Einfluss auf die Vitalität peripherer Leukozyten hat, wurden sie nicht berücksichtigt. Somit wurden die Ergebnisse von zwölf Tieren, bei welchen genannte Kriterien ausgeschlossen werden konnten, gewertet. Indikationen für einzelne Operationen waren hauptsächlich umbilicale Hernien oder Omphalitiden (in acht von insgesamt zwölf Fällen, Tabelle 3). Xylazin (2 % Xylavet, CP Pharma, Burgdorf, Deutschland) und Ketamin (10 % Ketamidol, VDT; Garbsen, Deutschland) wurden als Standardnarkotika für die Einleitung der Anästhesie, und Isofluran (1,2-1,8 %, Zoetis, Berlin, Deutschland) für die nachfolgende Aufrechterhaltung eingesetzt. Blut wurde von Jugularkathetern (Cavafix®, Braun, Melsungen, Deutschland), welche im Zuge der Operation für Routineuntersuchungen gelegt wurden, gewonnen. Die Blutproben wurden in heparinisierten 9-ml Röhrchen (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen, unmittelbar in eine Styroporbox mit Wärmeakkus (37 °C) verbracht und unter standardisierten Bedingungen (37 °C, Styroporbox, Temperaturlogger (MicroLite USB logger, Fourtec, USA)) transportiert. Wie oben beschrieben, erfolgte die Festlegung der standardisierten Bedingungen anhand der Vorgaben des Bovigam®-Tests zur Untersuchung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Rinderblut. Der zeitliche Umfang (Zeitspanne, Z) von der Blutabnahme bis zur weiteren Bearbeitung im Institut betrug

$35 \text{ min} \leq Z \leq 1 \text{ Stunde}$ . Abbildung 8 veranschaulicht in welchem Bereich die Zeitspanne ( $Z$ ) für den Transport lag. Die Temperatur wurde zwischen den beiden Zeitpunkten der Blutabnahme sowie während des Transports ins Institut mittels Temperaturlogger aufgezeichnet. In Abbildung 9 ist die Temperaturaufzeichnung des Temperaturloggers für alle durchgeführten Narkosen der Rinder vergleichend dargestellt.



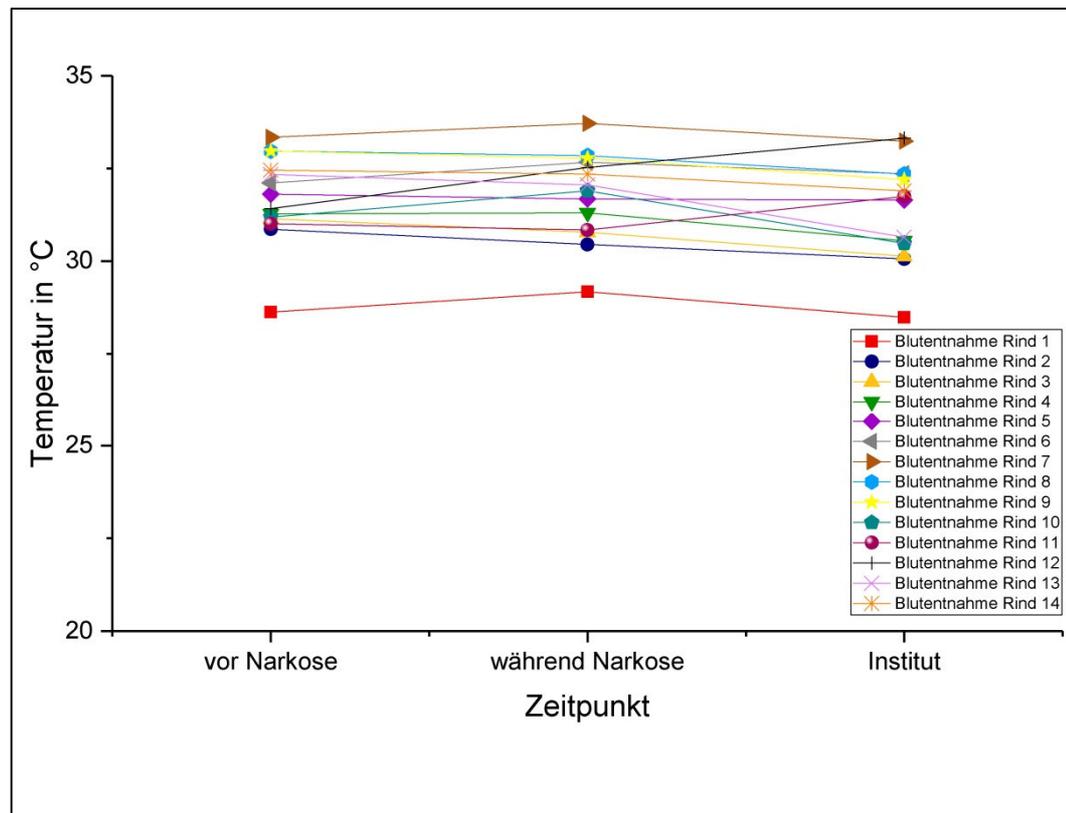
**Abbildung 8: Darstellung der Zeitspanne ( $Z$ ) für den Transport des Blutes von den Rindern der einzelnen Narkose**

In den meisten Fällen ( $n = 11$ ) betrug die Transportdauer  $35 \leq Z \leq 40$  Minuten.

Dabei war in einem Fall eine Dauer von 36 Minuten zu verzeichnen (nicht explizit im Diagramm dargestellt)

Eine maximale Transportdauer von  $Z = 60$  Minuten war in  $n = 2$  Fällen zu verzeichnen.

In einem Fall dauerte der Transport  $Z = 50$  Minuten (als grüner Punkt dargestellt).



**Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der Temperaturmessung zu den drei verschiedenen Zeitpunkten: vor, während der Narkose und bei Ankunft im Institut**

Es wurde die Temperaturaufzeichnung für die Blutproben zu den drei verschiedenen Zeitpunkten (vor und während Narkose, Ankunft im Institut) dargestellt. Dabei wurden die Daten für alle durchgeführten Narkosen, inklusive der Narkosen von Tier Nr. 6 und Tier Nr. 10, die aufgrund der festgelegten Ausschlusskriterien nicht in die Interpretation der Studie miteingingen, berücksichtigt. Die Temperatur konnte für alle drei Zeitpunkte bei den einzelnen Blutproben auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Insgesamt wurden Temperaturen in einem Bereich  $28,5\text{ °C} < T < 34\text{ °C}$  gemessen. Die maximale Zeitspanne von Blutabnahme bis zur Ankunft im Institut betrug 1,0 Stunden, wobei ein Absinken der Temperatur in diesem Zeitraum um jeweils maximal  $1,0\text{ °C}$  zu verzeichnen war.

**Tabelle 3: Auflistung der Rinder, von denen Blut genommen wurde (inklusive Positivkontrollen)**

Tier	Rasse	Geschlecht	Vorstellungsgrund	Vorbehandlung	Sonstiges
Positiv-Kontrolle I/II	FV	Weiblich	Klinisch unauffällig, Rind des LVG	keine	obB
Positiv-kontrolle III	FV	Weiblich	Klinisch unauffällig, Rind des LVG	keine	obB
Narkose 1	FV	Weiblich	Verdickter Nabel, V. a. periarterielles Hämatom	KV SM	obB
Narkose 2	FV	Weiblich	Omphalitis	KV SM	obB
Narkose 3	FV	Weiblich	Omphalitis	KV SM	Stressbelastung <sup>a</sup>
Narkose 4	FV	Weiblich	Nabelgranulom	KV SM	ggr. Stressbelastung <sup>a</sup>
Narkose 5	FV	Weiblich	V. a. Omphalophlebitis	KV SM	Stressbelastung <sup>a</sup>
Narkose 6	FV	Weiblich	Hernia umbilicalis	KV SM	Cortison-Behandlung
Narkose 7	FV	Weiblich	Hernia umbilicalis	KV SM	obB
Narkose 8	FV	Weiblich	Hernia umbilicalis	KV SM	obB
Narkose 9	FV	Männlich	V. a. periarterielles Hämatom	KV SM	obB
Narkose 10	FV	Männlich	Omphalophlebitis	KV SM	Fieber
Narkose 11	FV	Männlich	Hernia umbilicalis	KV SM	Stressbelastung <sup>a</sup>
Narkose 12	FV	Männlich	Hernia umbilicalis	KV SM	obB
Narkose 13	FV	Weiblich	Periarterielles Hämatom	KV SM	Stressbelastung <sup>a</sup>
Narkose 14	FV	Männlich	Omphalitis	KV SM	obB

KV: keine Vorbehandlung mit Corticosteroiden

SM: Schmerzmedikation vor der Narkose (Metacam, Metamizol)

<sup>a</sup>: vor Manipulation / Immobilisation der Tiere

V. a.: Verdacht auf; ggr.: geringgradig; obB: ohne besonderen Befund

## 1.2 Cervide Blutproben

Vollblutproben konnten von anästhesiertem Rotwild ( $n = 2$ ; ein männliches, ein weibliches Tier) während regulären Screening-Untersuchungen gewonnen werden. Da sich die Beschaffung von Rotwild-Blutproben in Deutschland aufgrund der notwendigen Immobilisation als sehr schwierig gestaltet (nur während regulärer Untersuchungen), war die Anzahl der beprobten Tiere auf zwei limitiert. Die Rotwildblutproben wurden daher auch nur zu einem Zeitpunkt, nämlich kurz nach Einsetzen der Anästhesie entnommen. Als Narkose diente eine Standardmischung für die Immobilisation von Wildtieren, bestehend aus Xylazin in Form einer Trockensubstanz (Xylased 500 mg, Bioveta a.s., Tschechische Republik) und flüssigem Ketamin (Anesketin, 100 mg/ml, Albrecht GmbH, Deutschland). Diese Mischung entspricht in ihrer Zusammensetzung jener der „Hellabrunner Mischung“. Einziger Unterschied ist, dass anstelle von Rompun®, welches kommerziell nicht mehr verfügbar ist, Xylased verwendet wurde. In beiden Präparaten liegt Xylazin (500 mg) als Trockensubstanz vor. Eine Einzeldosis der Mixtur von 2,5 ml/100 kg mit einer finalen Konzentration von 125 mg Xylazin/1 ml Ketamin wurde den Tieren mittels Blasrohr im Bereich der Beckenmuskulatur (i. m.) verabreicht, wonach diese binnen zehn Minuten in Anästhesie lagen (Abbildung 11). Die Blutproben wurden mit sterilen Nadeln (Terumo 20 G, Henry Schein Medical GmbH, Wien, Österreich) und durch Punktur der *V. jugularis* entnommen und in heparinisierten 9-ml Röhrchen (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen (Abbildung 13). Die einzelnen Proben wurden unmittelbar in eine Styroporbox mit Wärmeakkus (37 °C) verbracht und unter standardisierten Bedingungen (37 °C, Styroporbox, Temperaturlogger (MicroLite USB logger, Fourtec, USA)) ins Labor transportiert. Als Antidot wurde den Tieren Atipamezol (5 mg/ml Atipam, Albrecht GmbH, Deutschland) via Injektion in die Zungenwurzel verabreicht (Abbildung 12). Innerhalb weniger Minuten waren die Tiere wieder bei Bewusstsein und mobil. Es erfolgte eine Beobachtung der Tiere nach der Aufwachphase, um deren Vitalität sicherstellen zu können.



**Abbildung 10: Beispiel einer Indikation für eine Anästhesie beim Rotwild**

Dieses Tier sollte anästhesiert werden, da Weidezaun aus dem Geweih entfernt werden musste.



**Abbildung 11: Rotwild unmittelbar nach Beschuss mit dem Blasrohr und kurz vor Eintreten der Anästhesie**



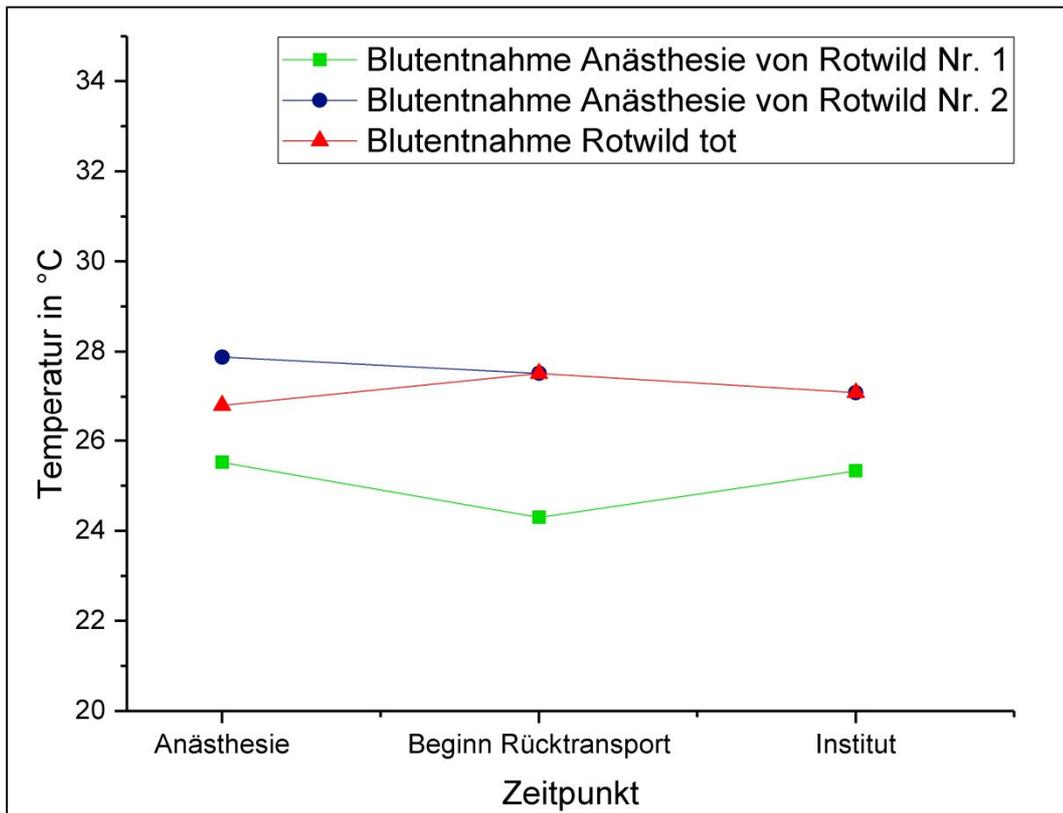
**Abbildung 12: Verabreichung von Atipamezol als Antidot in den Zungengrund**

Weitere Blutproben wurden von einem toten Rotwild bezogen. Das Tier wurde durch Schuss erlegt und unmittelbar (innerhalb von  $< 2$  min) nach Eintreten des Todes wurden Blutproben gewonnen. Um eine schnelle Blutentnahme zu gewährleisten, wurde die *V. jugularis* freigelegt und per Längsschnitt eröffnet und die Blutproben in heparinisierten 9-ml Röhren (Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen (Abbildung 13). Sogar während dieser kurzen Zeitspanne war eine erste Koagulation des Blutes sichtbar. Zudem waren unsterile Konditionen für die Gewinnung der Blutproben unvermeidbar.



**Abbildung 13: Blutentnahme bei einem anästhesierten (A) und einem geschlachteten (B) Rotwild**

Die Aufbewahrung sowie der Transport der Blutproben wurden unter den oben beschriebenen standardisierten Bedingungen durchgeführt. Der zeitliche Umfang (Zeitspanne  $Z$ ) zwischen Blutentnahme bis hin zur weiteren Bearbeitung im Institut betrug  $2 < Z < 4,5$  Stunden. Wie bei den Rindern erfolgte auch beim Transport der Rotwildproben eine Aufzeichnung der Temperatur mittels Temperaturlogger. Abbildung 14 veranschaulicht die dabei gemessenen Temperaturen vom Zeitpunkt der Blutabnahme, bis hin zur weiteren Bearbeitung im Institut.



**Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der Temperaturmessung zu den drei verschiedenen Zeitpunkten: während der Anästhesie, Beginn des Rücktransports und Ankunft im Institut**

Es erfolgte eine Aufzeichnung der Temperatur von Blutproben von zwei anästhesierten Rotwildtieren und einem geschlachteten Rotwild. Die Temperatur konnte für alle drei Zeitpunkte bei den einzelnen Blutproben auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Insgesamt wurden Temperaturen in einem Bereich von  $24\text{ °C} < T < 28\text{ °C}$  gemessen. Die maximale Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Ankunft im Institut betrug 4,5 Stunden, in welcher ein Absinken der Temperatur um maximal  $1,2\text{ °C}$  (Anästhesie Rotwild Nr. 1) verzeichnet wurde.

## 2 Geräte, Materialien und Reagenzien

### Geräte:

Brutschrank (New Brunswick Galaxy 170S)	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer (VMS-A S40), Magnet	VWR International GmbH, Ismaning
Mikroplatten reader (Spectra Max Plus)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Mikroplatten washer (Aqua max®2000)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Mikrotiterplattenschüttler	IKA Labor Technik, Staufen
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Softmax Pro Software	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Software „R“	R Foundation, Wien, Österreich
Temperaturlogger (MicroLite USB logger)	Fourtec, USA
Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg
Waage HL-100 (max. 100 g; d = 0,01)	A & D Weighing, Ahrensburg
Waage Picco 1000	Werner Dorsch GmbH, Dieburg
Zentrifuge (Centrifuge 5430 R)	Eppendorf AG, Hamburg

### Verbrauchsmaterialien

Bovine IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kit	Mabtech AB, Hamburg
Heparinisierte Blutröhrchen	Sarstedt Ag & Co., Nümbrecht
Jugular-Katheter (Cavafix®)	Braun, Melsungen
Kulturplatte (24-Well)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl, 2-20 µl, 2-100 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
sterile Kanülen (Terumo 20 G)	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, Österreich
96-Well Platte (hoch-Protein-bindend)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

### Reagenzien

Biotinylierter Antikörper (mAB MT307-biotin)	Mabtech AB, Hamburg
Inkubationspuffer (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Monoklonaler Antikörper (mAB MT17.1)	Mabtech AB, Hamburg
PBS (phosphate buffered saline)	hergestellt nach Moore, 2001
Phosphorsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Pokeweed Mitogen (PWM)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA; früher Prionics AG, Schweiz
Rekombinantes, bovines IFN- $\gamma$	Mabtech AB, Hamburg
RPMI 1640 Medium, flüssig	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase	Mabtech AB, Hamburg
Streptavidin (TMP 4 g/l, 0,02 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	KPL, Gaithersburg
Tween® 20 BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt

**Medikamente:**

Atipamezol (Atipam 5 mg/ml)	Albrecht GmbH, Aulendorf
Ketamin (Anesketin, 100 mg/ml)	Albrecht GmbH, Aulendorf
Xylazin (2 % Xylavet)	CP Pharma, Burgdorf
Xylazin (Xylased 500 mg)	Bioveta a.s., Tschechische Republik

### 3 Stimulation der Vollblutproben

#### 3.1 Erstellung einer Positivkontrolle

Vor Untersuchung der Plasmaproben von Rindern vor und während der Narkose war zunächst die Erstellung einer Positivkontrolle als Referenzwert für die IFN- $\gamma$ -Freisetzung im Blut klinisch unauffälliger Rinder notwendig (siehe Abschnitt III, 1.1). Die drei Blutproben, die von den insgesamt zwei Rindern entnommen wurden, wurden analog jener der anästhesierten Tiere, wie in Abschnitt III, 3.3 beschrieben, stimuliert. Zunächst erfolgte bei einer der Blutproben eine parallele Stimulation mit drei verschiedenen Mitogenen (Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (ConA), Phytohaemagglutinin (PH)), um ein geeignetes Stimulans für die Untersuchung der Blutproben von anästhesierten Rindern auszuwählen. PWM wurde dabei nach Rekonstitution mit RPMI Medium 1640 in einer Konzentration von 80  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. ConA und PH wurden durch Zusatz von Aqua destillata ebenfalls in einer Konzentration von 80  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. PWM erwies sich dabei als potentestes Stimulans (Abschnitt III, 3.2 und Abschnitt IV, 1.2), wodurch die beiden weiteren Blutproben für die Erstellung der Positivkontrolle nur noch mit PWM stimuliert wurden. Die im Folgenden bezeichneten Positivkontrollen (I, II und III) resultierten aus der Stimulation der drei Blutproben mit PWM. Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung wurde nachfolgend gemäß dem, in Abschnitt III, 4.1 beschriebenen Protokoll gemessen, wobei dieser Schritt mehrmals durchgeführt wurde, um stabile und valide Werte der Positivkontrollen für nachfolgende Versuche zu erreichen (beispielhafte Plattenbelegung im Anhang Tabelle A1). Zudem erfolgte ein Vergleich der IFN- $\gamma$ -Freisetzung der insgesamt drei hergestellten Positivkontrollen in verschiedenen Verdünnungsstufen, um zu

überprüfen, ob sie gleichermaßen als Referenz in der Studie verwendet werden können (Abbildung 15, Abschnitt IV, 1.1).

### 3.2 Auswahl geeigneter Stimulanzen

Parallel zur Erstellung der Positivkontrolle wurden drei verschiedene Stimulanzen auf ihr Potential, eine quantitativ aussagekräftige IFN- $\gamma$ -Freisetzung zu gewährleisten, geprüft. PWM, ConA und PH werden als drei mögliche Mitogene, welche T-Zellen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  stimulieren können beschrieben. In Studien konnten diese drei Stimulanzen als gleichermaßen fähig definiert werden, eine Interferonfreisetzung bei vitalen Leukozyten zu provozieren (KIRCHNER et al., 1982). Um optimale Konditionen für die Stimulation von Rinderplasmaproben vor und während der Narkose zu erreichen, wurden diese drei Mitogene in jeweils gleicher Konzentration (80  $\mu\text{g/ml}$ ) im Zuge der Herstellung der Positivkontrolle (Abschnitt III, 3.1) parallel eingesetzt und die Resultate miteinander verglichen. Eine Verdünnung der Stimulanzen erfolgte dabei wie in Abschnitt III, 3.1 beschrieben. Blutproben eines der, in Abschnitt III, 1.1 beschriebenen, klinisch unauffälligen Rinder (Positivkontrollen) wurde mit allen drei Mitogenen stimuliert. Die Stimulation sowie die anschließende Messung von freigesetztem IFN- $\gamma$  erfolgten analog, wie in Abschnitt III, 3.3 und 4.1 für die Bearbeitung der Blutproben von anästhesierten Tieren beschrieben. Eine schematische Darstellung der Plattenbelegung im Zuge der IFN- $\gamma$ -Messung ist in Tabelle A2 (Anhang) dargestellt. Die Ergebnisse des ELISA sind graphisch in Abbildung 16 (Abschnitt IV, 1.1); die genauen OD-Werte in Abbildung A2 des Anhangs dargestellt. Im Vergleich zu PWM und ConA war die IFN- $\gamma$ -Freisetzung durch Zugabe von PH deutlich geringer, wodurch es als Stimulans von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde. ConA wurde als Vergleich weiterhin parallel zu PWM für Stimulation der Rinderplasmaproben für alle untersuchten Tiere vor und während der Narkose ( $n = 14$ ) verwendet. PWM erwies sich als potentestes Stimulans und wurde in allen anschließenden Versuchsabschnitten für die Untersuchung von Blut anästhesierter Rinder eingesetzt. Zudem wurde zur Erstellung der Positivkontrollen ausschließlich PWM verwendet. Die Blutproben von Rotwild wurden mit PWM stimuliert. Für die Interpretation der IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Plasma anästhesierter Rinder sowie in Hirschplasma wurden ausschließlich Proben berücksichtigt, denen eine Stimulation mit PWM vorausging.

### 3.3 Stimulation

Der nun folgende Abschnitt beschreibt die Stimulation, wie sie bei allen Blutproben erfolgte. Die Stimulanzen wurden, wie oben beschrieben entsprechend eingesetzt. So erfolgte hinsichtlich der Gewinnung der Positivkontrolle und der Auswahl geeigneter Stimulanzen eine Stimulation mit PWM und teilweise mit ConA und PH (Abschnitt III, 3.1 und 3.2; Tabelle A2 im Anhang), für die Untersuchung anästhesierter Rinder mit PWM und vergleichend mit ConA und für das Rotwild ausschließlich mit PWM. Der nachfolgend beschriebene Verlauf der Stimulation wurde in allen Fällen analog durchgeführt, wobei die einzige Variation in der Verwendung des Stimulans bestand.

Im Labor erfolgte eine Stimulation der Vollblutproben in einer 24-Loch-Zellkulturplatte (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Unverdünntes, heparinisiertes Blut wurde in 1,5-ml Aliquots auf die einzelnen Kammern der Platte verteilt und mit 100 µl Pokeweed Mitogen in einer Konzentration von 80 µl/ml (PWM, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA (früher Prionics AG, Schweiz)) versetzt. Da ein boviner IFN- $\gamma$  release assay durchgeführt wurde, wurde PWM in einer Konzentration verwendet, wie es im Herstellerprotokoll des Bovigam<sup>®</sup>, einem kommerziell erhältlichen Test für die Detektion von bovinem IFN- $\gamma$ , vorgesehen ist. Zudem sollte unter Verwendung dieser hohen Konzentration eine maximale Stimulation der Leukozyten, IFN- $\gamma$  freizusetzen provoziert werden, um besser auf das Vorhandensein vitaler Leukozyten in den Plasmaproben rückschließen zu können. Alle anderen Stimulanzen (siehe Abschnitt III, 3.2) wurden entsprechend in selbiger Konzentration eingesetzt. Ein Aliquot, in das 100 µl PBS (PBS, gemäß Moore, 2001) anstelle von PWM bzw. der anderen Stimulanzen gegeben wurde, diente als interne Negativkontrolle für die Stimulation. Die Proben wurden auf einem Mikrotiterplattenschüttler (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) für eine Minute gemischt und über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> für 20 Stunden inkubiert (New Brunswick Galaxy 170S, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Am nächsten Tag wurden die 24-Lochplatten zehn Minuten bei einem g-Wert von 500 zentrifugiert ( $500rcf$ ;  $1 rcf = 1,12 \times R (= \text{Radius}) \times (\text{RPM}/1000)^2$ ); Zentrifuge 5430 R, Eppendorf Ag, Hamburg, Deutschland), die Überstände abgenommen und in Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Detektion von IFN- $\gamma$  und die Interpretation der Resultate mittels Enzyme-linked immunosorbent assay

(EIA) für die Messung von bovinem IFN- $\gamma$  laut Herstellerprotokoll (Mabtech AB, Hamburg, Deutschland).

#### **4 Detektion von freigesetztem IFN- $\gamma$ mit einem bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kit**

Nachfolgendes Protokoll für die Durchführung des bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kits wurde sowohl für Untersuchungen der Plasmaproben von Rindern vor und während einer Narkose und Rotwild als auch im Zusammenhang mit der Herstellung einer Positivkontrolle inklusive der Untersuchung verschiedener Stimulanzen verwendet.

##### **4.1 Untersuchung der Plasmaproben von Rind und Rotwild**

In bovinen Plasmaproben, die unmittelbar vor und zehn Minuten während einer Anästhesie entnommen wurden, wurde freigesetztes IFN- $\gamma$  von stimulierten Leukozyten mit dem kommerziellen IFN- $\gamma$ -ELISA gemessen. Das Protokoll beinhaltete einen IFN- $\gamma$ -Standard, welcher im Kit enthalten war. Plasma einer vorher stimulierten Blutprobe, die von einem klinisch unauffälligen Rind entnommen wurde, diente als Positivkontrolle für eine IFN- $\gamma$ -Freisetzung. PBS wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Um zu überprüfen, ob eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern des Kits gegen bovines IFN- $\gamma$  und cervidem IFN- $\gamma$  besteht, wurden die stimulierten Vollblutproben von Rotwild gemäß dem Protokoll des bovinen IFN- $\gamma$  release assays einschließlich seines Standards untersucht.

Die Detektion und Messung von freigesetztem IFN- $\gamma$  wurde anschließend gemäß dem Herstellerprotokoll des bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kits durchgeführt. Am Vortag des ELISA wurde eine hoch-Protein-bindende 96-Lochplatte (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) mit 100  $\mu$ l/Kammer eines spezifischen Fangantikörpers gegen bovines IFN- $\gamma$  (mAB MT17.1), bestehend aus 2  $\mu$ g/ml mAB MT17.1 in PBS (pH 7,4) beschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 - 8 °C, wurde die Platte anschließend zweimal mit je 200  $\mu$ l PBS pro Kammer gewaschen. Die Waschschrte wurden mit einem Mikroplatten-Washer (Aqua Max®, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) für 96-Lochplatten durchgeführt. Alle folgenden Waschschrte wurden fünfmalig wiederholt, wobei jeweils 200  $\mu$ l/Kammer PBS mit 0,05 % Tween hinzugefügt

wurden. Die Platte wurde durch Zugabe von je 200  $\mu$ l/Kammer PBS, bestehend aus 0,05 % Tween und 0,1 % Inkubations-Puffer (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland), der davor unter Verwendung eines Magnetrührers hergestellt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Während dieses Inkubationsschritts wurden die Verdünnungen der Proben, die Positiv-/Negativ- Kontrolle und der IFN- $\gamma$ -Standard vorbereitet. Die hergestellte Blockinglösung wurde als Verdünnungsmittel für die Proben sowie für alle noch folgenden Reagenzien verwendet. Jede Plasmaprobe und der IFN- $\gamma$ -Standard wurden in einem Dreifachansatz, die Positivkontrolle in doppeltem Ansatz untersucht. Rekombinantes, bovines IFN- $\gamma$  (Mabtech) wurde als Standard in einer Konzentrationsspanne von 500 pg/ml bis 3,9 pg/ml in 1:2-Verdünnungsschritten gemäß den Angaben des Kits verwendet. Rinder- und Rotwildproben wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen untersucht: unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125. Eine solche Verdünnungsreihe wurde angefertigt, um besser quantitativ auf enthaltenes IFN- $\gamma$  rückschließen zu können. Im Falle einer Übersättigung im unverdünnten Zustand, kann auf diese Weise anhand der Verdünnungen auf die tatsächliche IFN- $\gamma$ -Freisetzung geschlossen werden. Bezüglich der Rindernarkosen erfolgte in einem Durchlauf jeweils der parallele Ansatz von IFN- $\gamma$ -Standard, der Positivkontrolle sowie der Plasmaproben vor und während einer Narkose (siehe Beispiel einer Plattenbelegung Tabelle 4). Zusätzlich wurden die Negativkontrollen der Stimulation (siehe Abschnitt III, 3.3) und reines PBS als Negativkontrolle für den ELISA aufgetragen (Schema Tabelle 4).

**Tabelle 4: Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Untersuchung der Plasmaproben von Rindern auf freigesetztes IFN- $\gamma$  vor und während einer Narkose**

IFN- $\gamma$ -Standard in pg/ml			Po. Ko.		vor Narkose Verdünnung			während Narkose Verdünnung			Neg. Kon.
500	500	500	1:4	1:4	unverdünnt			unverdünnt			V
250	250	250	1:8	1:8	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	V
125	125	125	1:16	1:16	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	V
62,5	62,5	62,5	1:32	1:32	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	R
31,25	31,25	31,25	1:64	1:64	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	R
15,6	15,6	15,6	1:128	1:128	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	W
7,8	7,8	7,8	1:256	1:256							W
3,9	3,9	3,9	1:512	1:512							W

Neg. Kon.: Negativkontrollen; Po. Ko.: Positivkontrolle

Der IFN- $\gamma$ -Standard und die Plasmaproben wurden jeweils in einem Dreifachansatz, die Positivkontrolle in doppeltem Ansatz untersucht.

Ein Teil der Blutproben vor (v) und während (w) der Narkosen wurde mit PBS „stimuliert“ als interne Negativkontrolle der Stimulation (siehe Abschnitt III, 3.3).

Reines PBS (r) lief als Negativkontrolle bezogen auf den ELISA mit.

Die nachfolgend untersuchten Plasmaproben von Rotwild wurden in Verbindung mit dem IFN- $\gamma$ -Standard des Kits auf die IFN- $\gamma$ -Freisetzung untersucht (siehe Beispiel einer Plattenbelegung Tabelle 5).

**Tabelle 5: Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Untersuchung der Plasmaproben von Rotwild.**

IFN- $\gamma$ -Standard in pg/ml			Rotwild Anästhesie Nr. 1			Rotwild Anästhesie Nr. 2			Rotwild tot		
500	500	500	unverdünnt			unverdünnt			unverdünnt		
250	250	250	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
125	125	125	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25
62,5	62,5	62,5	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125
31,25	31,25	31,25	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625
15,6	15,6	15,6	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125	1:3125
7,8	7,8	7,8									
3,9	3,9	3,9									

Sowohl der IFN- $\gamma$ -Standard als auch die Plasmaproben wurden jeweils in einem Dreifachansatz angesetzt. Es wurde Plasma von zwei anästhesierten Tieren und von einem geschlachteten Rotwild untersucht.

Hundert Mikroliter pro Kammer von sowohl IFN- $\gamma$ -Standard, Kontrollen und Plasmaproben wurden in die einzelnen Kammern der 96-Lochplatte pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, worauf ein weiterer Waschschritt, wie oben beschrieben, angeschlossen wurde. Nachfolgend wurden 100  $\mu$ l des Detektionsantikörpers gegen bovines IFN- $\gamma$  (mAB MT307-biotin) in einer Verdünnung von 0,25  $\mu$ g/ml in jede Kammer pipettiert und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde der Detektionsantikörper mit dem hergestellten Inkubationspuffer verdünnt, um die genannte Konzentration zu erhalten. Die Platte wurde erneut fünf Mal gewaschen, woraufhin 100  $\mu$ l/Kammer Streptavidin-Horseradish-Peroxidase (HRP) in einer 1:1.000 Verdünnung hinzugefügt wurden und eine einstündige Inkubation sowie ein weiterer Waschschritt folgten. Tetramethylbenzidin-(TMP)-Peroxidase in Kombination mit Peroxidase Substrat Solution B (TMP 4 g/l, 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KPL, Gaithersburg, USA) wurden als Substrat verwendet, in die Kammern pipettiert und die Reaktion wurde nach zehn Minuten mit Phosphorsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gestoppt. Absorbionswerte für Standard, Kontrollen und Plasmaproben wurden bei

450 nm mit einem Mikroplatten-Reader (Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen und anschließend mit der SOFTmax Pro Software (Molecular Devices) analysiert. Die Daten wurden als optische Dichte (OD), die für die einzelnen Proben gemessen wurde, dargestellt. Werte für die optische Dichte wurden als aussagekräftig und verwertbar definiert, solange sie  $\geq 0,1$  waren. Die definitiven IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (in pg/ml) der Plasmaproben wurden nachfolgend berechnet. Anhand der eingesetzten Konzentrationen des IFN- $\gamma$ -Standards in einer Spanne von 500 pg/ml bis 3,9 pg/ml gemäß den Angaben des Kits (siehe Abschnitt III, 4.1) und der im ELISA gemessenen OD-Werte für den Standard sowie der einzelnen Proben, konnte die genaue IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Plasmaproben berechnet werden. Es erfolgte eine Kontrolle der Werte, die in den einzelnen Durchläufen für den IFN- $\gamma$ -Standard und für die Positivkontrolle erhalten wurden, um auf den Erfolg und die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsdurchläufe schließen zu können.

#### **4.2 Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$ für die Untersuchung von Rotwildplasma**

Um eine optimale Detektion des IFN- $\gamma$  aus Rotwildblut mit dem bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kit gewährleisten zu können, wurde eine Titration der im Kit bereitgestellten Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$  durchgeführt. Dahingehend wurde zunächst der Fangantikörper (mAB MT.17.1) in unterschiedlichen Konzentrationen bei gleichbleibender Konzentration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin) eingesetzt. Laut Herstellerprotokoll soll für die Untersuchung von Rinderplasma eine 96-Lochplatte am Vorabend des Versuchsdurchlaufs mit mAB MT17.1 in einer Konzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  beschichtet und über Nacht inkubiert werden (siehe Abschnitt III, 4.1). Es wurden in der Folge verschiedene Platten angesetzt, wobei eine Beschichtung mit dem Fangantikörper in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  vollzogen wurde (siehe Beispiel der Plattenbelegung Tabelle 6). Eine Verdünnung des Antikörpers erfolgte dabei mit PBS, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten.

**Tabelle 6: Beispielhafte Darstellung der Plattenbelegung im Zuge der Titration des Fangantikörpers: mAB MT17.1**

Beschichtung mit mAB MT17.1 = 1 µg/ml						Beschichtung mit mAB MT17.1 = 2 µg/ml					
IFN-γ-Standard in pg/ml			Rotwild anästhesiert			IFN-γ-Standard in pg/ml			Rotwild anästhesiert		
500	500	500	unverdünnt			unverdünnt			Unverdünnt		
250	250	250	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
125	125	125	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25	1:25
62,5	62,5	62,5	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125	1:125
31,2	31,2	31,2	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625	1:625
5	5	5									
15,6	15,6	15,6	1:312	1:312	1:312	1:312	1:312	1:312	1:312	1:312	1:312
			5	5	5	5	5	5	5	5	5
7,8	7,8	7,8									
3,9	3,9	3,9									

Die Platte wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von mAB MT17.1 beschichtet (hier dargestellt für 1 µg/ml und 2 µg/ml; analog erfolgte es für 5 µg/ml und 10 µg/ml). Sowohl die einzelnen Plasmaproben als auch der IFN-γ-Standard wurden unter genannten, veränderten Bedingungen untersucht.

Nach Inkubation über Nacht bei 4 - 8 °C wurde die Platte analog, wie in Abschnitt III, 4.1 beschrieben, gewaschen und anschließend geblockt. Da eine maximale IFN-γ-Detektion in Plasmaproben der anästhesierten Rotwildtiere erreicht werden sollte, dienten diese entsprechend als Untersuchungsmaterial. Parallel wurde der IFN-γ-Standard beprobt, um zu überprüfen, ob und ab welcher Antikörperkonzentration Werte gemäß der angegebenen Spanne für den Standard des Kits erzielt werden. Wie bereits beschrieben, erfolgte analog die Zugabe der folgenden Reagenzien (Detektionsantikörper, Streptavidin-HRP, Substrat, Phosphorsäure) unter Berücksichtigung einzelner Waschschrte und es konnte die IFN-γ-Freisetzung anhand der erhaltenen optischen Dichte (OD) detektiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte zusätzlich eine Titration des Detektionsantikörpers, wobei der Fangantikörper in einer konstant bleibenden

Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt wurde. Der Untersuchungslauf gestaltete sich, wie eben beschrieben, nur unter Verwendung des mAB MT307-biotin in variierenden Konzentrationen von 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1,25 µg/ml und 6,25 µg/ml. Die genannten Konzentrationen wurden dabei durch Einsatz des Inkubationspuffers erreicht, der laut Herstellerprotokoll für die Verdünnung des Detektionsantikörpers eingesetzt wird (Abschnitt III, 4.1). Für die Untersuchung von Rinderplasma wurden diesbezüglich 0,25 µg/ml eingesetzt. Alle anderen Reaktionsschritte verliefen, wie oben und in Abschnitt III, 4.1 beschrieben, wobei Plasmaproben von anästhesiertem Rotwild und der IFN- $\gamma$ -Standard, wie bei der Titration des Fangantikörpers als Untersuchungsmaterial dienten.

## **5 Statistische Analyse**

Für die statistische Analyse wurde die Software „R“ verwendet. In diesem Zusammenhang wurden die Medianwerte unsere Daten, resultierend aus den OD-Werten vor und während der Narkose für alle zwölf Kälber mit dem Wilcoxon Signed Rank Test verglichen. Es handelt sich dabei um ein nichtparametrisches Testverfahren für die Analyse von gepaarten Daten basierend auf Differenzen oder von einer einzelnen Probe. Die Nullhypothese ist, dass die Unterschiede eine Verteilung haben, die um Null zentriert ist (WOOLSON, 2008). In diesem Fall wurde überprüft ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten zu den beiden Zeitpunkten vor und während der Narkose in der jeweils gleichen Verdünnungsstufe von Plasma (aus allen zwölf Narkosen) besteht. Dabei beinhaltet die statistische Analyse die Medianen der OD-Werte von den Proben im unverdünnten Zustand bis hin zu einer Verdünnung von 1:125. Für die weiteren Verdünnungsstufen von 1:625 und 1:3125 waren die resultierenden OD-Werte unterhalb 0,1 und wurden demzufolge als nicht signifikant für diese Studie gewertet und von der Analyse ausgeschlossen.

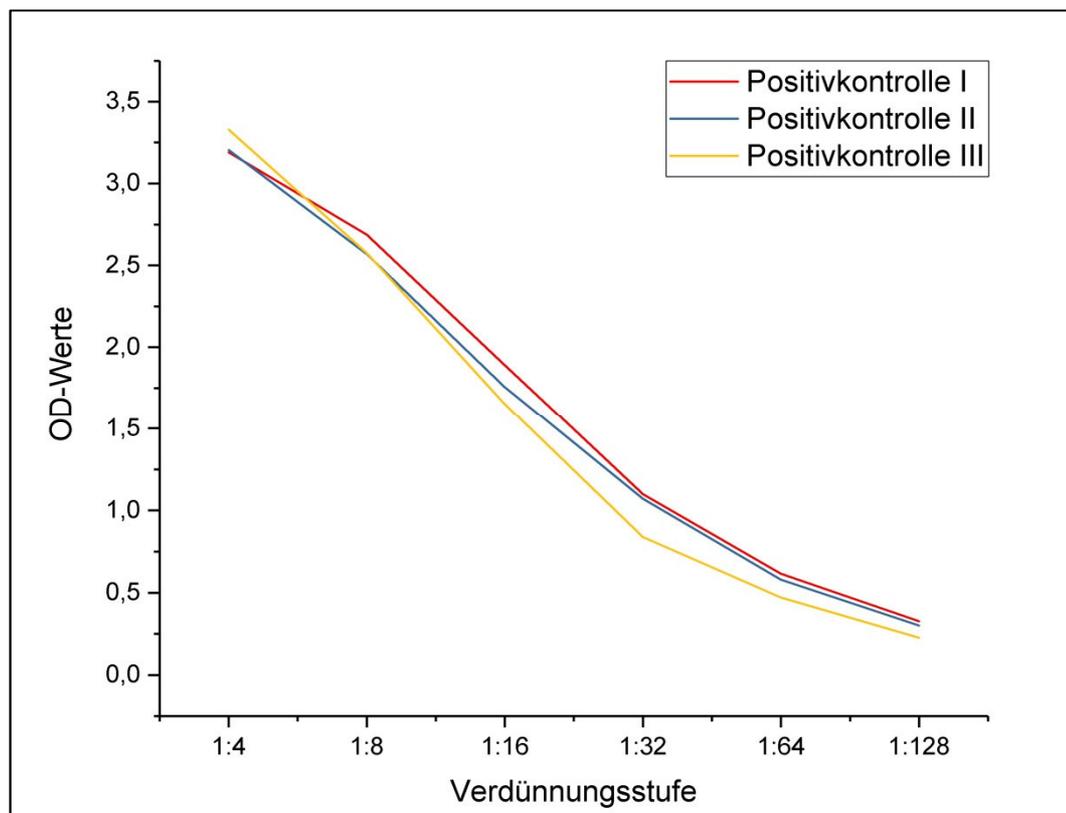
## IV ERGEBNISSE

### 1 Vorarbeiten zur Untersuchung der IFN- $\gamma$ Freisetzung aus Plasmaproben narkotisierter Rinder

#### 1.1 Erstellung einer Positivkontrolle

Vor der Untersuchung von Plasmaproben anästhesierter Rinder auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  vor bzw. während der Narkose wurden Positivkontrollen erstellt. Wie in Abschnitt III, 1.1 beschrieben, wurde dafür Blut von drei klinisch unauffälligen Rindern aus dem LVG in Oberschleißheim gewonnen. Stabile Werte dieser Kontrolle dienten in anschließenden Untersuchungen als Referenz, um zu vergleichen, ob eine adäquate Menge an IFN- $\gamma$  auch im Blut der anästhesierten Tiere von vitalen Leukozyten gebildet worden ist. Zudem konnte durch Betrachtung der erhaltenen Werte für die Positivkontrolle in folgenden Untersuchungen auf die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen geschlossen werden, sofern sie sich in der gleichen Spanne befanden. Die in Abbildung 15 dargestellten Positivkontrollen resultierten aus einer Stimulation des Rinderblutes mit Pokeweed Mitogen (PWM). In den folgenden Untersuchungen der Plasmaproben anästhesierter Rinder wurden ausschließlich diese Positivkontrollen verwendet. Die Positivkontrollen (I, II und III) wurden auf die IFN- $\gamma$ -Freisetzung in unterschiedlichen Verdünnungsstufen untersucht und miteinander verglichen, wobei sie wie in späteren Versuchen in 1:2 Schritten verdünnt wurden. Die gemessenen OD-Werte, welche bezeichnend für die Freisetzung an IFN- $\gamma$  sind, lagen im unverdünnten Zustand bis hin zu einer 1:4 Verdünnung durchgehend im Bereich  $3,0 < OD < 3,7$  wobei im unverdünnten Zustand von einer Übersättigung auszugehen ist. Bei einer Verdünnungsstufe von 1:8 wurden Werte zwischen  $2,0 < OD < 3,0$  erreicht und ab einer Verdünnung von 1:32 wurden noch Werte für  $OD > 1,1$  gemessen. Werte unterhalb 0,1 wurden für die optische Dichte bis hin zur letzten Verdünnungsstufe (1:512) nicht erreicht. Im Falle der Untersuchungen von Plasmaproben anästhesierter Rinder sowie der Rotwildproben wurden Werte unterhalb 0,1 als nicht mehr signifikant betrachtet und gingen nicht in die Wertung der Studie mit ein. Abbildung A1 im Anhang zeigt am Beispiel der Positivkontrolle I die erhaltene OD-Werte im ELISA. Aufgrund der oben genannten Sättigung in unverdünntem Zustand sowie darauffolgenden Verdünnungen, wurde die

Positivkontrolle in allen weiteren Versuchsdurchläufen erst ab einer 1:4 Verdünnung eingesetzt. Abbildung 15 veranschaulicht, dass alle drei Proben sehr ähnliche OD-Werte in den jeweiligen Verdünnungsstufen aufweisen, wodurch eine sehr gute Vergleichbarkeit gegeben ist. Die Werte blieben infolge wiederholter Durchläufe stabil und konnten demnach als Positivkontrolle in den Untersuchungen, ob Narkotika einen Einfluss auf die Vitalität von Rinderleukozyten, und damit deren Fähigkeit IFN- $\gamma$  freizusetzen haben, verwendet werden.

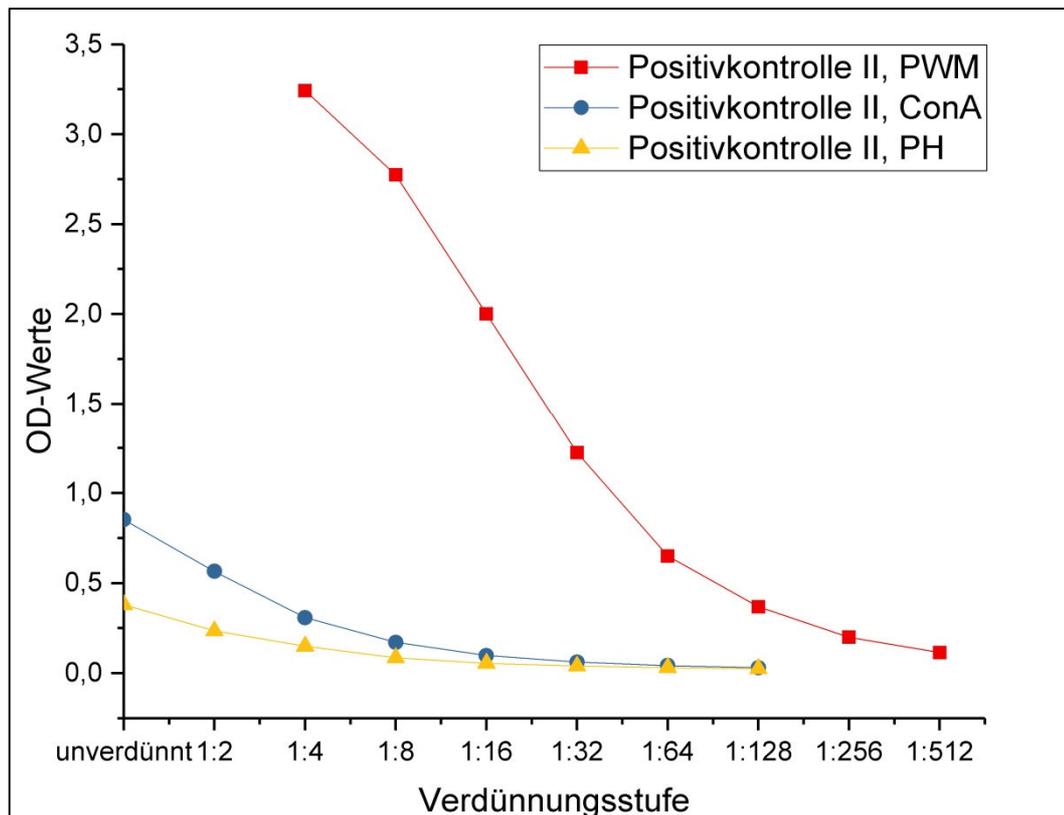


**Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der erhaltenen OD-Werte für die drei erstellten Positivkontrollen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen**

## **1.2 Beurteilung verschiedener Mitogene auf deren Stimulations-Fähigkeit von Leukozyten**

Neben der Erstellung der in Abschnitt III, 3.1 beschriebenen Positivkontrolle wurden vor Beginn der Studie in Zusammenhang mit den Rindernarkosen verschiedene Mitogene auf ihr Potential, Leukozyten zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  zu stimulieren überprüft. Das Blut des Rindes, welches im Zuge der Herstellung von

Positivkontrolle II bezogen wurde (siehe auch nähere Informationen zu den Tieren, Abschnitt III, 1.1, Tabelle 3), wurde mit PWM und teilweise mit ConA und PH stimuliert, wie in Abschnitt III, 3.3 beschrieben und die IFN- $\gamma$ -Freisetzung nachfolgend im ELISA gemessen (Abschnitt III, 4.1). Das Plasma, welchem eine Stimulation mit PWM vorangegangen ist, wurde aufgrund der genannten Übersättigung, wie sie in Abschnitt IV, 1.1 festgestellt wurde, erst ab einer Konzentration von 1:4 im ELISA eingesetzt. Plasma resultierend aus der Stimulation mit ConA und PH wurde beginnend ab dem unverdünnten Zustand verwendet (schematische Darstellung der Plattenbelegung in Tabelle A2 des Anhangs). Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung wurde nachfolgend miteinander verglichen. Die höchsten OD-Werte resultierten für das Plasma infolge der Stimulation mit PWM. Das heißt, dass nach einer Stimulation mit PWM im Vergleich zur Stimulation mit ConA und PH mehr messbares IFN- $\gamma$  freigesetzt wurde. In einer 1:4 Verdünnung lag dabei die optische Dichte (OD) im Bereich  $3,2 < OD < 3,3$  wohingegen sowohl für ConA und PH bereits im unverdünnten Zustand des Plasmas deutlich niedrigere Werte erzielt wurden. Für ConA erreichte die OD im unverdünnten Zustand einen Maximalwert von  $OD \approx 0,89$  und für PH einen Wert von  $OD \approx 0,4$ . Somit lag die potentielle Stimulationsfähigkeit des PWM eindeutig über jener der anderen Mitogene. Im Vergleich zu den sehr hohen Werten für PWM in einer 1:4 Verdünnung, wurde für ConA  $OD \approx 0,3$  und für PH  $OD \approx 0,15$  bei gleicher Verdünnungsstufe gemessen. Eine genaue Darstellung der erhaltenen OD-Werte zeigt Abbildung A2 des Anhangs. Somit erwies sich eine Stimulation mit PWM am geeignetsten, um eine maximale Stimulation der Leukozyten im Blut der Rinder vor und während der Narkose zu induzieren und wurde demzufolge in den Folgeversuchen als primäres Stimulans eingesetzt. Vergleichsweise wurde bei entsprechenden Versuchsdurchläufen noch parallel eine Stimulation mit ConA vollzogen und die Daten ausgewertet, welche aber nicht mit in die Interpretation der Studie aufgenommen wurden. PH wurde aufgrund der äußerst geringen Werte in weiteren Versuchsdurchläufen ausgeschlossen. In Abbildung 16 sind die OD-Werte des Plasmas von Positivkontrolle II infolge einer Stimulation mit PWM, ConA und PH graphisch dargestellt.



**Abbildung 16: Resultierende OD-Werte infolge der Stimulation von Blut im Zuge der Gewinnung der Positivkontrolle II**

Es erfolgte eine Stimulation des Blutes mit PWM, ConA und PH. Die erhaltenen OD-Werte waren deutlich sichtbar infolge der Stimulation mit PWM am höchsten. Positivkontrolle II: Positivkontrolle Nr.2, die aus der Stimulation des Blutes mit PWM eines klinisch gesunden Rindes aus dem LVG gewonnen wurde (siehe Tabelle 3; Abschnitt III, 1.1).

Plasma infolge der Stimulation mit PWM wurde ab einer Verdünnung von 1:4 eingesetzt; Plasma infolge der Stimulation mit ConA und PH wurde beginnend ab dem unverdünnten Zustand verwendet.

## **2 Untersuchung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Blutplasma von Rindern vor und während einer Anästhesie mit Hilfe eines bovinen IFN- $\gamma$ release assays**

Nach den genannten Vorarbeiten (Abschnitt IV, 1) erfolgte die Überprüfung, ob eine Anästhesie und die dabei eingesetzten Narkotika einen Einfluss auf die Vitalität peripherer Leukozyten in Rinderblut haben. Blut wurde, wie in Abschnitt III, 1.1 beschrieben, von insgesamt 14 Tieren unmittelbar vor und zehn

Minuten in Anästhesie entnommen. Zwei der insgesamt 14 Tiere wurden aufgrund von Fieber bzw. einer Vorbehandlung mit Cortison als festgelegte Ausschlusskriterien nicht in die Auswertung integriert. Für die Interpretation wurden demnach die Resultate von zwölf Rindern berücksichtigt. Nach Blutentnahme erfolgte eine Stimulation mit PWM. ConA wurde parallel als zweites Stimulans eingesetzt, wobei die daraus entstandenen Ergebnisse lediglich als Vergleich dienten und primär die Plasmaproben infolge Stimulation mit PWM beurteilt wurden (siehe auch Abschnitt III, 3.2 und 3.3). Nach Durchführung des bovinen IFN- $\gamma$  release assays (Abschnitt III, 4.1) konnte freigesetztes IFN- $\gamma$  quantitativ nachgewiesen werden. Dabei erfolgte die Verdünnung des Plasmas in 1:5-Schritten. In allen untersuchten Plasmaproben resultierte die IFN- $\gamma$ -Freisetzung in, entweder nahezu identischen Werten zu beiden Zeitpunkten, oder einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentration zum Zeitpunkt während der Narkose.

### **2.1 Nahezu identische IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während der Anästhesie**

In insgesamt fünf (Narkosen der Tiere Nrn.: 3, 4, 5, 11, 13) von zwölf Fällen konnten mehr oder weniger identische Werte der optischen Dichte (OD) entsprechend des freigesetzten IFN- $\gamma$  zu beiden Zeitpunkten der Blutentnahme detektiert werden. Die dabei erreichten OD-Werte bewegten sich in allen fünf Fällen vom unverdünnten Zustand bis hin zu einer Verdünnung von 1:5 im Bereich von  $1,5 < OD < 3,7$ . Bis hin zu einer Verdünnung von 1:125 konnten OD-Werte  $> 0,1$  detektiert werden. In den beiden letzten Verdünnungsstufen (1:625, 1:3125) lagen die gemessenen Werte in den meisten Fällen unterhalb 0,1 und wurden demzufolge durch die zu hohe Verdünnung als nicht mehr aussagekräftig gewertet und von der schlussendlichen Interpretation ausgeschlossen. Abbildung 17 veranschaulicht am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 11 die gemessenen OD-Werte im ELISA. Die vorausgegangene Plattenbelegung inklusive verwendeter Verdünnungen wurde beispielhaft in Abschnitt III, 4.1 (Tabelle 4) dargestellt. Als interne Negativkontrolle wurde ein Teil der Blutproben mit PBS anstelle von PWM „stimuliert“ (Abschnitt III, 3.3) und im ELISA in Spalte Nr. 12 untersucht.

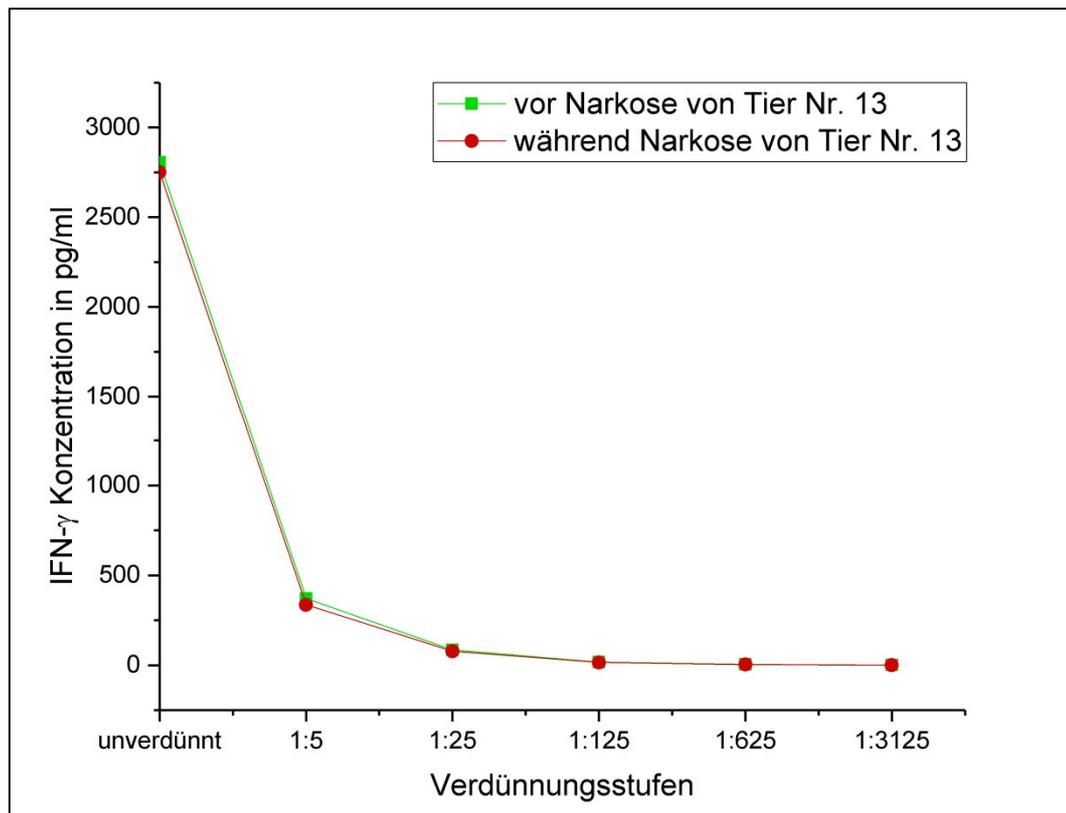
	IFN- $\gamma$ Standard			Positivkontrolle II		vor Narkose			während Narkose					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12	
A	0,819	0,809	0,806	3,634	3,647	3,642	3,655	3,653	3,690	3,677	3,700	0,203	Endpoint	
	0,013	0,004	0,034	0,029	0,027	0,032	0,028	0,028	0,025	0,036	0,024	0,001	Lm1 450	
	0,805	0,805	0,772	3,605	3,620	3,610	3,627	3,625	3,665	3,641	3,675	0,201	Lm2 650	
B	0,894	0,936	0,886	3,531	3,512	3,569	3,609	3,561	3,630	3,628	3,627	0,152	Automix: Off	
	0,020	0,048	0,007	0,025	0,024	0,022	0,022	0,023	0,024	0,024	0,023	0,002	Calibrate: On	
	0,874	0,888	0,879	3,507	3,488	3,547	3,586	3,537	3,606	3,604	3,604	0,150	Column Priority	
C	0,475	0,440	0,557	3,217	3,218	2,423	2,459	2,549	2,710	2,732	2,763	0,174	C. Speed: Normal	
	0,002	-0,000	0,058	0,018	0,019	0,022	0,016	0,016	0,015	0,016	0,017	0,001	Start Read:	
	0,473	0,440	0,499	3,199	3,198	2,402	2,443	2,533	2,695	2,716	2,746	0,173	14:13 30.08.2016	
D	0,247	0,237	0,272	2,452	2,453	0,710	0,749	0,719	0,862	0,877	0,879	0,001	Negativkontrollen der Stimulation (Blut mit „PBS“ stimuliert):	
	-0,000	0,001	0,018	0,014	0,015	0,004	0,004	0,005	0,005	0,006	0,005	-0,000		● vor
	0,247	0,235	0,254	2,438	2,438	0,706	0,744	0,715	0,857	0,871	0,873	0,001		● während Narkose
E	0,132	0,117	0,125	1,556	1,535	0,164	0,174	0,188	0,199	0,189	0,188	-0,001	Negativkontrolle des ELISAs: ○ reines PBS	
	-0,000	0,000	0,001	0,010	0,009	0,003	0,009	0,001	0,001	0,002	0,002	0,000		
	0,132	0,117	0,124	1,546	1,526	0,160	0,166	0,187	0,198	0,187	0,186	-0,001		
F	0,063	0,065	0,064	0,894	0,908	0,035	0,042	0,033	0,043	0,036	0,039	0,386		
	-0,001	0,003	0,000	0,006	0,005	0,000	0,008	0,001	0,001	0,001	0,000	0,014		
	0,064	0,062	0,064	0,889	0,902	0,034	0,034	0,032	0,042	0,035	0,038	0,372		
G	0,034	0,031	0,031	0,504	0,479							0,372		
	0,000	0,006	0,000	0,003	0,003							0,002		
	0,034	0,025	0,030	0,501	0,476							0,370		
H	0,018	0,016	0,022	0,250	0,238							0,372		
	-0,001	-0,001	0,005	0,001	0,001							0,008		
	0,018	0,017	0,016	0,249	0,237							0,364		

**Abbildung 17: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rinderplasmaproben vor und während einer Narkose (Narkose von Tier Nr. 11)**

Es erfolgte der parallele Ansatz von IFN- $\gamma$ -Standard, Positivkontrolle und den Plasmaproben vor und während der Narkose. Zudem wurden in Spalte Nr. 12 die Negativkontrollen untersucht. Dies waren zum einen die Negativkontrollen der Stimulation von Blut vor der Narkose (hier in Grün dargestellt) und während der Narkose (hier in Gelb dargestellt) sowie die Negativkontrolle des ELISAs (reines PBS, in weiß dargestellt).

Aus den OD-Werten des IFN- $\gamma$  release assays erfolgte im Anschluss die Berechnung der tatsächlichen Konzentration (in pg/ml) des, im Plasma enthaltenen IFN- $\gamma$ . Anhand der eingesetzten Konzentrationen des IFN- $\gamma$ -Standards in einer Spanne von 500 pg/ml bis 3,9 pg/ml gemäß den Angaben des Kits (siehe Abschnitt III, 4.1) und der, im ELISA gemessenen OD-Werte für den Standard sowie der einzelnen Proben, konnte die genaue IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Plasmaproben berechnet werden. Aus den daraus erhaltenen Werten wurde für jedes Tier und die jeweiligen Verdünnungsstufen separat ein Mittelwert aus dem gemessenen Dreifachansatz für die IFN- $\gamma$ -Konzentration jeweils vor und während der Narkose

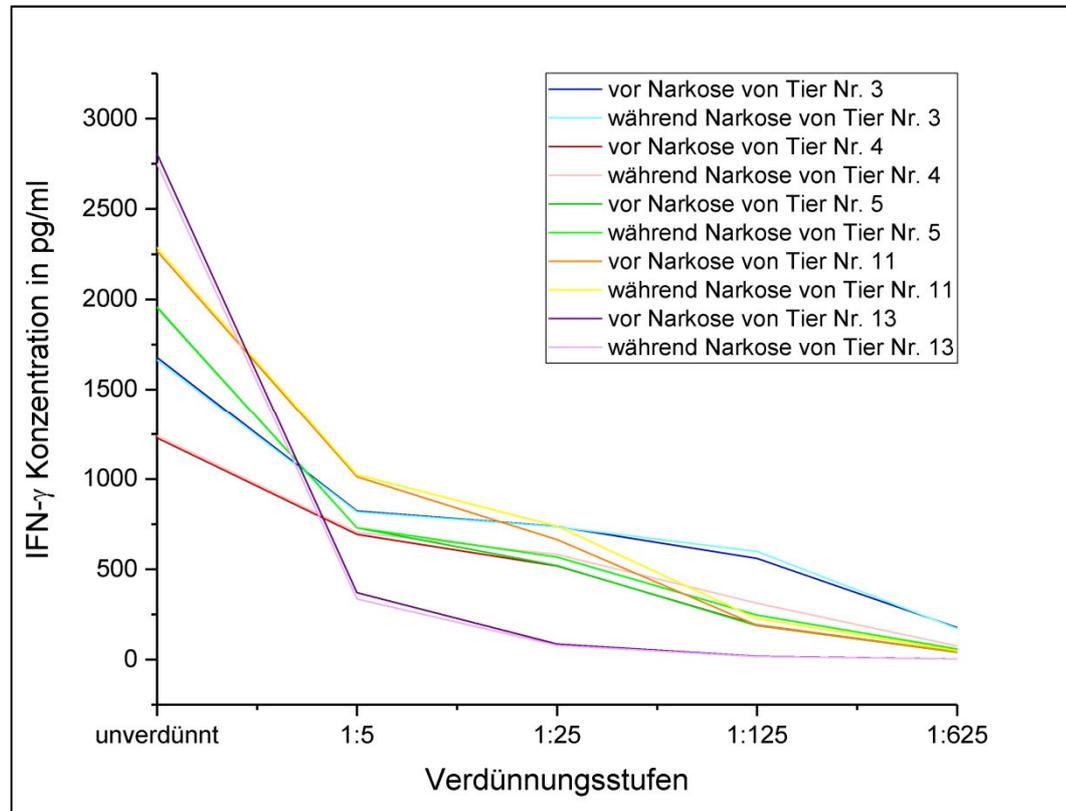
berechnet. In Tabelle 7 sind die kalkulierten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen des Plasmas zu beiden Zeitpunkten für alle zwölf Tiere aufgetragen. Aufgrund der oben beschriebenen, niedrigen Werte in den beiden letzten Verdünnungsstufen (1:625, 1:3125) und demzufolge deren niedrigen Aussagekraft, wurden diese in der Kalkulation einzelner IFN- $\gamma$ -Konzentrationen und weiteren Darstellung nicht berücksichtigt. Es wurden Graphen erstellt, in denen die errechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen für verschiedene Verdünnungsstufen der Plasmaproben aufgetragen sind. Unterschiede in der Freisetzung von IFN- $\gamma$  zu beiden Zeitpunkten konnten auf diese Weise besser visualisiert werden. Abbildung 18 veranschaulicht die Gegenüberstellung des Freigesetzten IFN- $\gamma$  vor und während der Narkose am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 13, wobei deutlich sichtbar ist, dass die Konzentrationen zu beiden Zeitpunkten nahezu identisch sind. Die einzelnen Graphen für die verbleibenden vier Narkosen Nrn.: 3, 4, 5 und 11 sind im Anhang dargestellt (Anhang, Abbildung A3).



**Abbildung 18: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5) am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 13**

Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen wurden anhand des IFN- $\gamma$ -Standards des Kits und der, im ELISA erhaltenen OD-Werte berechnet. Man erkennt, dass die IFN- $\gamma$ -Freisetzung vor und während der Narkose nahezu identisch ist.

Eine nahezu identische IFN- $\gamma$ -Konzentration vor und während der Narkose konnte, wie oben beschrieben, in fünf von zwölf Fällen detektiert werden. Abbildung 19 veranschaulicht die nahezu identischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in den genannten fünf Fällen.



**Abbildung 19: Darstellung der fünf Narkosen von Tier Nr. 3, 4, 5, 11 und 13 mit nahezu identischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während der Anästhesie**

Die Geraden für beide Zeitpunkte liegen in den jeweiligen Narkosen sehr nahe aneinander bzw. fast übereinander, wodurch gezeigt wird, dass sich die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zu beiden Zeitpunkten kaum bis gar nicht unterscheiden.

## 2.2 Erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentration während der Anästhesie

Neben den beschriebenen fünf Fällen mit nahezu identischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während einer Narkose, konnte in den verbliebenen sieben Fällen (Narkosen der Tiere Nrn.: 1, 2, 7, 8, 9, 12, 14) eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentration während der Anästhesie detektiert werden. Zunächst wurden auch hier (wie in Abschnitt IV, 2.1) im ELISA die OD-Werte, die maßgeblich für

die Freisetzung an IFN- $\gamma$  sind, gemessen. Die vorausgegangene Plattenbelegung inklusive verwendeter Verdünnungen wurde beispielhaft in Abschnitt III, 4.1 (Tabelle 4) dargestellt. Als interne Negativkontrolle wurde ein Teil der Blutproben mit PBS anstelle von PWM „stimuliert“ (siehe Abschnitt III, 3.3) und im ELISA in Spalte Nr. 12 mitgetestet. Die erreichten OD-Werte für Plasma im unverdünnten Zustand bis hin zu einer 1:5 Verdünnung lagen, unter Betrachtung aller sieben Narkosen im Bereich von  $1,2 < OD < 3,7$  und erreichten bis zu einer 1:125 Verdünnungen Werte für  $OD \geq 0,1$ . Wie bei den fünf beschriebenen Fällen aus Abschnitt IV, 2.1, lagen die OD-Werte für die beiden letzten Verdünnungsstufen (1:625, 1:3125) teilweise unterhalb des gesetzten Grenzwertes von  $OD \leq 0,1$  und wurden demzufolge aufgrund der geringen Aussagekraft von weiteren Kalkulationen bzw. Darstellungen ausgeschlossen. In Abbildung 20 sind am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 8 die erhaltenen OD-Werte im ELISA abgebildet. Dabei wird die erhöhte IFN- $\gamma$ -Freisetzung zum Zeitpunkt während der Narkose bereits deutlich.

		IFN- $\gamma$ Standard			Positivkontrolle I		vor Narkose			während Narkose						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A		1,252	1,193	1,211	3,546	3,585	3,623	3,597	3,638	3,718	3,712	3,719	0,709	Endpoint		
		0,005	0,008	0,007	0,039	0,025	0,046	0,098	0,046	0,028	0,027	0,028	0,004	Lm1 450		
		1,247	1,185	1,204	3,507	3,560	3,577	3,499	3,592	3,689	3,685	3,691	0,705	Lm2 650		
B		1,190	1,181	1,217	3,275	3,296	3,484	3,497	3,492	3,636	3,702	3,694	0,707	Automix: Off		
		0,008	0,011	0,009	0,021	0,026	0,026	0,025	0,022	0,040	0,026	0,026	0,008	Calibrate: On		
		1,181	1,170	1,208	3,253	3,271	3,458	3,472	3,471	3,596	3,676	3,668	0,699	Column Priority		
C		0,661	0,618	0,636	2,506	2,564	1,776	1,797	1,826	2,768	2,813	2,842	0,726	C. Speed: Normal		
		0,006	0,004	0,004	0,017	0,022	0,014	0,012	0,021	0,018	0,016	0,016	0,003	Start Read:		
		0,654	0,614	0,632	2,489	2,542	1,762	1,785	1,805	2,750	2,797	2,826	0,723	14:21 27.07.2016		
D		0,308	0,326	0,326	1,608	1,648	0,458	0,457	0,446	0,880	0,867	0,864	0,001	Negativkontrollen der Stimulation (Blut mit „PBS“ stimuliert):		
		-0,000	0,005	0,002	0,014	0,014	0,018	0,005	0,009	0,005	0,012	0,004	-0,000		● vor	
		0,308	0,320	0,325	1,594	1,635	0,440	0,452	0,438	0,875	0,854	0,860	0,001		● während Narkose	
E		0,167	0,168	0,168	0,913	0,906	0,097	0,080	0,112	0,201	0,181	0,184	-0,001	Negativkontrolle des ELISAs:		
		-0,002	0,000	0,002	0,010	0,006	0,003	0,004	0,009	0,008	0,000	0,001	0,000		○ reines PBS	
		0,169	0,168	0,167	0,903	0,900	0,095	0,077	0,103	0,193	0,181	0,183	-0,001			
F		0,085	0,082	0,090	0,493	0,506	0,051	0,027	0,059	0,053	0,041	0,039	3,115			
		-0,002	-0,001	0,000	0,002	0,006	-0,001	0,002	0,001	0,000	0,005	-0,001	0,018			
		0,088	0,082	0,090	0,490	0,499	0,052	0,025	0,058	0,053	0,036	0,040	3,097			
G		0,053	0,042	0,067	0,260	0,293							3,154			
		-0,003	-0,001	-0,000	0,004	0,005							0,018			
		0,055	0,043	0,068	0,256	0,288							3,137			
H		0,019	0,020	0,029	0,148	0,121							3,178			
		-0,001	-0,002	-0,002	-0,001	-0,001							0,019			
		0,021	0,022	0,031	0,149	0,122							3,159			

**Abbildung 20: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rinderplasmaproben vor und während einer Narkose (Narkose von Tier Nr. 8)**

Es erfolgte der parallele Ansatz von IFN- $\gamma$ -Standard, Positivkontrolle und den Plasmaproben vor und während der Narkose. Zudem wurden in Spalte Nr. 12 die Negativkontrollen untersucht. Dies waren zum einen die Negativkontrollen der Stimulation von Blut vor der Narkose (hier in Grün dargestellt) und während der Narkose (hier in Gelb dargestellt) sowie die Negativkontrolle des ELISAs (reines PBS, in weiß dargestellt).

Nachfolgend wurde, wie bereits für die fünf Fälle aus Abschnitt IV, 2.1 dargelegt, eine genaue Kalkulation der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in den Rinderplasmaproben zu beiden Zeitpunkten anhand der gegebenen Konzentrationen und OD-Werte des IFN- $\gamma$ -Standards sowie der gemessenen OD-Werte der Proben durchgeführt. In Tabelle 7 sind die einzelnen Konzentrationen für alle zwölf Narkosen aufgetragen.

**Tabelle 7: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in Plasmaproben von Rindern**

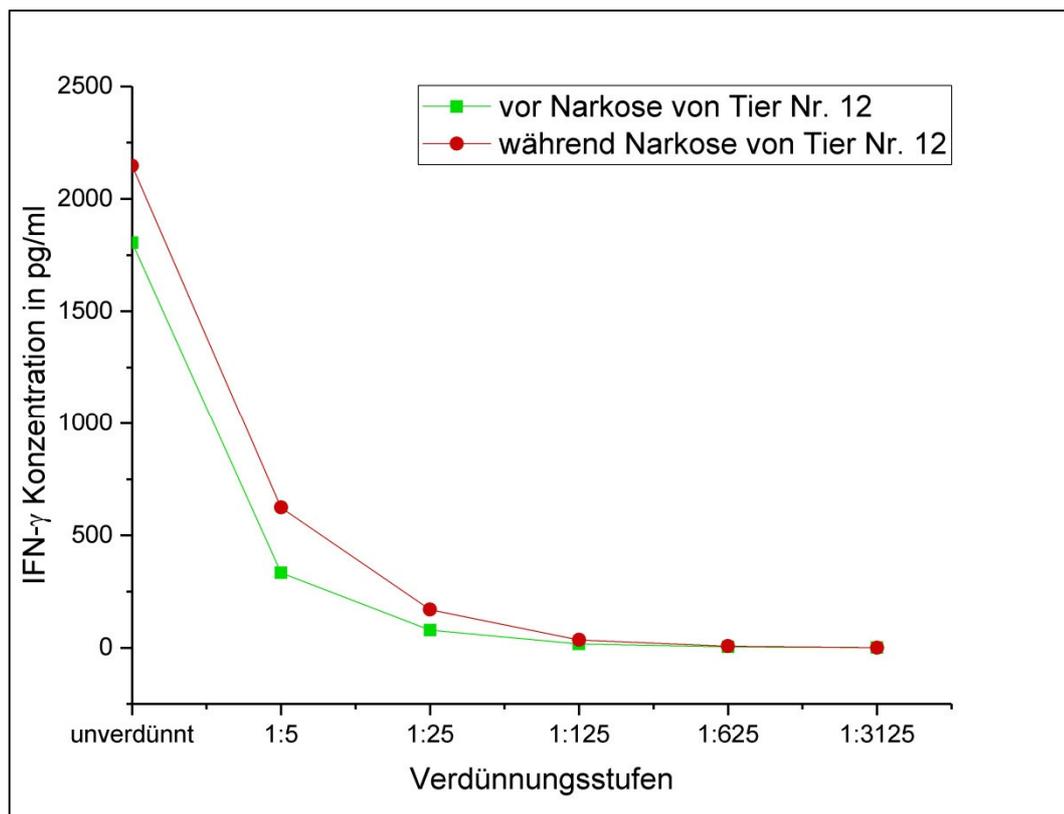
Narkose von Rind Nr.	Verdünnungsstufen Plasma			
	unverdünnt	1:5	1:25	1:125
1	2 118 <sup>a</sup> / 2 184 <sup>b</sup>	473 <sup>a</sup> / 731 <sup>b</sup>	117 <sup>a</sup> / 224 <sup>b</sup>	24 <sup>a</sup> / 48 <sup>b</sup>
2	2 156 / 2 269	683 / 944	165 / 612	34 / 143
3	1 679 / 1 664	822 / 818	737 / 735	560 / 598
4	1 228 / 1 241	694 / 704	518 / 582	191 / 312
5	1 958 / 1 954	730 / 730	520 / 568	189 / 247
7	1 402 / 1 550	373 / 611	73 / 198	18 / 44
8	1 469 / 1 524	728 / 766	354 / 554	87 / 169
9	2 159 / 2 254	954 / 1073	371 / 796	92 / 296
11	2 268 / 2 285	1 012 / 1 024	665 / 739	190 / 227
12	1 806 / 2 147	333 / 624	78 / 170	17 / 35
13	2 806 / 2 751	371 / 336	86 / 78	18 / 16
14	2 769 / 2 944	526 / 700	109 / 191	21 / 37

Mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in verschiedenen Verdünnungsstufen von Rinderplasmaproben unmittelbar vor und zehn Minuten in Anästhesie

<sup>a</sup>IFN- $\gamma$ -Konzentraion (pg/ml) unmittelbar vor der Anästhesie

<sup>b</sup>IFN- $\gamma$ -Konzentraion (pg/ml) zehn Minuten in Anästhesie

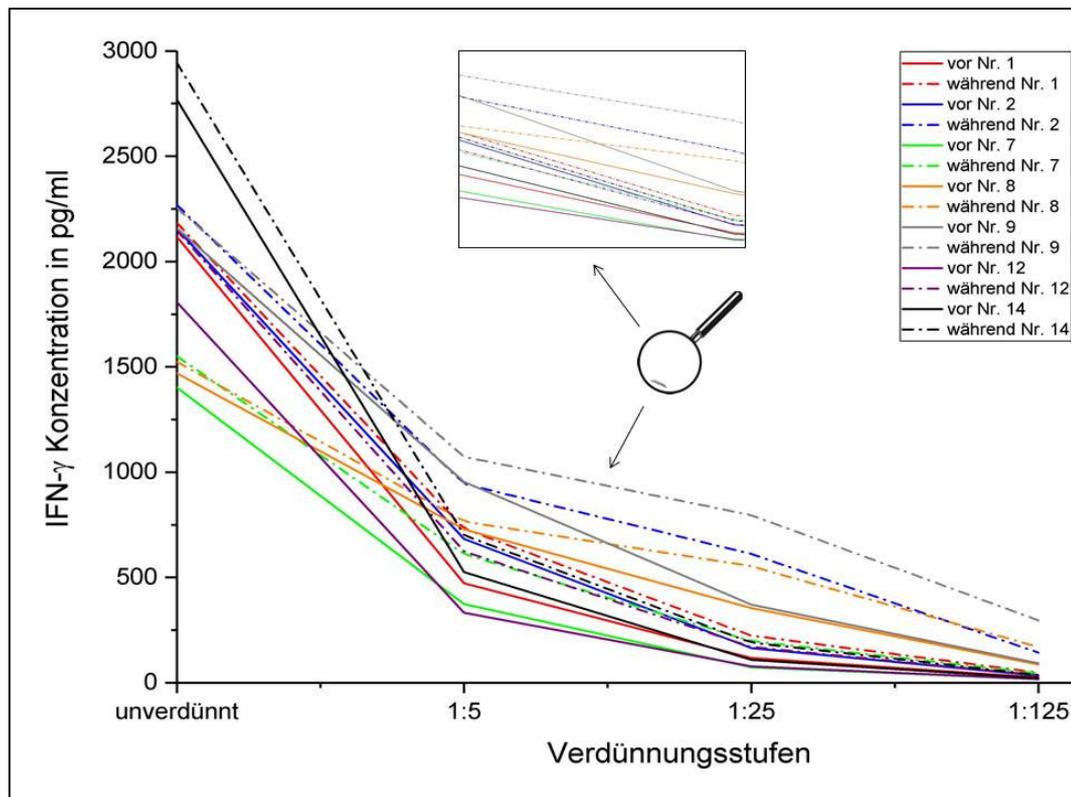
Die graphische Darstellung der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen für unterschiedliche Verdünnungsstufen am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 12 veranschaulicht deutlich die erhöhte Freisetzung an IFN- $\gamma$  während der Anästhesie (Abbildung 21). Die einzelnen Graphen für die übrigen sechs Narkosen Nrn.: 1, 2, 7, 8, 9 und 14 sind im Anhang dargestellt (Anhang, Abbildung A4).



**Abbildung 21: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5) am Beispiel der Narkose von Tier Nr. 12**

Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen wurden anhand des IFN- $\gamma$ -Standards des Kits und der, im ELISA erhaltenen OD-Werte berechnet. Man erkennt, dass die IFN- $\gamma$ -Freisetzung während der Narkose höher war als davor.

Eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentration während der Narkose konnte, wie oben beschrieben, in sieben der zwölf Fälle festgestellt werden. Abbildung 22 veranschaulicht vergleichend die erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen während der Anästhesie für die entsprechenden, sieben Narkosen.



**Abbildung 22: Darstellung der sieben Narkosen (Tier Nr. 1, 2, 7, 8, 9, 12, und 14) mit erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen während der Anästhesie**

Die Graphen für den Zeitpunkt während der Narkose liegen in allen sieben Fällen über jenen für vor der Anästhesie. Der Mittelteil wurde vergrößert dargestellt, um eine bessere Differenzierung der einzelnen Graphen zu ermöglichen.

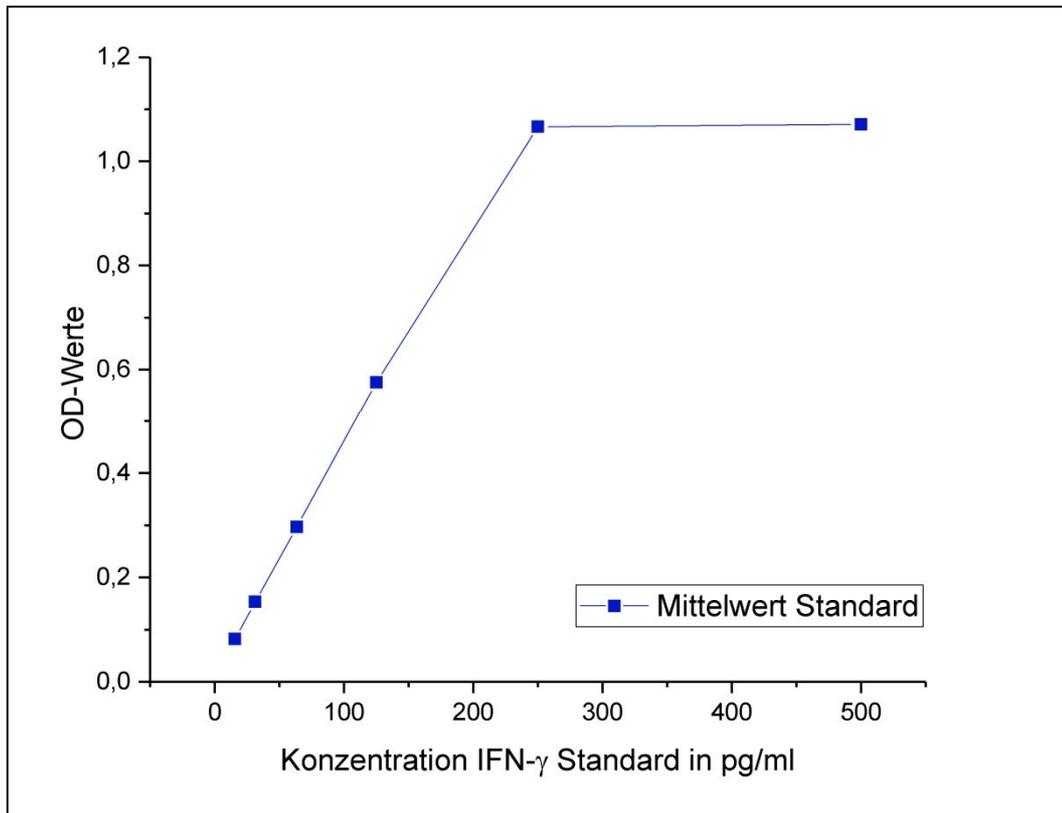
vor Nr. = vor der Narkose von Tier Nr.

während Nr. = während der Narkose von Tier Nr.

Die Resultate aus Abschnitt IV, 2.1 und 2.2 zeigen, dass die IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Plasma von Rindern vor und während der Narkose entweder nahezu identisch oder sogar erhöht während einer Narkose ist. Für die beiden Narkosen von Tier Nr. 6 und Tier Nr. 10, die aufgrund von Fieber bzw. aufgrund einer Vorbehandlung mit Cortison der Tiere von der Studie ausgeschlossen wurden, wurden ebenfalls die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen berechnet. Eine graphische Darstellung dieser beiden Narkosen befindet sich im Anhang (Anhang Abbildung A5 und A6).

Nach der Untersuchung der Plasmaproben von alle vierzehn Narkosen wurden die erzielten OD-Werte für den IFN- $\gamma$ -Standard der einzelnen Läufe verglichen, um den erfolgreichen Durchlauf der Untersuchung des Plasmas jeder einzelnen Narkose zu bestätigen. Die OD-Werte des IFN- $\gamma$ -Standards im Zuge der Erstellung

einer Positivkontrolle (Abschnitt IV 1.1) wurden ebenfalls miteinbezogen. Es wurde für jeden einzelnen Lauf und für die Konzentrationen des Standards von 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 15,6 pg/ml der Mittelwert der OD-Werte aus dem Dreifachansatz berechnet. Im Anschluss wurde aus diesen Werten ein Mittelwert der OD-Werte des Standards für jede Konzentration und für alle durchgeführten Untersuchungen (Narkosen, Erstellung Positivkontrolle) berechnet. Diese Werte wurden in Abbildung 23 dargestellt. Die OD-Werte für den IFN- $\gamma$ -Standard bewegten sich in jedem Fall im Bereich von:  $OD \approx 1$  bei 500 pg/ml und  $OD \approx 0,08$  bei einer Konzentration des Standards von 15,6 pg/ml. Dies entspricht der angegebenen Spanne des Kits für den IFN- $\gamma$ -Standard (in der die OD des Standards bei  $OD \approx 1,3$  für 500 pg/ml und  $OD \approx 0,1$  für 15,6 pg/ml liegt). Parallel wurden in jedem Durchlauf die Werte für die Positivkontrolle kontrolliert. Diese bewegten sich in allen vierzehn Fällen in der gleichen Spanne (wie in Abschnitt IV, 1.1 beschrieben), wodurch zusätzlich auf einen erfolgreichen Durchlauf in den einzelnen Fällen geschlossen werden konnte.



**Abbildung 23: Darstellung der mittleren OD-Werte für den IFN- $\gamma$ -Standard in unterschiedlichen Konzentrationen aus allen vierzehn Narkosen inklusive der Positivkontrollen I, II und III (Abschnitt IV, 1.1)**

Für die Konzentrationen des IFN- $\gamma$ -Standards von 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 15,6 pg/ml wurde ein Mittelwert der OD-Werte aus allen durchgeführten Untersuchungen (Narkosen, Erstellung der Positivkontrolle) berechnet. Die dargestellten Werte stimmen sehr gut mit der vom Kit zur Verfügung gestellten Spanne für den IFN- $\gamma$ -Standard überein. Konzentrationen zwischen 250-500 pg/ml führten zu OD-Werten  $> 1$ , wobei aufgrund der folgenden Übersättigung keine deutliche Steigung des Graphen mehr erfolgte.

### **3 Untersuchung von Rotwildplasmaproben mit Hilfe eines bovinen IFN- $\gamma$ release assays**

#### **3.1 Messung von freigesetztem IFN- $\gamma$ aus Rotwildplasma**

Basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt IV, 1 und 2 erfolgte im Anschluss die Untersuchung von Rotwildplasma zweier anästhesierter und eines toten Tieres. Der, in Abschnitt III, 1.2 erläuterten Probengewinnung von Rotwildblut folgte eine

Stimulation mit PWM des Blutes (Abschnitt III, 3.3) und eine nachfolgende Untersuchung der Plasmaproben mittels bovinen IFN- $\gamma$  release assay (Abschnitt III, 4.1). Wie bei der Untersuchung von Rinderplasma, wurden auch hier 1:5 Verdünnungen der Proben vorgenommen. In diesem Abschnitt der Studie wurde untersucht, ob eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern gegen bovines IFN- $\gamma$  des bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kits und IFN- $\gamma$  im Plasma von Rotwild vorhanden ist.

Es wurde Blut von insgesamt zwei anästhesierten Tieren gewonnen, welche im Rahmen von Routineuntersuchungen narkotisiert wurden. Verwendete Narkotika waren dabei, wie bei den Rindern, eine Zusammensetzung aus Ketamin und Xylazin. Zudem wurde Plasma eines unmittelbar vor Blutentnahme geschossenen Tieres untersucht (siehe Abschnitt III, 1.2). Nach Durchführung des bovinen IFN- $\gamma$  release assays war in allen drei Fällen eine Detektion von freigesetztem IFN- $\gamma$  möglich. Im ELISA wurde das IFN- $\gamma$  in Form der optischen Dichte analog der enthaltenen IFN- $\gamma$ -Konzentration im Plasma gemessen. Zunächst wurden die Plasmaproben des ersten narkotisierten Rotwilds und die des zweiten narkotisierten sowie des toten Tieres separat untersucht (siehe Anhang, Abbildung A7 und A8). Um eine bessere Vergleichbarkeit der drei Proben untereinander zu erhalten, erfolge anschließend eine parallele Untersuchung der Plasmaproben aller drei Tiere (Abbildung 24). Die vorangegangene Plattenbelegung wurde in Tabelle 5 (Abschnitt III, 4.1) dargestellt. Im Plasma der anästhesierten Tiere wurden im unverdünnten Zustand bis hin zu einer 1:5 Verdünnung OD-Werte von  $1,8 \leq OD \leq 3,4$  gemessen und erreichten bis zu einer 1:125 Verdünnungen Werte von  $OD \geq 0,1$ . Wie im Falle von untersuchtem Rinderplasma waren die OD-Werte für die beiden letzten Verdünnungsstufen (1:625, 1:3125) unterhalb des gesetzten Grenzwertes von  $OD \leq 0,1$  und wurden demzufolge aufgrund der geringen Aussagekraft von weiteren Kalkulationen und Darstellungen ausgeschlossen.

Auch im Falle des geschossenen Tieres, konnte IFN- $\gamma$  detektiert werden (Abbildung 24). Die dabei gemessenen Werte für die optische Dichte lagen deutlich unterhalb jenen, welche für die anästhesierten Tiere gemessen wurden. Hinzu kommt, dass eine Koagulation des Blutes bereits kurz nach dem Tod des Tieres ( $< 2$  min) eintrat und unsterile Bedingungen bei der Blutentnahme unvermeidbar waren, was zu einer bakteriellen Kontamination des Blutes führte. Diese Aspekte sprechen für eine deutlich schlechtere Qualität von Schlachtblut im Vergleich zu Blutproben von

anästhesierten Tieren.

Wie bei den Rindern (siehe Abschnitt IV, 2.2), wurden auch im Falle der Untersuchung des Rotwildplasmas die OD-Werte des IFN- $\gamma$ -Standards mit der vorgegebenen Spanne des Kits abgeglichen und stimmten in jedem Fall überein. Somit konnte auf den Erfolg der einzelnen Versuchsdurchläufe geschlossen werden.

		IFN- $\gamma$ Standard			Rotwild Narkose 1			Rotwild Narkose 2			Rotwild tot				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A		0,839	0,828	0,820	3,436	3,410	3,400	3,629	3,618	3,611	1,242	1,253	1,244	Endpoint	
		0,002	0,003	0,008	0,022	0,021	0,021	0,039	0,025	0,026	0,006	0,006	0,013	Lm1 450	
		0,837	0,825	0,812	3,415	3,388	3,378	3,590	3,593	3,586	1,235	1,247	1,232	Lm2 650	
B		0,901	0,886	0,917	1,829	1,797	1,862	3,200	3,235	3,191	0,337	0,334	0,333	Automix: Off	
		0,005	0,005	0,005	0,011	0,011	0,011	0,020	0,020	0,019	0,001	0,001	0,001	Calibrate: On	
		0,897	0,880	0,912	1,818	1,786	1,850	3,180	3,216	3,172	0,335	0,333	0,332	Column Priority	
C		0,474	0,458	0,470	0,457	0,453	0,451	1,263	1,270	1,216	0,067	0,078	0,066	C. Speed: Normal	
		0,003	0,001	0,001	0,004	0,004	0,000	0,026	0,013	0,006	-0,001	-0,002	-0,002	Start Read:	
		0,471	0,457	0,469	0,453	0,449	0,450	1,237	1,258	1,210	0,068	0,080	0,068	16:18 20.12.2016	
D		0,237	0,239	0,269	0,108	0,118	0,082	0,283	0,272	0,281	0,011	0,012	0,014		
		-0,001	-0,000	0,042	0,009	0,010	-0,001	0,001	0,001	0,000	-0,001	-0,001	-0,002		
		0,238	0,240	0,226	0,098	0,109	0,083	0,282	0,271	0,280	0,012	0,013	0,016		
E		0,127	0,121	0,106	0,014	0,010	0,016	0,047	0,060	0,055	0,044	-0,002	-0,004		
		-0,003	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	0,034	-0,002	-0,002		
		0,130	0,123	0,108	0,016	0,012	0,018	0,049	0,061	0,057	0,010	-0,001	-0,002		
F		0,065	0,058	0,061	-0,003	-0,003	0,010	0,021	0,016	0,009	-0,004	-0,005	-0,004		
		-0,002	-0,001	-0,002	-0,003	-0,003	0,010	0,012	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002		
		0,068	0,059	0,063	-0,001	-0,000	0,000	0,009	0,016	0,011	-0,002	-0,003	-0,002		
G		0,031	0,027	0,032	-0,005	-0,007	0,011	-0,004	0,000	-0,005	-0,004	0,009	-0,006		
		-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	0,000	-0,002	-0,002	-0,002	-0,002	-0,001	-0,002		
		0,034	0,029	0,035	-0,002	-0,004	0,011	-0,003	0,002	-0,003	-0,002	0,010	-0,003		
H		0,014	0,010	0,011	0,003	-0,005	0,016	-0,002	-0,006	-0,003	-0,007	-0,005	0,020		
		0,002	-0,003	-0,004	-0,001	-0,002	0,005	-0,002	-0,003	0,000	-0,003	-0,001	0,022		
		0,012	0,012	0,014	0,003	-0,003	0,011	-0,000	-0,003	-0,003	-0,004	-0,004	-0,003		

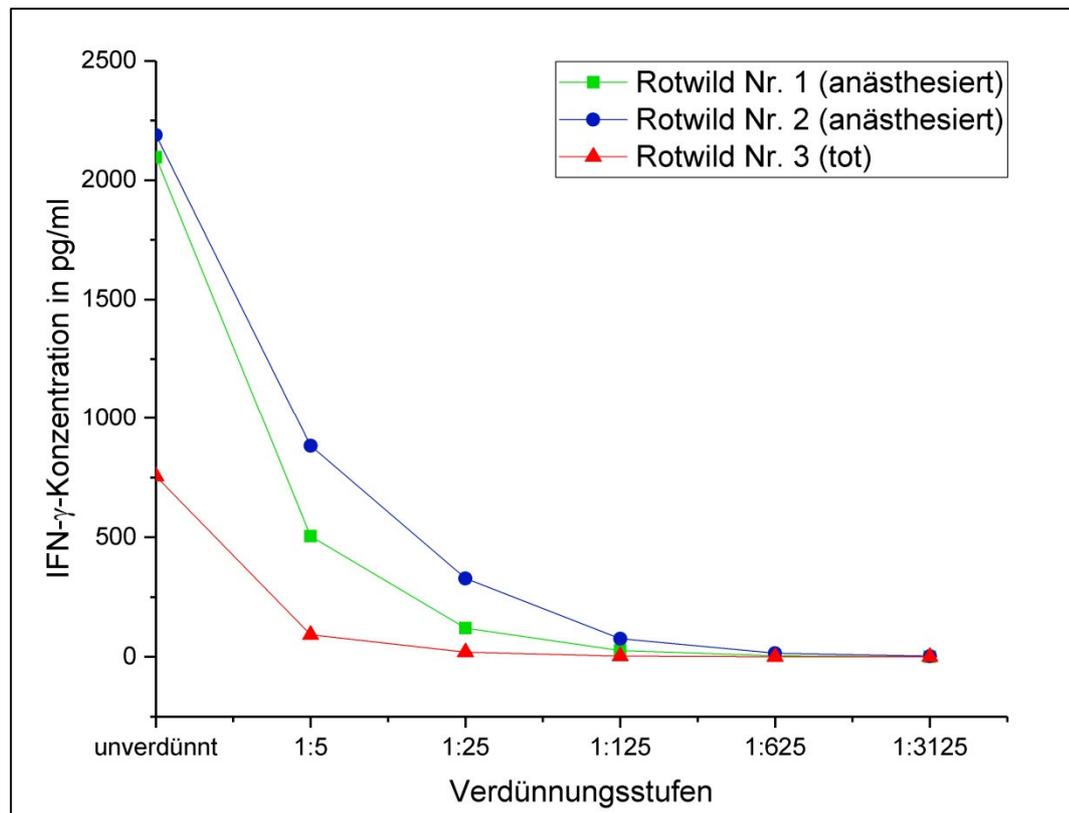
**Abbildung 24: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben zweier anästhesierter und eines toten Tieres**

Nachfolgend wurden, wie im Falle der Rinderproben die genauen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen anhand des IFN- $\gamma$ -Standards des Kits und der, im ELISA erhaltenen OD-Werte berechnet. In Tabelle 8 sind die genauen Konzentrationen an IFN- $\gamma$ , die im Plasma von Rotwildblut gemessen wurden, gelistet. Um die gemessenen Werte der drei Tiere besser miteinander vergleichen zu können, erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse in einem Graphen, indem die kalkulierten Konzentrationen für IFN- $\gamma$  in Abhängigkeit der einzelnen Verdünnungsstufen aufgetragen wurden (Abbildung 25).

**Tabelle 8: IFN- $\gamma$  Konzentrationen (pg/ml) in Plasmaproben von Rotwild**

Rotwild	Verdünnungsstufen Plasma			
	unverdünnt	1:5	1:25	1:125
<b>Rotwild aus Anästhesie Nr. 1</b>	2 096	505	120	26
<b>Rotwild aus Anästhesie Nr. 2</b>	2 189	883	328	76
<b>totes Rotwild</b>	755	93	19	4

Im unverdünnten Zustand bzw. in den ersten Verdünnungsstufen konnte eine adäquate IFN- $\gamma$ -Detektion im Plasma von lebendem Rotwild im bovinen ELISA festgestellt werden. Damit wurde eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$  und IFN- $\gamma$  aus Rotwildblut gezeigt. Die Untersuchung von Schlachttierblut liefert quantitativ deutlich geringere Werte.



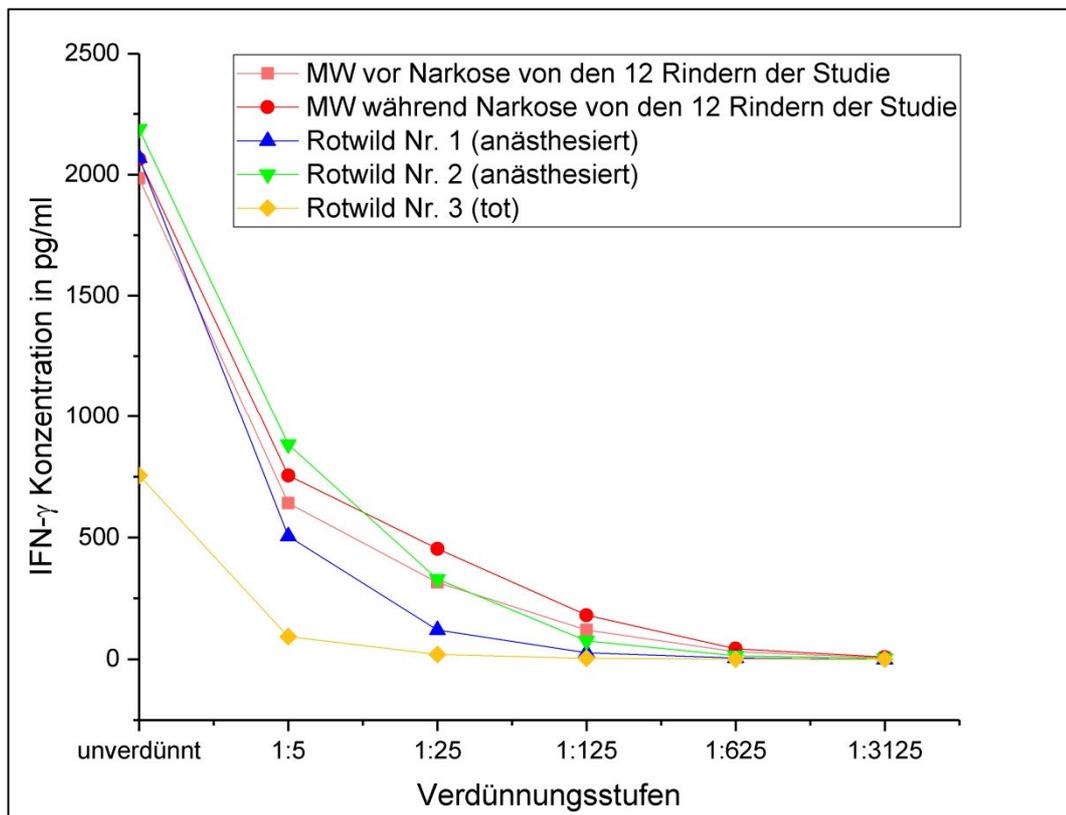
**Abbildung 25: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) in Plasma zweier anästhesierter und eines toten Rotwilds für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5)**

### 3.2 Vergleich der gemessenen IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus Rinder- bzw. Rotwildplasma mit dem bovinen IFN- $\gamma$ release assay

Vergleicht man die gemessenen OD-Werte bezüglich der IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Rotwildplasma mit jenen, welche im Zuge der Untersuchung von Rinderplasma gemessen wurden, so wurden vor allem im unverdünnten Zustand bis hin zu einer 1:5-Verdünnung sehr ähnliche Werte für beide Spezies erreicht. Im Falle der Rinder wurden OD-Werte von  $1,5 < OD < 3,7$  und  $1,2 < OD < 3,7$  (siehe Abschnitt IV, 2.1 und 2.2) und nach der Untersuchung von Rotwildplasma oben genannte Werte von  $1,8 \leq OD \leq 3,4$  für entsprechende Verdünnungen erzielt. Dabei erbrachte eine Rotwildplasmaprobe relativ hohe Werte selbst in der 1:5 Verdünnung, was die verhältnismäßig hohe Spanne erklärt.

Analog der oben beschriebenen und sehr ähnlichen OD-Werte in Rinder- und Rotwildplasma, lagen auch die anhand des IFN- $\gamma$ -Standards errechneten

IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Rotwild- und Rinderplasma sehr nahe aneinander (vergleiche Tabelle 7 und Tabelle 8). Dabei bewegten sich die genauen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im unverdünnten Zustand bis hin zu einer 1:5 Verdünnung des Rinderplasmas im Bereich von  $333 \text{ pg/ml} \leq \text{IFN-}\gamma \leq 2944 \text{ pg/ml}$  und im Plasma von anästhesiertem Rotwild im Bereich von  $505 \text{ pg/ml} \leq \text{IFN-}\gamma \leq 2189 \text{ pg/ml}$ , wobei auch hier berücksichtigt werden muss, dass für eines der Rotwild-Tiere sehr hohe Werte erreicht wurden, was die Spanne an hob. IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Plasma des toten Tieres waren zwischen  $755 \text{ pg/ml}$  und  $93 \text{ pg/ml}$  in den genannten Verdünnungen. Abbildung 26 zeigt eine vergleichende Darstellung der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen, welche im Mittel für die Rinder-Narkosen bzw. in Plasma von Rotwildblut gemessen wurden.



**Abbildung 26: Vergleichende Darstellung der gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Plasma von Rindern sowie im Plasma von Rotwild**

MW: Mittelwert der IFN- $\gamma$ -Konzentration für verschiedene Verdünnungsstufen in Plasma vor bzw. während der Narkose von den zwölf Rindern der Studie.

Es ist deutlich zu sehen, dass die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen, die im Plasma von Rotwildblut detektiert wurden, nahe dem Bereich des gemessenen IFN- $\gamma$  aus dem Plasma der Rinder liegen. Es besteht eine sehr gute Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern des Kits gegen bovines IFN- $\gamma$  und cervidem IFN- $\gamma$ .

### 3.3 Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$

Gemäß Abschnitt III, 4.2 erfolgte eine Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$  bzw. nun auch cervides IFN- $\gamma$ , um optimale Konditionen für die Untersuchung von Rotwildplasma auf freigesetztes IFN- $\gamma$  zu erhalten. Es erfolgte zunächst die Titration des Fangantikörpers mAB MT17.1, der in unterschiedlichen Konzentrationen im Zuge der erneuten Untersuchung bereits getesteter Rotwild-Proben eingesetzt wurde. Die dabei durchgeführte Plattenbelegung inklusive der verwendeten Konzentrationen wurde in Abschnitt III 4.2 beispielhaft dargestellt (Tabelle 6). Es wurde der Einsatz von mAB MT17.1 in einer

Konzentration von 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml untersucht. Die dabei erreichten OD-Werte sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Die Konzentration des Detektionsantikörpers wurde dabei konstant in der bisherigen Konzentration von 0,25 µg/ml eingesetzt.

	IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT17.1 = 1µg/ml			Rotwild A 1; mAB MT17.1 = 1µg/ml			IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT17.1 = 2µg/ml			Rotwild A 1; mAB MT17.1 = 2µg/ml		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,807	0,821	0,827	2,504	2,314	2,303	1,025	1,074	1,057	3,140	3,206	3,207
	0,011	0,004	0,005	0,013	0,012	0,013	0,006	0,005	0,006	0,028	0,018	0,019
	0,795	0,817	0,822	2,491	2,302	2,291	1,019	1,069	1,051	3,112	3,188	3,188
B	0,736	0,778	0,868	1,313	1,224	1,209	0,954	0,952	0,998	1,749	1,689	1,731
	0,013	0,005	0,009	0,012	0,006	0,013	0,006	0,009	0,006	0,014	0,009	0,009
	0,722	0,774	0,859	1,302	1,218	1,196	0,948	0,942	0,992	1,735	1,680	1,722
C	0,405	0,430	0,426	0,320	0,354	0,319	0,503	0,509	0,519	0,442	0,436	0,443
	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002	0,005	0,002	0,003	0,005
	0,404	0,428	0,423	0,319	0,353	0,318	0,500	0,506	0,514	0,440	0,434	0,437
D	0,215	0,222	0,222	0,065	0,072	0,080	0,283	0,265	0,268	0,090	0,090	0,110
	-0,002	0,001	-0,000	-0,001	-0,001	0,005	0,006	0,001	0,002	-0,000	-0,001	-0,001
	0,216	0,221	0,222	0,067	0,073	0,076	0,277	0,265	0,266	0,090	0,091	0,111
E	0,117	0,123	0,118	0,019	0,015	0,011	0,207	0,135	0,135	0,029	0,020	0,017
	-0,001	0,006	0,000	0,005	-0,000	-0,001	0,066	-0,000	-0,000	0,011	0,004	-0,000
	0,118	0,117	0,118	0,014	0,015	0,012	0,142	0,135	0,136	0,018	0,017	0,017
F	0,053	0,058	0,064	0,004	0,002	0,021	0,066	0,079	0,066	0,002	0,006	0,010
	-0,001	0,000	-0,001	0,000	0,002	0,020	-0,000	0,015	0,000	-0,001	0,003	0,006
	0,055	0,058	0,065	0,004	0,001	0,001	0,067	0,064	0,066	0,003	0,003	0,004
G	0,033	0,029	0,035	0,001	0,002	-0,002	0,031	0,031	0,041	-0,001	-0,001	0,003
	0,001	-0,001	0,002	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	-0,001	0,006	-0,000	-0,000	0,003
	0,032	0,031	0,033	0,003	0,003	-0,001	0,032	0,032	0,035	-0,000	-0,001	0,000
H	0,015	0,014	0,015	-0,003	-0,004	0,001	0,018	0,017	0,044	-0,002	0,002	0,003
	-0,002	-0,001	0,001	-0,002	-0,001	0,003	-0,000	-0,001	0,025	-0,001	0,003	-0,001
	0,017	0,016	0,014	-0,001	-0,002	-0,002	0,019	0,018	0,019	-0,001	-0,001	0,004

Endpoint

Lm1 450

Lm2 650

Automix: Off

Calibrate: On

Column Priority

C. Speed: Normal

Start Read:

14:12 18.11.2016

**Abbildung 27: Titration des Fangantikörpers**

mAB MT17.1 wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml und 2 µg/ml eingesetzt. Für jede Titrationstufe wurde der IFN- $\gamma$ -Standard separat untersucht.

A 1: Anästhesie von Rotwild Nr. 1

		IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT17.1 = 5 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT17.1 = 5 $\mu$ g/ml			IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT17.1 = 10 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT17.1 = 10 $\mu$ g/ml				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A		0,723	0,716	0,714	3,360	3,377	3,300	0,698	0,737	0,718	3,348	3,215	3,183	Endpoint	
		-0,003	0,000	-0,001	0,020	0,024	0,017	0,000	-0,001	-0,001	0,015	0,015	0,013	Lm1 450	
B		0,726	0,716	0,715	3,340	3,353	3,284	0,698	0,738	0,719	3,333	3,200	3,169	Lm2 650	
		0,930	0,933	0,973	1,757	1,777	1,782	0,947	0,997	0,943	1,748	1,740	1,731	Automix: Off	
C		0,006	0,002	0,003	0,005	0,010	0,008	0,003	0,036	0,001	0,007	0,011	0,006	Calibrate: On	
		0,924	0,930	0,970	1,751	1,767	1,774	0,944	0,961	0,942	1,740	1,728	1,724	Column Priority	
D		0,506	0,517	0,500	0,421	0,454	0,436	0,486	0,503	0,520	0,434	0,444	0,463	C. Speed: Normal	
		0,002	-0,001	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,002	-0,002	-0,003	0,002	0,019	Start Read:	
E		0,504	0,518	0,503	0,424	0,457	0,439	0,489	0,505	0,523	0,436	0,442	0,444	14:15 18.11.2016	
		0,257	0,257	0,258	0,086	0,091	0,110	0,258	0,262	0,273	0,088	0,092	0,088		
F		0,000	-0,004	-0,004	-0,006	-0,005	0,011	-0,004	0,005	0,008	-0,005	-0,005	-0,004		
		0,257	0,261	0,262	0,092	0,096	0,099	0,262	0,256	0,265	0,093	0,097	0,092		
G		0,128	0,131	0,130	0,012	0,016	0,012	0,130	0,130	0,129	0,013	0,014	0,024		
		-0,006	-0,004	-0,004	-0,005	-0,005	-0,005	-0,004	-0,004	-0,004	-0,005	-0,004	0,004		
H		0,134	0,135	0,133	0,017	0,020	0,017	0,135	0,134	0,133	0,017	0,018	0,020		
		0,061	0,062	0,064	0,029	-0,002	0,006	0,065	0,060	0,064	0,001	0,002	-0,002		
I		-0,007	-0,005	-0,005	-0,006	-0,006	0,001	-0,005	-0,006	-0,005	-0,004	-0,002	-0,005		
		0,068	0,067	0,069	0,035	0,004	0,005	0,070	0,065	0,069	0,005	0,004	0,003		
J		0,030	0,029	0,028	-0,006	-0,005	0,029	0,034	0,029	0,030	-0,006	-0,003	-0,000		
		-0,007	-0,004	-0,006	-0,006	-0,006	0,028	-0,002	-0,005	-0,005	-0,005	-0,004	0,000		
K		0,037	0,034	0,034	0,000	0,001	0,001	0,036	0,034	0,035	-0,000	0,001	-0,000		
		0,013	0,014	0,018	-0,006	-0,004	0,020	0,013	0,015	0,012	-0,007	-0,007	-0,006		
L		-0,007	-0,006	0,000	-0,006	-0,004	0,020	-0,006	-0,003	-0,006	-0,006	-0,006	-0,006		
		0,020	0,019	0,018	-0,000	0,000	0,000	0,019	0,018	0,018	-0,001	-0,001	0,000		

**Abbildung 28: Titration des Fangantikörpers**

mAB MT17.1 wurde in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml eingesetzt.

Für jede Titrationsstufe wurde der IFN- $\gamma$ -Standard separat untersucht.

A 1: Anästhesie von Rotwild Nr. 1

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass es unter Einsatz des mAB MT17.1 in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml im Vergleich zu dessen Verwendung bei 2  $\mu$ g/ml zu einer Steigerung der OD-Werte der einzelnen Plasmaproben kommt. Wird die Konzentration hingegen weiter erhöht (5  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml) erfolgt kein signifikanter Anstieg der optischen Dichte. Lediglich im unverdünnten Zustand des Plasmas konnte unter Verwendung des Antikörpers in 5  $\mu$ g/ml eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Freisetzung gemessen werden, welche in den weiteren Verdünnungsstufen allerdings nicht mehr festzustellen war. Im Anschluss wurden die genauen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in den einzelnen Verdünnungsstufen anhand des eingesetzten IFN- $\gamma$ -Standards und den für diesen erzielten OD-Werte im ELISA berechnet (Tabelle 9). Daraus wird ersichtlich, dass es ab einer Konzentration des Fangantikörpers von 2  $\mu$ g/ml zu keiner signifikanten Erhöhung bezüglich der IFN- $\gamma$ -Messung kommt. Somit wurden die maximalen OD-Werte bzw. IFN- $\gamma$ -Konzentrationen bei Untersuchung der Plasmaproben unter Einsatz des

Antikörpers bei einer minimalen Konzentration von 2 µg/ml erzielt, was seiner Verwendung für die Messung von freigesetztem IFN- $\gamma$  in Rinderplasma entspricht und vom Herstellerprotokoll des Kits empfohlen wird. Das heißt, bezüglich der Untersuchung von Rotwildplasma kann der Fangantikörper (mAB MT17.1) weiterhin in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet werden.

**Tabelle 9: Titration des Fangantikörpers mAB MT17.1 gegen bovines IFN- $\gamma$**

Fangantikörper gegen bovines IFN- $\gamma$ mAB MT17.1 Konzentration in µg/ml:	Verdünnungsstufen Plasma			
	unverdünnt	1:5	1:25	1:125
1	1 457	397	98	20
2	1 506	446	107	22
5	2 309	469	108	23
10	2 246	456	108	23

Mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml), gemessen für unterschiedliche Konzentrationen des Fangantikörpers gegen bovines IFN- $\gamma$  und für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben von anästhesiertem Rotwild.

Im Anschluss wurde eine Titration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin) nach selbigem Prinzip durchgeführt (siehe Abschnitt III, 4.2). Der Einsatz erfolgte dabei in den Konzentrationen: 0,05 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1,25 µg/ml und 6,25 µg/ml bei gleichbleibender Konzentration von mAB MT17.1 (2 µg/ml). Die Plattenbelegung wurde nach dem Prinzip der Titration des Fangantikörpers (siehe Tabelle 6), nur unter Verwendung des

Detektionsantikörpers in genannten Konzentrationen, durchgeführt. Die dabei gemessenen Werte für die optische Dichte, welche als Maßstab für die IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Plasmaproben von Rotwild gelten, können den Abbildungen 29 und 30 entnommen werden.

	IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT307-biotin = 0,05 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT307-biotin = 0,05 $\mu$ g/ml			IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT307-biotin = 0,25 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT307-biotin = 0,25 $\mu$ g/ml			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1,047	1,008	1,025	2,986	3,140	3,114	1,261	1,349	1,335	3,306	3,271	3,354	Endpoint
	0,001	0,002	0,003	0,019	0,017	0,017	0,005	0,006	0,035	0,022	0,017	0,020	Lm1 450
B	1,047	1,006	1,021	2,967	3,123	3,097	1,257	1,343	1,300	3,284	3,254	3,334	Lm2 650
	0,894	0,904	0,933	1,265	1,467	1,447	1,114	1,107	1,115	1,824	1,815	1,851	Automix: Off
C	0,011	0,013	0,011	0,018	0,007	0,006	0,006	0,004	0,004	0,008	0,009	0,016	Calibrate: On
	0,883	0,891	0,922	1,247	1,460	1,442	1,108	1,103	1,112	1,816	1,806	1,834	Column Priority
D	0,493	0,459	0,464	0,265	0,320	0,331	0,614	0,614	0,622	0,489	0,464	0,472	C. Speed: Normal
	-0,002	0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	0,025	0,006	0,001	0,002	0,001	-0,000	Start Read:
E	0,495	0,457	0,465	0,267	0,322	0,333	0,590	0,608	0,620	0,487	0,463	0,473	14:44 23.11.2016
	0,246	0,241	0,244	0,051	0,069	0,057	0,333	0,331	0,334	0,103	0,104	0,101	
F	-0,004	0,001	-0,000	-0,005	-0,004	-0,004	0,008	-0,002	0,001	-0,001	-0,001	-0,003	
	0,251	0,240	0,244	0,056	0,074	0,062	0,326	0,333	0,333	0,104	0,104	0,104	
G	0,137	0,141	0,141	0,000	-0,000	-0,001	0,174	0,177	0,180	0,043	0,021	0,041	
	-0,005	-0,003	-0,002	-0,002	-0,004	-0,004	-0,002	-0,003	-0,001	-0,004	-0,004	0,008	
H	0,142	0,144	0,143	0,003	0,004	0,003	0,176	0,180	0,182	0,047	0,025	0,033	
	0,077	0,067	0,058	-0,013	-0,013	-0,013	0,097	0,095	0,104	0,010	0,011	0,013	
I	0,005	-0,001	-0,004	-0,005	-0,005	-0,005	-0,001	-0,002	-0,004	-0,004	-0,002	-0,004	
	0,072	0,068	0,062	-0,008	-0,008	-0,009	0,098	0,097	0,108	0,014	0,012	0,017	
J	0,040	0,030	0,030	-0,013	-0,016	-0,007	0,061	0,071	0,058	0,004	0,005	0,005	
	0,015	-0,001	-0,004	-0,005	-0,005	0,004	-0,004	-0,002	-0,004	-0,004	-0,004	-0,004	
K	0,025	0,031	0,035	-0,009	-0,011	-0,011	0,065	0,073	0,062	0,009	0,009	0,009	
	0,008	0,008	0,006	-0,015	-0,017	-0,016	0,039	0,034	0,039	0,045	0,012	0,012	
L	-0,006	-0,005	-0,005	-0,005	-0,005	-0,005	-0,004	-0,004	-0,001	0,034	0,003	-0,004	
	0,013	0,013	0,012	-0,010	-0,011	-0,012	0,043	0,039	0,040	0,011	0,009	0,016	

**Abbildung 29: Titration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin)**

mAB MT307-biotin wurde in einer Konzentration von 0,05  $\mu$ g/ml und 0,25  $\mu$ g/ml eingesetzt. Für jede Titrationsstufe wurde der IFN- $\gamma$ -Standard separat untersucht.

A 1: Anästhesie von Rotwild Nr. 1

IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT307-biotin = 1,25 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT307-biotin = 1,25 $\mu$ g/ml			IFN- $\gamma$ Standard, mAB MT307-biotin = 6,25 $\mu$ g/ml			Rotwild A 1; mAB MT307-biotin = 6,25 $\mu$ g/ml				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0,815	0,828	0,837	3,231	3,228	3,222	0,958	0,982	0,940	3,257	3,249	3,054	Endpoint
	0,007	0,002	0,003	0,020	0,024	0,023	0,003	0,004	0,003	0,020	0,021	0,018	Lm1 450
	0,808	0,825	0,834	3,212	3,204	3,199	0,954	0,978	0,937	3,238	3,228	3,036	Lm2 650
B	0,958	0,981	0,986	1,707	1,701	1,671	1,083	1,073	1,109	1,884	1,868	1,909	Automix: Off
	0,009	0,006	0,006	0,009	0,009	0,009	0,008	0,011	0,005	0,011	0,011	0,012	Calibrate: On
	0,949	0,976	0,979	1,698	1,693	1,663	1,075	1,062	1,104	1,873	1,858	1,897	Column Priority
C	0,472	0,480	0,465	0,363	0,354	0,342	0,618	0,620	0,608	0,554	0,564	0,570	C. Speed: Normal
	-0,001	0,001	0,000	-0,001	-0,001	-0,001	0,000	0,007	0,001	0,001	0,001	0,001	Start Read:
	0,473	0,480	0,465	0,364	0,355	0,343	0,618	0,613	0,607	0,553	0,563	0,569	14:57 23.11.2016
D	0,198	0,202	0,196	-0,010	0,004	0,007	0,367	0,346	0,345	0,152	0,173	0,156	
	-0,002	-0,002	-0,001	-0,004	-0,002	0,007	0,001	0,002	-0,001	-0,002	0,000	-0,002	
	0,199	0,204	0,197	-0,006	0,005	-0,001	0,366	0,344	0,346	0,154	0,173	0,158	
E	0,061	0,061	0,066	-0,072	-0,064	-0,070	0,224	0,211	0,208	0,076	0,088	0,087	
	-0,005	-0,003	-0,002	-0,003	-0,003	-0,003	-0,001	-0,001	-0,001	-0,003	-0,002	-0,002	
	0,065	0,064	0,068	-0,068	-0,061	-0,067	0,225	0,213	0,209	0,079	0,089	0,089	
F	-0,005	-0,006	0,006	-0,079	-0,077	-0,074	0,142	0,133	0,161	0,060	0,074	0,067	
	-0,004	-0,004	-0,001	-0,004	-0,004	-0,004	0,002	-0,001	0,005	0,000	0,006	-0,003	
	-0,000	-0,002	0,007	-0,075	-0,073	-0,070	0,141	0,134	0,156	0,059	0,068	0,070	
G	-0,031	-0,035	-0,037	-0,066	-0,070	-0,068	0,126	0,106	0,103	0,069	0,067	0,065	
	-0,003	-0,003	-0,003	-0,004	-0,004	-0,004	0,032	-0,003	-0,002	0,003	-0,001	0,003	
	-0,028	-0,032	-0,034	-0,062	-0,066	-0,064	0,094	0,109	0,105	0,065	0,068	0,062	
H	-0,053	-0,047	-0,049	-0,071	-0,071	-0,047	0,099	0,079	0,080	0,062	0,062	0,069	
	-0,005	-0,003	-0,003	-0,005	-0,004	0,019	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	0,002	
	-0,048	-0,044	-0,046	-0,067	-0,067	-0,066	0,103	0,083	0,083	0,065	0,066	0,066	

**Abbildung 30: Titration des Detektionsantikörpers (mAB MT307-biotin)**

mAB MT307-biotin wurde in einer Konzentration von 1,25  $\mu$ g/ml und 6,25  $\mu$ g/ml eingesetzt. Für jede Titrationsstufe wurde der IFN- $\gamma$ -Standard separat untersucht.

A 1: Anästhesie von Rotwild Nr. 1

Die Ergebnisse zeigen, dass es wie im Falle des Fangantikörpers zunächst zu einer Steigerung der OD-Werte hinsichtlich der IFN- $\gamma$ -Freisetzung aus den Plasmaproben gekommen ist. So ist dies bei der Verwendung von mAB MT307-biotin in einer Konzentration von 0,25  $\mu$ g/ml im Vergleich zu einer Konzentration von 0,05  $\mu$ g/ml ersichtlich. Höhere Konzentrationen führten in Folge zu keiner weiteren Erhöhung der optischen Dichte. Wie für den Fangantikörper beschrieben, kam es unter Verwendung noch höherer Konzentrationen des Detektionsantikörpers lediglich im unverdünnten Zustand des Plasmas zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Messung, welche in weiteren Verdünnungsstufen ausblieb. Selbiges wird unter Betrachtung der errechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen für die einzelnen Verdünnungsstufen des Plasmas deutlich (Tabelle 10). Demzufolge werden maximale OD-Werte bzw. IFN- $\gamma$ -Konzentrationen, welche maßgeblich für die IFN- $\gamma$ -Freisetzung sind, bei einer Konzentration von mAB MT307-biotin von 0,25  $\mu$ g/ml erreicht. Somit kann auch in diesem Fall die

bisher eingesetzte Konzentration des Detektionsantikörpers verwendet werden und eine Änderung des bestehenden Protokolls (siehe Abschnitt III, 4.1) ist für die Untersuchung von Rotwildplasma nicht notwendig.

**Tabelle 10: Titration des Detektionsantikörpers mAB MT307-biotin gegen bovines IFN- $\gamma$**

<b>Detektionsantikörper</b> <b>gegen bovines IFN-<math>\gamma</math></b> <b>mAB MT307-biotin</b> <b>Konzentration in <math>\mu\text{g/ml}</math>:</b>	<b>Verdünnungsstufen Plasma</b>			
	<b>unverdünnt</b>	<b>1:5</b>	<b>1:25</b>	<b>1:125</b>
<b>0.05</b>	1 501	384	82	17
<b>0.25</b>	1 266	410	97	20
<b>1.25</b>	1 954	434	94	0
<b>6.25</b>	1 650	434	115	29

Mittlere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml), gemessen für unterschiedliche Konzentrationen des Detektionsantikörpers gegen bovines IFN- $\gamma$  und für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben von anästhesiertem Rotwild.

Eine graphische Darstellung der unterschiedlichen Konzentrationen an freigesetztem IFN- $\gamma$  unter Verwendung des Fangantikörpers sowie des Detektionsantikörpers in unterschiedlichen Konzentrationen befindet sich im Abschnitt V, Abbildung 31 und 32.

#### 4 Statistische Analyse

Die Medianwerte der optischen Dichte, die für beide Zeitpunkte der Blutabnahme bei den Rindern verglichen wurden, waren während der Narkose leicht erhöht gegenüber den Werten für vor der Narkose. Mit dem Wilcoxon Signed Rank Test wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Freisetzung an IFN- $\gamma$  vor und während der Narkose besteht. Demzufolge resultierte der Test in diesem Fall aufgrund der erhöhten Werte während der Narkose in einem statistisch, signifikanten Unterschied (Tabelle 11;  $0,002 \leq p < 0,02$ ).

**Tabelle 11: Wilcoxon Signed Rank Test**

<b>Verdünnungsstufen</b>	<b>Median (12 Proben) vor der Narkose</b>	<b>Median (12 Proben) 10 Minuten in Anästhesie</b>	<b>p</b>
<b>unverdünnt</b>	M <sub>12</sub> = 3,50	M <sub>12</sub> = 3,64	<i>p</i> = 0,016
<b>1:5</b>	2,90	3,59	<i>p</i> = 0,009
<b>1:25</b>	1,09	2,57	<i>p</i> = 0,002
<b>1:125</b>	0,25	0,74	<i>p</i> = 0,007
<b>1:625</b>	0,05	0,16	<i>p</i> = 0,012
<b>1:3125</b>	0,01	0,03	<i>p</i> = 0,176

Die Median-Werte wurden für die unterschiedlichen Verdünnungsstufen zu beiden Zeitpunkten der Blutabnahme berechnet und beinhalten die mittleren OD-Werte von den zwölf Tieren der Studie. *p* = statistischer Unterschied

## V DISKUSSION

Infolge von Infektionen mit intrazellulären Erregern erfolgt eine Aktivierung der Immunantwort, die primär von T-Zellen geprägt ist (KAUFMANN, 1993). Durch Aufnahme des Erregers von phagozytierenden Zellen produzieren diese IL-12, welches unter anderem zur Differenzierung naiver T-Zellen in Th1-Zellen führt (TRINCHIERI, 1995; ROMAGNANI, 1997; SAKAMOTO, 2012). Die Zelltypen, auf die IL-12 biologische Aktivität ausübt, sind T-Zellen sowie Natürliche Killerzellen, deren Hauptfunktion in der Produktion von Zytokinen, vor allem von IFN- $\gamma$ , besteht (MARCUCCI et al., 1981; FARRAR & SCHREIBER, 1993; TRINCHIERI, 1995). Nach Stimulation lymphoider Zellen mit spezifischen Antigenen und T-Zell Mitogenen, wie Pokeweed Mitogen, Concanavalin A oder Phytohaemagglutinin produzieren bereits sensibilisierte oder unspezifisch stimulierte T-Zellen IFN- $\gamma$  (MARCUCCI et al., 1981; KIRCHNER et al., 1982). Im Falle einer Infektion mit intrazellulären Erregern, wie z. B. pathogenen Mykobakterien, spielt die beschriebene Aktivierung von Th1-Zellen und eine nachfolgende Sezernierung von IFN- $\gamma$  eine prägnante Rolle in der Immunantwort. Im Zuge der Infektion entwickeln sich zusätzlich sogenannte sensibilisierte T-Gedächtniszellen, die im Falle einer Reinfektion bzw. Stimulation mit spezifischen Antigenen unmittelbar zur IFN- $\gamma$ -Produktion aktiviert werden. Eine Tatsache, worauf diagnostische Methoden, wie der IFN- $\gamma$  release assay im Falle der Tuberkulose (TB) basieren (WOOD & JONES, 2001; MURPHY et al., 2009; PAI et al., 2014). Bezüglich der TB besteht eine respektable Gefahr einer Übertragung der Infektion auf Rinder seitens verschiedener Wildtiere und die Rind-Rotwild-Achse spielt eine herausragende Rolle in der Übertragung und Verbreitung der Infektion (HARDSTAFF et al., 2014). Aktuelle Entwicklungen zeigen, dass das Rotwild in Deutschland zunehmend an Bedeutung in der Rolle als Überträger der TB gewinnt. Speziell in den alpinen Regionen wurden Infektionen, verursacht durch *M. caprae* sowohl beim Rind als auch beim Rotwild detektiert und eine Übertragung des Pathogens zwischen beiden Spezies konnte bewiesen werden. Darüber hinaus wurde das Rotwild in entsprechenden Gebieten offiziell als Reservoir von *M. caprae* definiert (FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015).

Um einer weiteren Übertragung und damit Ausbreitung der Tuberkulose entgegen wirken zu können, ist eine frühzeitige und adäquate Diagnose infizierter Rotwild-Tiere ante mortem gefordert. Generell stellt die Diagnose der Tuberkulose aufgrund der langen Inkubationszeit, der meist fehlenden klinischen Anzeichen und der sich nur langsam im Krankheitsverlauf entwickelnden pathologischen Veränderungen eine Herausforderung dar. Bis dato ist die post mortem Untersuchung der Schlachtkörper beim Rotwild die einzige Möglichkeit TB-verdächtige Läsionen auszumachen, wobei eine sichere Identifizierung aller TB-positiven Tiere dadurch nicht gewährleistet ist (GERSTMAIR, 2011). TB-Kontrollprogramme bei Wildtieren stützten sich in unterschiedlichen Ländern auf eine Kombination von Schlachttieruntersuchung und Intrakutantest (WATERS et al., 2008). Allerdings erfordert der Intrakutantest bezüglich der Anwendung in Wildtierpopulationen eine zumindest zweifache Manipulation der Tiere. Des Weiteren konnten Kreuzreaktivitäten mit anderen, nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) identifiziert werden (HARRINGTON et al., 2008). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung alternativer, ante mortem Diagnostikmethoden für Wildtiere, im Speziellen für das Rotwild. Der Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) release assay hat sich hinsichtlich der Detektion der Tuberkulose bei verschiedenen Spezies bewährt (WOOD et al., 1992; PALMER et al., 2004; WATERS et al., 2006; WATERS et al., 2008).

Die Anwendung eines solchen Tests erfordert die einmalige Gewinnung von Blutproben und in Anbetracht der Durchführung bei Wildtieren, deren einmalige Immobilisation (WATERS et al., 2006). Im Hinblick auf die zukünftige Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays für die ante mortem TB Diagnostik innerhalb von Rotwild-Populationen, war es zunächst Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob angewandte Narkotika einen Einfluss auf die Vitalität von Leukozyten als primäre Produzenten von IFN- $\gamma$  haben und ob entsprechend eine Anästhesie Einfluss auf die Ergebnisse und Interpretation eines IFN- $\gamma$  release assays hat. Im Anschluss wurde die Anwendbarkeit eines etablierten, bovinen IFN- $\gamma$  release assays für die Untersuchung von Rotwildblut auf cervides IFN- $\gamma$ , geprüft.

## **1 Einfluss einer Narkose auf die Vitalität von Rinderleukozyten**

Als ante mortem Diagnostikmethoden der bovinen Tuberkulose stehen der Intrakutantest sowie der IFN- $\gamma$  release assay zur Verfügung (FLI, 2016b). Hinsichtlich der Anwendung dieser Tests in Wildtierpopulationen ist eine Immobilisation der Tiere unumgänglich. Aufgrund der lediglich einmaligen Manipulation des Tieres zur notwendigen Blutentnahme für den IFN- $\gamma$  release assay ist diese Methode dem Intrakutantest in der Anwendung bei Wildtieren vorzuziehen. Für die Durchführung des IFN- $\gamma$  release assays ist die Vitalität peripherer Blutleukozyten essentielle Voraussetzung, da diese die IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen darstellen (WOOD et al., 1990; WOOD & JONES, 2001; WATERS et al., 2006). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine Beeinflussung immunologischer Funktionen durch eine Anästhesie stattfinden kann (BRAND et al., 1998; KUROSAWA & KATO, 2008). Daher war es zunächst das primäre Ziel, zu überprüfen, ob in der Anästhesie angewandte Narkotika einen Einfluss auf Leukozyten und die damit verbundene IFN- $\gamma$ -Produktion und demzufolge die Ergebnisse des IFN- $\gamma$ -ELISA haben. Demzufolge wurde die IFN- $\gamma$ -Freisetzung in Blut von insgesamt zwölf Rindern jeweils vor und zehn Minuten in Anästhesie mit einem bovinen IFN- $\gamma$  release assay untersucht. Da eine Immobilisation von Wildtieren intramuskulär erfolgt und für Ketamin und Xylazin infolge dieser Applikationsform ein Wirkungseintritt nach bis zu zehn Minuten beschrieben ist, wurde dieses Zeitfenster für die Blutentnahme gewählt (CLINIPHARM; CLINIPHARM; TOLKSDORF, 1988). Dabei wurden in dem Zeitraum zwischen Blutabnahme bis hin zur weiteren Bearbeitung stets standardisierte Bedingungen, gestützt auf Vorgaben eines, bereits etablierten IFN- $\gamma$  release assays (Bovigam®) zur Untersuchung von Rinderblut eingehalten (Styroporbox mit, auf 37 °C temperierten Wärmeakkus; Temperaturlogger). Aufgrund eines möglichen Einflusses einer Infektion beziehungsweise einer Immunsuppression auf die Anzahl zirkulierender Leukozyten (MISHLER & EMERSON, 1977) und dadurch auf eine eventuell verminderte IFN- $\gamma$ -Freisetzung sowie Produktion (SAUER et al., 1995), waren Fieber und eine Vorbehandlung mit Corticosteroiden Ausschlusskriterien für untersuchte Tiere in dieser Studie. Die einzelnen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen wurden anhand der im ELISA erhaltenen OD-Werte und der Spanne des IFN- $\gamma$ -Standards vom Kit berechnet.

Wie in Abschnitt IV, 2. dargestellt, resultierten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in nahezu gleichen Ergebnissen für beide Zeitpunkte oder waren während der Narkose geringfügig höher. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass durch Einsatz der genannten Narkotika eine Anästhesie keinen negativen Einfluss auf die Leukozytenvitalität und deren Aktivität nimmt und keine verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion zu verzeichnen ist. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eingesetzte Narkotika im Zuge der Immobilisation von Wildtieren, insbesondere von Rotwild zur Gewinnung von Blutproben die Ergebnisse des IFN- $\gamma$  release assays negativ beeinträchtigen.

Um unsere Hypothese zu bestätigen, dass eine Anästhesie und die dafür eingesetzten Narkotika keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Leukozyten nehmen, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Mit dem Wilcoxon Signed Rank Test kann untersucht werden, ob sich zwei Variablen statistisch voneinander unterscheiden. Entsprechend unserer Studie waren diese beiden Variablen die Medianen aus den OD-Werten für alle Kälbernarkosen vor beziehungsweise während der Anästhesie. Wie in Abschnitt IV, 4. ersichtlich, ergab der Test für alle in die Statistik miteinbezogenen Verdünnungsstufen (unverdünnt bis zu einer Verdünnung von 1:125) einen signifikanten Unterschied, welcher jedoch minimal war ( $0,002 \leq p \leq 0,02$ ). Ursächlich für eine solch geringfügige Diskrepanz waren die, während der Narkose verzeichneten, erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen. Obwohl ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war, ist dieser nicht als negativer Aspekt zu werten, zumal erhöhte Werte während der Narkose gleichzeitig für eine gesteigerte Leukozytenvitalität bzw. -aktivität sprechen und sich dadurch ein positiver Einfluss der angewandten Narkotika auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch Leukozyten ergibt.

## **2 Mögliche Auswirkungen verschiedener Anästhesien auf die Zellen des Immunsystems**

Eine Inhibierung von Leukozyten und deren Fähigkeit IFN- $\gamma$  freizusetzen konnte im Zusammenhang mit einer Immobilisation von Wiederkäuern unter Einsatz der genannten Kombinationsanästhesie ausgeschlossen werden. Zahlreiche Studien beschreiben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Auswirkung verschiedenster Anästhesiearten und Medikamente für unterschiedliche Spezies. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der durchgeführten Untersuchung, einen

möglichen Einfluss eingesetzter Narkotika im Zuge der Immobilisation von Rotwild als Wildwiederkäuer im Vorfeld der Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays für diese Spezies zu überprüfen. Eine quantitativ aussagekräftige Freisetzung von IFN- $\gamma$  kann nur im Falle des Erhalts der Vitalität entsprechender IFN- $\gamma$ -produzierender Immunzellen sichergestellt werden. Eine Studie mit Hunden konnte eine Suppression der Leukozytenanzahl infolge einer Anästhesie bestätigen (FELSBURG et al., 1986). Demgegenüber wird in anderen Arbeiten ein derartiger Einfluss von, z. B. Ketamin oder Propofol, auf Leukozyten beim Schwein als nicht signifikant dargelegt (GEIST, 2006). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung eines möglichen Einflusses einer Kombinationsanästhesie, bestehend aus Ketamin und Xylazin, auf Lymphozyten im Blut von Wiederkäuern. Infolge von Blutuntersuchungen bei Greyhounds konnten für die genannten, pharmakologisch wirksamen Stoffe ein Einfluss auf hämatologische Zellen ausgeschlossen werden (CAMKERTEN et al., 2013). Für Xylazin, welches in diesem Projekt Bestandteil zur Immobilisierung von Rindern und Rotwild war, beschreibt eine Arbeit von Presidente und Kollegen eine unveränderte Leukozytenzahl nach Anwendung bei Weißwedelhirschen, wodurch ein negativer Einfluss von Xylazin auf entsprechende Blutzellen dieser Wildtierart ausgeschlossen wurde (PRESIDENTE et al., 1973). Dies bekräftigt unter anderem die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in welcher ebenfalls Xylazin, allerdings in Kombination mit Ketamin, als Anästhesie eingesetzt wurde. Zahlreiche Daten aus verschiedenen Studien bestätigen eine geringere Immunsuppression infolge einer Kombinationsanästhesie per injectionem anstelle einer Inhalationsanästhesie und untermauern das Ergebnis unserer Studie, dass die hier verwendete Narkose keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Leukozyten in Blut von Wiederkäuern hat.

### **3 Anwendbarkeit des bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kit mit Rotwildblut**

Basierend auf den Erkenntnissen des ersten Teils unserer Studie, wurde die Funktionalität des verwendeten bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA mit Rotwildblutproben untersucht. Es sollte dahingehend die Möglichkeit überprüft werden, ob mit selbigem ELISA cervides IFN- $\gamma$  in den Proben gemessen werden kann. Demzufolge wurde eine mögliche Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern des Kits gegen bovines IFN- $\gamma$  und cervidem IFN- $\gamma$  überprüft. Rotwildblutproben wurden von zwei anästhesierten Tieren während einer regulären Screeninguntersuchung gewonnen

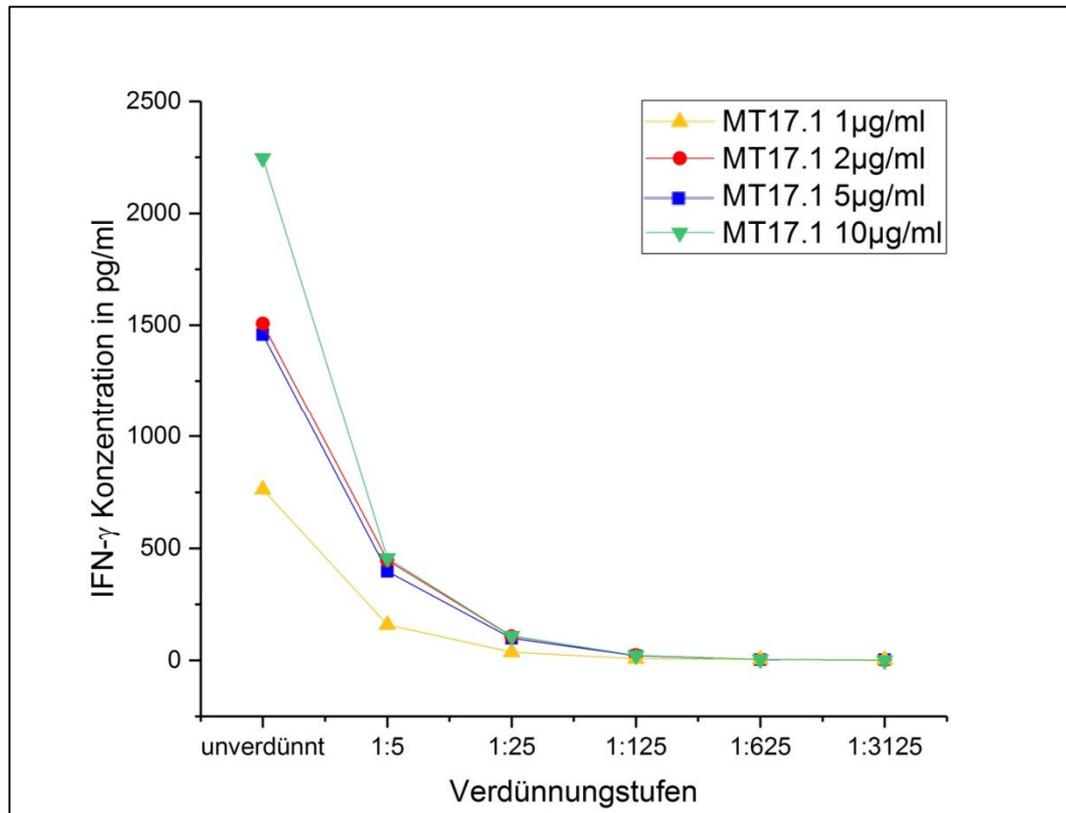
und unter genannten standardisierten Bedingungen transportiert und weiterbehandelt (siehe Abschnitt III, 1).

Wie in Abschnitt III, 1.2 dargestellt, bestand die Anästhesie zur Immobilisation der Tiere aus einer Mischung von Xylazin und Ketamin. Diese Kombinationsanästhesie hat sich bezüglich der Immobilisation von Wildtieren und im Speziellen auch von Rotwild bewährt (WIESNER, 1982; ABDERHALDEN et al., 1998). Aufgrund der Verwendung der gleichen Narkotika wie bei den Rindernarkosen, war eine Vergleichbarkeit der Anästhesien bei beiden Spezies gegeben und eine Übertragung der Ergebnisse aus Abschnitt IV, 2 von den Rindern auf das Rotwild möglich. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die angewandten Narkotika keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse des IFN- $\gamma$  release assays beim Wildtier, im Speziellen beim Rotwild, haben.

Die Untersuchung der Blutproben der beiden immobilisierten Tiere mit dem regulären bovinen ELISA resultierte in einer unproblematischen IFN- $\gamma$ -Detektion (siehe Abschnitt IV, 3.1). Es konnte somit eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern des Kits zur Detektion von bovinem IFN- $\gamma$  mit cervidem IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Ferner konnten im unverdünnten Zustand sowie in einer Verdünnung von 1:5 der Plasmaproben sogar vergleichbare Werte zu denen bei der Untersuchung von Rinderblut gemessen werden (vergleiche Abschnitt IV, 2 (Tabelle 7) und Abschnitt IV, 3.1 (Tabelle 8)). Eine zunehmende Verdünnung resultierte in einem abnehmenden Signal im ELISA. Mit dem bovinen IFN- $\gamma$  release assay ist eine Detektion von IFN- $\gamma$  in Blutplasma von Rotwild im unverdünnten Zustand bzw. in geringer Verdünnung sehr gut möglich. Aufgrund der großen Plasmamenge, welche aus einer einzelnen Blutprobe gewonnen werden kann, ist eine mehrfache Wiederholung des Tests möglich. Die Werte für die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen bei der Untersuchung von Rotwildplasma konnten nicht exakt in dem hohen Ausmaß, wie bei der Untersuchung von Rinderplasma erreicht werden. Diese Tatsache und die festgestellte gute Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern gegen bovines IFN- $\gamma$  mit cervidem IFN- $\gamma$  lassen darauf schließen, dass bovines und cervides IFN- $\gamma$  sich in ihrer Struktur ähneln, jedoch nicht exakt identisch sind. Letztendlich erwies sich der kommerziell erhältliche Kit zur Detektion von bovinem IFN- $\gamma$  als geeignet für die Untersuchung von Rotwildblut und somit dem Nachweis von cervidem IFN- $\gamma$ . Kommerziell erhältliche Tests zur Detektion von bovinem IFN- $\gamma$  in Rinderblut wurden bereits früher auf eine

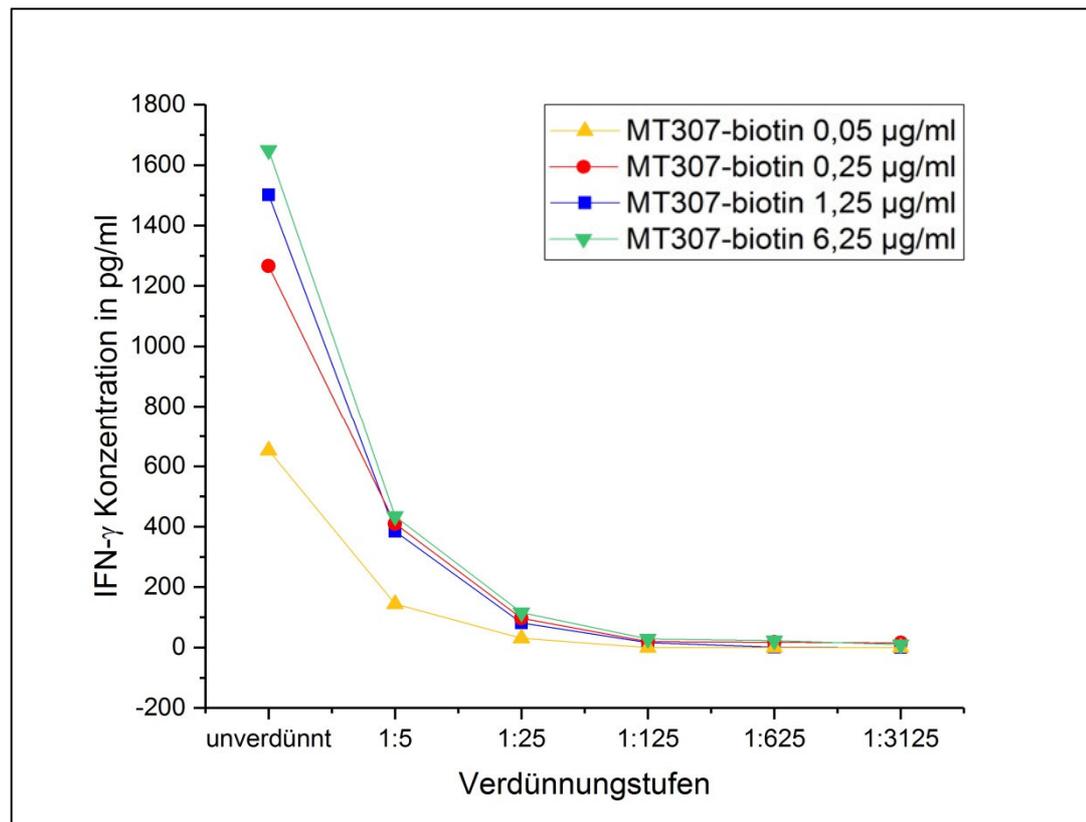
entsprechende Kreuzreaktivität und die Möglichkeit IFN- $\gamma$  aus Rotwildblut messen zu können überprüft, was allerdings ohne Erfolg blieb (ROTHEL et al., 1990).

Um eine optimale Messung des cerviden IFN- $\gamma$  mittels bovinen Kit gewährleisten zu können, wurde eine Titration der Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$  durchgeführt. Dadurch konnte eine maximale Kapazität der Detektion an freigesetztem IFN- $\gamma$  aus Rotwildplasma unter Einsatz einer minimalen Antikörperkonzentration ermittelt werden. Für die Untersuchung von Plasma aus Rinderblut wird der Fangantikörper des bovinen ELISA (mAB MT17.1) laut Protokoll des Herstellers in einer Konzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$ , der Detektionsantikörper (mAB MT307-biotin) in einer Konzentration von 0,25  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Nach Titration beider Antikörper während der Untersuchung von Rotwildplasma, wurden auch dabei die besten Werte für oben genannte Konzentrationen von mAB MT17.1 und mAB MT307-biotin erzielt (vergleiche Abschnitt IV, 3.3). Somit ist für die Verwendung des bovinen IFN- $\gamma$ -ELISA Development Kits zur Untersuchung von Rotwildblutproben keine weiterführende Optimierung des bestehenden Protokolls vorzunehmen. Die Graphen der Abbildungen 31 und 32 zeigen deutlich, dass darunter liegende Konzentrationen zu einer verringerten IFN- $\gamma$ -Detektion führten, wohingegen ab dem Einsatz der Antikörper nach Herstellerprotokoll keine gravierende Steigerung mehr zu verzeichnen war. Lediglich im unverdünnten Zustand der Plasmaproben konnte vor allem bei mABMT17.1 mit einer Erhöhung der Antikörperkonzentration auch eine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Konzentration gemessen werden. Allerdings war die Konzentration von mAB MT17.1 in diesem Fall um ein Fünffaches erhöht und ein gesteigerter IFN- $\gamma$ -Wert nur im unverdünnten Zustand der Proben zu verzeichnen. Der Mehrkostenfaktor, welcher bei Verwendung eines so hoch konzentrierten mAB MT17.1 entstehen würde und die durchwegs stabilen Werte für alle anderen Verdünnungsstufen, sprechen für den Einsatz beider Antikörper in bereits protokollierten Konzentrationen.



**Abbildung 31: Titration des Fangantikörpers mAB MT17.1 gegen bovines IFN- $\gamma$  unter Verwendung von Plasma eines narkotisierten Rotwilds im IFN- $\gamma$  release assay**

Infolge der Beschichtung einer ELISA-Platte mit unterschiedlichen Konzentrationen des mAB MT17.1 wurden gemessene IFN- $\gamma$  Konzentrationen für unterschiedliche Verdünnungsstufen aufgetragen. Stabile Werte werden ab einer minimalen Konzentration von 2  $\mu$ g/ml erreicht. Höhere Konzentrationen lieferten keine prägnante Steigerung in der IFN- $\gamma$ -Detektion.



**Abbildung 32: Titration des Detektionsantikörpers mAB MT307-biotin gegen bovines IFN- $\gamma$  unter Verwendung von Plasma eines narkotisierten Rotwilds im IFN- $\gamma$  release assay**

mAB MT307-biotin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und gemessene IFN- $\gamma$ -Konzentrationen für unterschiedliche Verdünnungsstufen aufgetragen. Ab einer Konzentration von 0,25  $\mu\text{g/ml}$  wurden adäquate Werte erzielt. Eine bis zu 25-fache Erhöhung der Konzentration lieferte keine prägnante Steigerung in der IFN- $\gamma$ -Detektion.

Zusätzlich wurde die Möglichkeit der Durchführung des Tests mit Schlachttierblut vom Rotwild überprüft, um den ELISA ggf. auch als Screening-Methode für geschossene Tiere verwenden zu können. Die Blutentnahme eines durch Schuss erlegten Tieres konnte unter optimalen Bedingungen und in weniger als zwei Minuten gewährleistet werden. Nach Eintreten des Todes wurde die *V. Jugularis* umgehend freigelegt und Blut in heparinisierten Röhrchen aufgefangen (siehe Abschnitt III, 1.2). Trotz dieser geringen Zeitspanne war eine eintretende Koagulation des Blutes bereits visuell sichtbar. Aufgrund der unsterilen Bedingungen während der Probengewinnung war zudem eine Kontamination der

Proben durch beispielsweise die bakterielle Haut-Begleitflora wahrscheinlich und stellte sich nach der Stimulation und Inkubation der Blutproben als bestätigt heraus. Die IFN- $\gamma$ -Detektion lieferte, wie in Abschnitt IV, 3.1 dargestellt, zwar positive Werte, allerdings waren diese deutlich geringer als bei den anästhesierten Tieren (Vergleiche Tabelle 8, Abschnitt IV, 3.1). Letztendlich ist das Plasma von getöteten Tieren wahrscheinlich nicht von ausreichender Qualität, um zukünftig mit dem IFN- $\gamma$  release assay eine quantitativ adäquate Messung von vorhandenem IFN- $\gamma$  zu ermöglichen und würde bei einer Weiterentwicklung des Tests für dessen Anwendung in der TB-Diagnose von Rotwild vermutlich zu nicht aussagekräftigen Ergebnissen führen. Abbildung 25 im Abschnitt IV, 3.1 veranschaulicht die quantitativ deutlich höhere IFN- $\gamma$  Messung bei den anästhesierten Tieren im Vergleich zu dem Geschossenen.

## **4 Ausblick**

### **4.1 Validierung des Tests mit Plasma eines TB-positiven Rotwilds unter Einsatz verschiedener Peptidcocktails als Antigen-Stimulanzen**

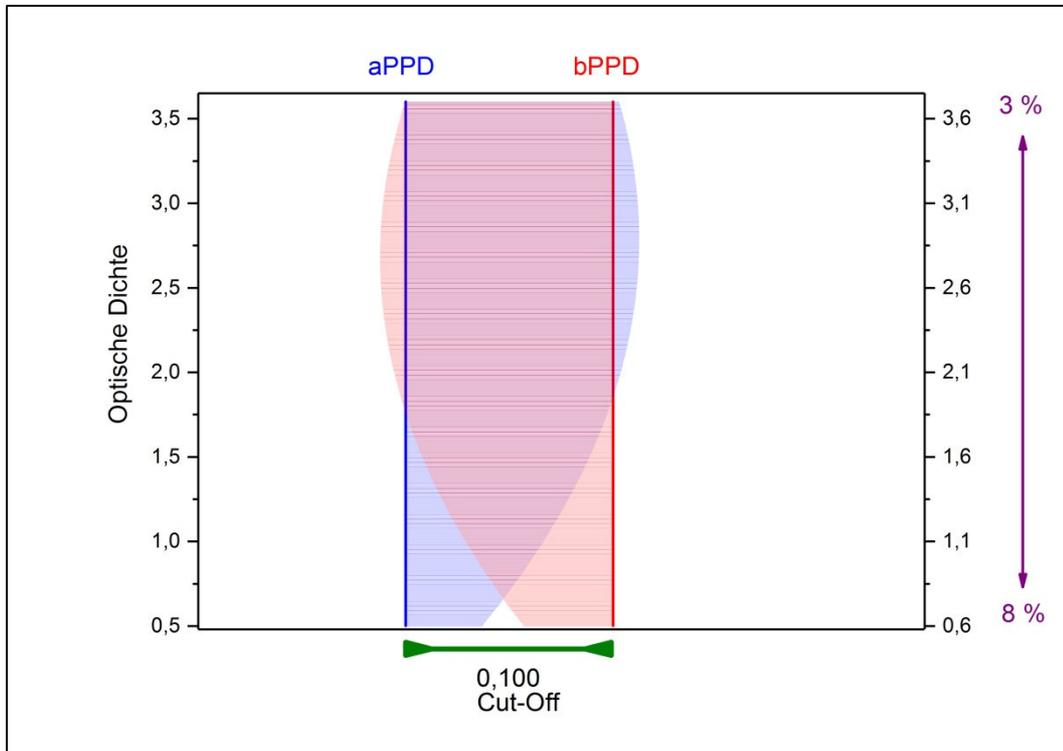
Aufgrund der beschriebenen Vorteile eines IFN- $\gamma$  release assays ist dieser dem Intrakutantest als alternative ante mortem Methode der TB-Diagnostik vorzuziehen. Wir konnten durch diese Studie zeigen, dass eine notwendige Manipulation und die dafür eingesetzten Narkotika keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von Leukozyten als primäre Quelle der IFN- $\gamma$ -Produktion haben und somit die Testergebnisse des IFN- $\gamma$  release assays nicht nachteilig beeinflussen. Die nachfolgend demonstrierte Kreuzreaktivität der Antikörper eines bereits etablierten und kommerziell beziehbaren bovinen IFN- $\gamma$  release assays mit cervidem IFN- $\gamma$  bestätigte die mögliche Anwendung des ELISAs zur Untersuchung von Rotwildblut. Daher konnte durch diese Arbeit der Grundstein für die zukünftige Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays zur TB-Diagnostik beim Rotwild gelegt werden. Bis zu dessen Einsatz in Monitoring- und Kontrollprogrammen bedarf es allerdings noch weiteren Entwicklungen. Bisher wurde in dieser Studie noch kein Blut von einem TB-positivem Rotwild untersucht und es bleibt die Frage offen, ob der Test für eine Anwendung im Feld geeignet ist und welche Auswertungskriterien für eine Diagnose der Tuberkulose festgelegt werden müssen. In Zusammenhang mit der Untersuchung von Blut eines TB-positiven Rotwilds sollten zusätzlich verschiedene Peptidcocktails auf ihre Spezifität, eine *M.-caprae*-Infektion

detektieren zu können, geprüft werden, um eine weitere Verbesserung zu erreichen. In Kooperation mit dem Bayerischen Jagdverband e.V. sollen Blutproben von TB-verdächtigen Tieren aus verschiedenen Wintergattern der Hotspot-Region „Allgäu“ gewonnen werden, um eine Anwendbarkeit des Testes im Feld zu bewerten und um die Nachweisgrenzen des Tests bei Mykobakterien-positiven Rotwild zu definieren. Dabei sollen verschiedene Peptidcocktails zur Stimulation des Rotwildblutes eingesetzt werden. Der kommerziell erhältliche und standardmäßige Test für Rinder, welcher auf dem Nachweis von IFN- $\gamma$  infolge einer bTB-Infektion basiert (Bovigam®), verwendet bPPD (*M. bovis* purified protein derivative) und aPPD (*M. avium* purified protein derivative) für die Stimulation sensibilisierter Leukozyten infolge einer vorangegangenen Infektion (WOOD & JONES, 2001). Hinsichtlich der PPDs konnten kürzlich weiterführende Errungenschaften gemacht werden. Peptidcocktails der neuen Generation, wie ESAT-6/CFP oder HP (PC-HP) erwiesen sich als geeignete Alternativen für den Nachweis einer TB-Infektion. Bezüglich der Detektion von *M. tuberculosis* konnte bei ihrem Einsatz sogar eine erhöhte Spezifität getestet werden, da sie nicht in BCG Substämmen sowie den meisten „nicht tuberkulösen Mykobakterien“ (NTM) vorkommen (PAI et al., 2014). In der Humanmedizin findet dieser neue Peptidcocktail, bestehend aus ESAT6/CFP bereits in der zweiten Generation der IFN- $\gamma$  release assays zum Nachweis einer Tuberkuloseinfektion beim Menschen Anwendung (QuantiFERON® TB Gold Plus). Des Weiteren konnte die Einsetzbarkeit dieses Cocktails zum Nachweis von *M. bovis* beim Rind positiv bestätigt werden (MENG et al., 2015). Wie bereits beschrieben, dominieren im Süden Deutschlands TB-Fälle basierend auf einer *M.-caprae*-Infektion. Die Mitglieder des MTC verfügen über eine sehr hohe genetische Ähnlichkeit (BÖDDINGHAUS et al., 1990; SREEVATSAN et al., 1997), wodurch basierend auf den positiven Testergebnissen in Zusammenhang mit *M. tuberculosis* und *M. bovis* selbiges für die Detektion einer *M.-caprae*-Infektion vermutet werden kann. Trotz allem muss diese Vermutung zunächst bestätigt werden. Gewonnene Rotwildblutproben eines TB-positiven Tieres sollten daher parallel mit den verschiedenen Peptidcocktails stimuliert und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

## 4.2 Festlegung adäquater Auswertkriterien

Bovine IFN- $\gamma$  release assays werden in vielen europäischen Ländern in bTB Eradikations-Programmen eingesetzt (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; SCHILLER et al., 2010; BASS et al., 2013). Dabei konnte, wie bereits beschrieben eine Kreuzreaktivität monoklonaler Antikörper gegen bovines IFN- $\gamma$  mit IFN- $\gamma$  von Schaf, Ziege und Büffel im Bovigam®-Test bestätigt werden, wohingegen eine Kreuzreaktivität mit IFN- $\gamma$  von Rotwild, Schwein und Mensch ausgeschlossen wurde (ROTHEL et al., 1990). In unserer Studie wurde eine solche Kreuzreaktivität von IFN- $\gamma$  aus Rotwildblut und den Antikörpern eines alternativen Kits zur IFN- $\gamma$ -Detektion in Rinderblut nachgewiesen. Das ermöglicht den Einsatz dieses ELISAs im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Tests, wie dem Bovigam® für die Messung von IFN- $\gamma$  im Blut von Rotwild. Die Detektion von IFN- $\gamma$  erfolgte dabei nach selbigem Prinzip wie im Bovigam®, mit Ausnahme einer Stimulation der T-Zellen durch ein synthetisches Stimulans (PWM) anstelle spezifischer Antigene. Es sollte in dieser Studie überprüft werden, ob generell eine Detektion von cervidem IFN- $\gamma$  mit dem verwendeten Kit möglich ist. Im Zuge der weiteren Entwicklung als diagnostisches Tool müssen die Schwächen bereits etablierter Tests, wie dem Bovigam®, hinsichtlich der Testinterpretation berücksichtigt werden. Während der kompletten Prozedur der Testdurchführung inklusive Blutgewinnung können zahlreiche Fehlerquellen, z. B. unvermeidbare Pipettierfehler auftreten, die in die Interpretation der Ergebnisse integriert werden müssen. In einer Studie, die Ergebnisse des Bovigam® aus insgesamt fünf verschiedenen Laboren verglich, kam es zu großen Abweichungen der Resultate infolge der Untersuchung einer Rinder-Kohorte bestehend aus 21 Tieren. Laut Herstellerprotokoll des Bovigam®, wird eine Probe als positiv gewertet, sobald die Differenz zwischen den OD-Werten von, mit aviärem (aPPD) und bovinem (bPPD) PPD stimuliertem Plasma größer als 0,1 ist (= Cut-Off). In Abbildung 33 wird deutlich, dass selbst bei einer realistischen Fehlerrate von 3% – 8%, die schon aus leichten Pipettierfehlern resultieren kann, keine eindeutige Diskriminierung zwischen den Reaktionen auf aPPD bzw. bPPD mehr möglich ist. Ein Cut-Off von 0,2 lässt hingegen eine deutlich bessere Unterscheidung zu (Abbildung 34); (PUCKEN et al., 2017). Für die nachfolgende Entwicklung des IFN- $\gamma$  release assays unserer Studie als diagnostisches Mittel für das Rotwild ist die Beachtung derartiger Fehlerquellen essentiell und eine Einbeziehung dieser in die Testauswertung notwendig. Unter Berücksichtigung solcher Faktoren, die ein

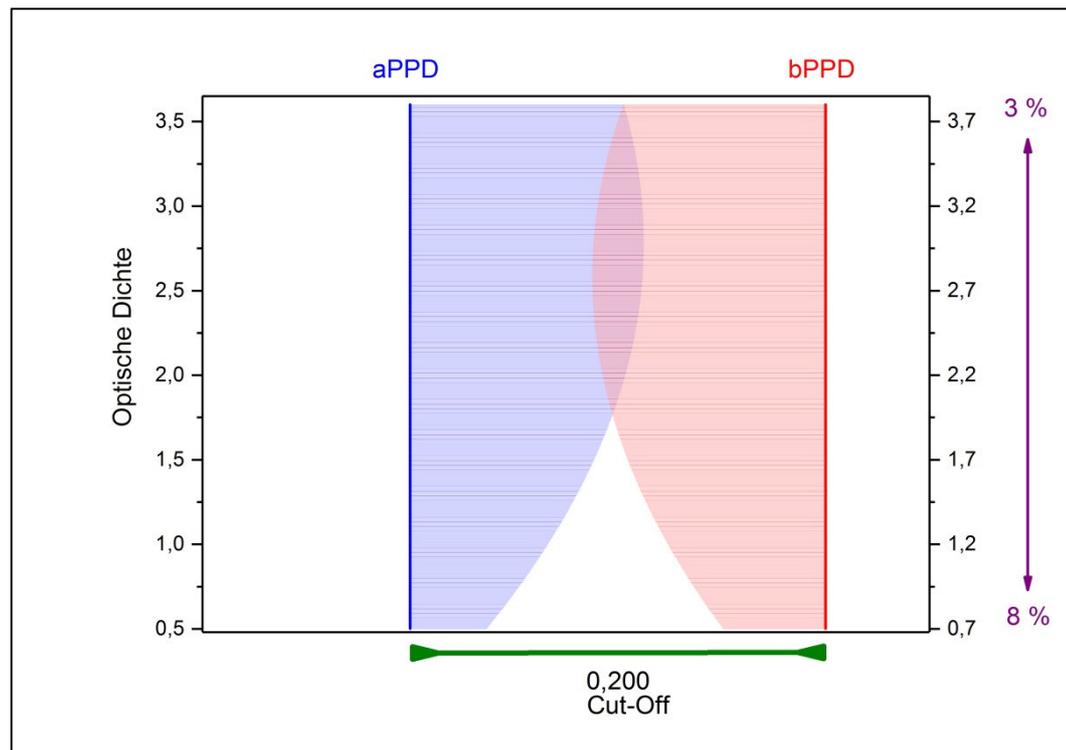
Ergebnis beeinflussen können, wie unter anderem auch die Entnahme und der Transport von Blutproben, die anschließende Stimulierung und Plasma-Asservierung sowie die Auswertung mittels ELISA inklusive aller Pipettierschritte, muss eine angemessene Spanne für den Cut-Off festgelegt werden.



**Abbildung 33: Darstellung der Diskriminierbarkeit der, im Bovigam® gemessenen Reaktionen auf aPPD bzw. bPPD bei einer Fehlerrate von 3% - 8%**

Bei einem Cut-Off (Differenz zwischen den OD-Werten infolge einer Stimulation mit aPPD bzw. bPPD) von 0,1 wird im Bovigam eine Probe als TB-positiv gewertet. Selbst bei einer geringen Fehlerrate, die infolge von Pipettierfehlern etc. schnell auftreten kann, ist keine eindeutige Diskriminierung zwischen den Reaktionen auf aviäres bzw. bovines PPD möglich.

Modifiziert nach Straubinger (2014)



**Abbildung 34: Darstellung der Diskriminierbarkeit der, im Bovigam® gemessenen Reaktionen auf aPPD bzw. bPPD bei einer Fehlerrate von 3% - 8%**

Bei einem Cut-Off von 0,2 ist eine deutlich bessere Diskriminierung der Reaktionen infolge einer Stimulation mit aPPD bzw. bPPD gegeben. Durch Erhöhung des Cut-Offs konnte eine Zunahme in der Spezifität des Bovigam® erreicht werden (PUCKEN et al., 2017).

Modifiziert nach Straubinger (2014)

### 4.3 Einsatz von IFN- $\gamma$ release assays bei Wildtieren

Der IFN- $\gamma$  release assay wird deutschlandweit in der der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (RINDTB-VO, 2014), von der Europäischen Union (EU, 2015) sowie von dem „Office International des Epizooties“ (OIE) (OIE, 2009) als diagnostischer Test zur TB-Detektion beim Rind gelistet. Die Verwendung von IFN- $\gamma$  release assays bei verschiedenen Wildtieren brachte, wie oben beschrieben, vielversprechende Resultate. Im Falle von solchen Spezies ist es generell wichtig Diagnostikmethoden, die auf einer einmaligen Probengewinnung basieren, zur Verfügung zu haben (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; BEZOS et al., 2014). Demzufolge wurde die Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays für die TB-Diagnose bei Wildtieren mehr und mehr fokussiert. Beim Europäischen Dach, welcher als Pendant zum Rotwild in Deutschland, in England

als Reservoirwirt von *M. bovis* eine große Gefahr der Infektionsübertragung darstellt, konnte der IFN- $\gamma$  release assay bereits erfolgreich eingesetzt werden und brachte weitreichende Erkenntnisse bezüglich der TB-Verbreitung durch diese Spezies (TOMLINSON et al., 2015). Ebenso wurde diese Testmethode erfolgreich für das TB-Screening in anderen Populationen, wie z. B. dem afrikanischen Büffel (GROBLER et al., 2002), Rhinozerosen (MORAR et al., 2007) oder Elefanten (MORAR, 2003) etabliert. Nach der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern für cervides IFN- $\gamma$ , wurde ein Immunoassay, speziell zum Nachweis von cervidem IFN- $\gamma$  entwickelt (SLOBBE et al., 2000; PALMER et al., 2004). Dieser Cervigam-Test konnte als Diagnostikmethode für den Nachweis einer *M.-bovis*-Infektion bei Rotwild (FERNÁNDEZ et al., 2009) und anderen Spezies, wie dem Weißwedelhirsch (PALMER et al., 2004) oder Rentier (WATERS et al., 2006; WATERS et al., 2008), bestätigt werden. Allerdings ist dieser Test kommerziell nicht mehr verfügbar und damit einhergehend auch kein valider diagnostischer Test zum Nachweis von TB über Freigesetztes IFN- $\gamma$  beim Rotwild. Die aktuell vermehrt auftretenden TB-Infektionen bei Rind und Rotwild im bayerischen Alpenraum und den angrenzenden österreichischen Regionen, die bestätigte Übertragung des Erregers innerhalb beider Spezies sowie die dadurch entstehende, erhöhte Infektionsgefahr des Menschen unterstreicht die Forderung nach neuen diagnostischen Möglichkeiten der TB-Diagnose in Rotwildpopulationen. Der IFN- $\gamma$  release assay für die TB-Detektion beim Rotwild ist unter den derzeit verfügbaren ante mortem Methoden aufgrund seiner vergleichsweise einfachen Handhabung bei Wildtieren als Mittel der Wahl anzusehen.

Durch weitere Entwicklung des Tests unserer Studie inklusive der Berücksichtigung genannter Aspekte, könnte eine neue ante mortem Diagnostikmethode der TB beim Rotwild zur Verfügung stehen. In Zusammenarbeit mit der Jägerschaft könnte so eine Verbesserung hinsichtlich TB-Monitoring und -Eradikation erreicht werden, indem in gezielten Untersuchungen positiv diagnostizierte Tiere verstärkt bejagt werden und somit der Infektionsdruck in entsprechenden Gebieten getilgt wird. Negativ identifizierte Tiere können durch Ohrmarken oder durch entsprechendes Besendern kenntlich gemacht werden. Derartige Untersuchungen und eine nachfolgende Kennzeichnung der Tiere kann in Deutschland vor allem im Winter, während die Tiere in

Wintergattern untergebracht sind, erfolgen. Im Zuge einer entsprechenden Markierung der getesteten Tiere, können gleichzeitig Distanzen, welche diese zurücklegen, nachvollzogen werden. Indem regionale und überregionale Ausbreitungsstrecken einzelner Rotwildpopulationen registriert werden, können in betroffenen Gebieten epidemiologische Daten erhoben und damit weitreichendere Erkenntnisse bezüglich Verbreitungsmuster der Infektion und der damit verbundenen Rolle des Rotwilds als Überträger gewonnen werden. Ferner kann die Anwendung des Tests auch bei Rotwild in Zoos erfolgen. In jedem Fall stellt die Identifikation infizierter Tiere und die damit verbundene Möglichkeit, eine weitere Verbreitung des Pathogens einzudämmen, einen großen Fortschritt hinsichtlich einer aktiven Tierseuchenbekämpfung dar. Aufgrund der erhöhten TB-Prävalenz nicht nur in Deutschland, sondern auch europaweit und die bewiesenermaßen vorhandene Übertragung der Infektion von wildlebenden Tieren auf das Rind sowie die damit einhergehende Gefährdung des Menschen, sind neue diagnostische Methoden *intra vitam* für Wildtierpopulationen gefordert. Die Resultate dieser Studie liefern wertvolle Erkenntnisse und Voraussetzungen für die Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays zur Diagnose von TB beim Rotwild.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen mit intrazellulären Erregern triggern eine Wirtsabwehr, welche von T-Lymphozyten als primäre Effektoren der zellvermittelten Immunantwort dominiert wird (FLYNN et al., 1993; ROMAGNANI, 1995; ABBAS et al., 1996). Dies führt zu der Produktion von IFN- $\gamma$ , einem Protein mit immunomodulatorischem Potential, welches hauptsächlich von T-Zellen infolge einer Stimulation mit spezifischen Antigenen produziert wird (MARCUCCI et al., 1981; FLYNN et al., 1993). Nach einer Infektion entwickeln sich v. a. CD4<sup>+</sup>- aber auch CD8<sup>+</sup>-Zellen zu Effektorzellen, von denen ein kleiner Teil im Laufe dieser Immunantwort zu langlebigen T-Gedächtniszellen differenzieren kann (COWLEY et al., 2005). Dieser Mechanismus wird in Diagnostikmethoden, wie z. B. Interferon-gamma release assays zur Detektion der Tuberkulose (TB) beim Rind aber auch in anderen Spezies, wie z. B. Rentieren oder dem Weißwedelhirsch genutzt (PALMER et al., 2004; WATERS et al., 2006). Deutschland gilt nach wie vor als „offiziell frei von Tuberkulose“, obwohl eine Zunahme der Prävalenz von TB bei Rind und Rotwild zu verzeichnen ist (EU-KOMMISSION, 2003; FINK et al., 2015). Darüber hinaus konnte das Rotwild als Reservoir von *M. caprae* definiert und als mögliche Infektionsquelle für das Rind während der Alpengänge der Tiere auf Sommerweiden dargelegt werden (FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung des Rotwilds in der Übertragung und Aufrechterhaltung der TB sind Fortschritte hinsichtlich der ante mortem Diagnostik, wie der Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays, notwendig.

Da Wildtiere für Untersuchungen dieser Art im Zuge der Blutgewinnung immobilisiert werden müssen, wurde hinsichtlich der zukünftigen Entwicklung eines IFN- $\gamma$  release assays als diagnostische Methode zum Nachweis der Tuberkulose beim Rotwild ein möglicher Einfluss der verwendeten Narkotika auf die Vitalität von Leukozyten überprüft. Da diese Zellen als Hauptquelle von IFN- $\gamma$  dienen, ist dies essentielle Voraussetzung für die Anwendung und Interpretation eines solchen Tests beim Rotwild. Ein möglicher Einfluss verschiedener Arten von Anästhesien auf Leukozyten wurde durch Studien belegt (USENIK & CRONKITE, 1965; WALTON, 1979). Nach Untersuchung von insgesamt 24 Blutproben von Rindern (Entnahme von jeweils einer Blutprobe vor und während der Narkose) mit einem bovinen IFN- $\gamma$  release assay konnte die IFN- $\gamma$ -Freisetzung gemessen

werden. Dabei wurde eine definierte Narkose, die üblicherweise zur Immobilisation von Wildtieren verwendet wird, eingesetzt. Die Blutabnahme während der Narkose wurde entsprechend des Wirkungseintritts nach etwa zehn Minuten der verwendeten Anästhetika infolge einer intramuskulären Injektion, wie sie beim Rotwild durchgeführt wird, gewählt. Die gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen resultierten in entweder nahezu identischen Werten zu beiden Zeitpunkten oder waren während der Narkose geringfügig erhöht. Somit konnte gezeigt werden, dass kein Verlust der Aktivität von Leukozyten und demzufolge keine verringerte IFN- $\gamma$ -Produktion unter Einfluss einer Narkose stattfindet. Es konnte bewiesen werden, dass die verwendeten Narkotika keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Leukozyten nehmen und damit zu keinen veränderten Ergebnissen im IFN- $\gamma$  release assay führen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zudem eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern des Kits gegen bovines IFN- $\gamma$  und cervidem IFN- $\gamma$  in Rotwildblut untersucht. Vollblutproben von zwei anästhesierten und einem toten Tier wurden getestet und führten zu einer positiven IFN- $\gamma$ -Detektion im bovinen ELISA. Die erhaltenen Werte für die anästhesierten Tiere waren in den ersten Verdünnungsstufen vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Untersuchung von Rinderblut und somit konnte auf eine sehr gute Kreuzreaktivität der Antikörper mit cervidem IFN- $\gamma$  geschlossen werden. Zudem konnte eine Messung von IFN- $\gamma$  aus Blut eines geschossenen Rotwilds erfolgen. Allerdings war die IFN- $\gamma$ -Detektion im Vergleich zu den anästhesierten Tieren niedrig, woraus geschlossen werden konnte, dass die Qualität des Blutes von toten Tieren zu gering ist, um aussagekräftige Ergebnisse im Assay sicherzustellen.

Zusammenfassend ist die Anwendung eines IFN- $\gamma$  release assays beim Rotwild möglich und eine notwendige, medikamentöse Immobilisation der Tiere nimmt keinen negativen Einfluss auf die Ergebnisse. Zudem kann ein kommerziell, erhältlicher boviner IFN- $\gamma$ -ELISA auch für die Untersuchung von Rotwildblut auf IFN- $\gamma$  verwendet werden. Für die Anwendung der Methode als diagnostisches Tool im Rahmen der TB-Diagnostik beim Rotwild sind weitere Entwicklungen notwendig.

## VII SUMMARY

Infections with intracellular microbes trigger a host defense, dominated by the activation of T-Lymphocytes as the principal effectors of cell-mediated immunity. This leads to the production of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), a protein with immunomodulatory potential which is mainly produced after a stimulation of lymphoid cells by specific antigens. After infection, CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup> T-cells expand into effector cells and after a peak of the T-cell response a small subset of these cells differentiate into a long-lived memory population. Immunodiagnostic tests, e. g. the interferon-gamma release assay for the detection of tuberculosis in cattle as well as in other species like reindeer or white-tailed deer, rely on the use of this mechanism. Germany is still declared “officially free of tuberculosis” although the prevalence of TB in red deer and cattle has been increasing. Moreover, red deer has already been defined as a reservoir of *M. caprae* and is considered as a source of infection for cattle during summer pastures. Considering the role of red deer in the transmission and maintaining of TB, ante mortem diagnostic approaches, such as the development of an IFN- $\gamma$  release assay for this species are of crucial need.

With the regard of a future development of an IFN- $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculosis in red deer, it was important to know whether an anesthesia, which is necessary for blood withdrawal within wild living animals, might have an influence on the vitality of leucocytes. This is an important prerequisite for the performance and interpretation of an IFN- $\gamma$  release assay as these cells are the prime source of IFN- $\gamma$ . So far several studies have shown that different anesthetics can influence leucocytes. After examining twenty-four blood samples of twelve cattle (one blood sample of each animal collected before, and one during anesthesia) with a bovine IFN- $\gamma$  release assay, IFN- $\gamma$  was measured. In this regard a defined narcosis for the immobilization of wild animals was used. As the pharmacological effect of the used narcotics occurs after approximately ten minutes following intramuscular injection in red deer, this time period was chosen for blood-withdrawal. IFN- $\gamma$ -concentrations prior to and ten minutes during deep anesthesia resulted in either equal values or were slightly higher during anesthesia. Thus, we were able to confirm that there is no loss of leucocyte activity and consequently no decreased IFN- $\gamma$  production under narcotics. Finally we could prove that narcotics don't have

a negative influence on the vitality of leucocytes and therefore on the results of an IFN- $\gamma$  release assay.

Based on the results a cross-reaction between the antibodies specific for bovine IFN- $\gamma$  used in the kit and cervid IFN- $\gamma$  was investigated in proof-of-principle experiment. Whole blood samples of two anaesthetized red deer and one sample of a shot animal were tested, providing positive for IFN- $\gamma$  in the bovine ELISA. In the first dilutions steps values for IFN- $\gamma$  in plasma of the anaesthetized animals were similar to those received in the examination of cattle-blood. Therefore an adequate cross-reaction between the antibodies and cervid IFN- $\gamma$  could be proved. Furthermore, examining whole blood of a shot animal also resulted in a positive IFN- $\gamma$  detection. The values were much lower compared to those of anaesthetized animals, leading to the conclusion that the quality of blood samples from shot animals is too poor to give reliable results in a future IFN- $\gamma$  release assay.

Taken together, the immobilization of animals with the use of narcotics, which is necessary for the performance of an IFN- $\gamma$  release assay does not negatively impair the results of the test and therefore such tests can be used within red deer populations. Furthermore the applied bovine IFN- $\gamma$  release assay can be used for future examination of red deer blood samples to measure released IFN- $\gamma$ . Nevertheless further research and development of the assay would be required to use it as a diagnostic method for TB within red deer populations.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo A, Gutierrez-Pabello J, Suarez-Güemes F, McNair J, Cataldi A, Espitia C, Andersen P. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4326-35.
- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787.
- Abderhalden W, Buchli C, Ratti P, Godli D. Einfang und Immobilisation von Alpensteinböcken (*Capra i. ibex*). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 1998; 44: 123-32.
- Abdou M, Frankena K, O'Keeffe J, Byrne AW. Effect of culling and vaccination on bovine tuberculosis infection in a European badger (*Meles meles*) population by spatial simulation modelling. *Prev Vet Med* 2016; 125: 19-30.
- Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012; 19: 1898-906.
- ACMSF. Report on *Mycobacterium bovis*. 2002:  
[https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal\\_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acm981b\\_att.pdf](https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acm981b_att.pdf).
- Aguet M, Merlin G. Purification of human gamma interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human gamma interferon. *Journal of Experimental Medicine* 1987; 165: 988-99.
- Aldwell FE, Dicker BL, da Silva Tatley FM, Cross MF, Liggett S, Mackintosh CG, Griffin JF. *Mycobacterium bovis*-infected cervine alveolar macrophages secrete lymphoreactive lipid antigens. *Infect Immun* 2000; 68: 7003-9.
- Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet* 2000; 356: 1099-104.

- Anderson P, Yip YK, Vilček J. Specific binding of 125I-human interferon-gamma to high affinity receptors on human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 1982; 257: 11301-4.
- Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49 Pt 3: 1263-73.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1785-9.
- Aranaz A, de Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2602-8.
- Ballesteros C, Garrido JM, Vicente J, Romero B, Galindo RC, Minguijón E, Villar M, Martín-Hernando MP, Sevilla I, Juste R. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine* 2009; 27: 6662-8.
- Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell death and differentiation* 2001; 8: 113.
- Barker J, Allen M, MacDonald D. Alterations induced in normal human skin by in vivo interferon-gamma. *British Journal of Dermatology* 1990; 122: 451-8.
- Barry C, Corbett D, Bakker D, Andersen P, McNair J, Strain S. The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests. *Vet Med Int* 2011; 2011
- Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, Raeber AJ, Waters WR. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20: 1827-35.

- Beilin B, Shavit Y, Trabekin E, Mordashev B, Mayburd E, Zeidel A, Bessler H. The effects of postoperative pain management on immune response to surgery. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97: 822-7.
- Beltrán JF, Tewes ME. Immobilization of ocelots and bobcats with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. *J Wildl Dis* 1995; 31: 43-8.
- Bendelac A, Schwartz RH. Th0 Cells in the Thymus: The Question of T-Helper Lineages. *Immunol Rev* 1991; 123: 169-88.
- Bengis R, Kock R, Fischer J. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties* 2002; 21: 53-66.
- Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Domínguez L. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014; 97 Suppl: S44-52.
- Bielby J, Donnelly CA, Pope LC, Burke T, Woodroffe R. Badger responses to small-scale culling may compromise targeted control of bovine tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 9193-8.
- Bioveta. Xylased <http://www.bioveta.eu/products/veterinary-products/xylased-500-lyophilizate-for-solution-for-injection-with-solvent.html>. 07.08.2017.
- Blaas S, Böhm S, Martin G, Erler W, Glück T, Lehn N, Naumann L. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2003; 47: 431-3.
- Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153: 80-2.
- BMG. EMIDA ERA-Net Projekt "TB-Alpine-Wildlife". 2013: [https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/krankheiten/TBC\\_Folder\\_2\\_0130904.pdf?5s3rd5](https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/krankheiten/TBC_Folder_2_0130904.pdf?5s3rd5).
- BMG Ö. BERICHT ÜBER ZOONOSEN UND IHRE ERREGER IN ÖSTERREICH IM JAHR 2014. 2014: [https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/publikationen/Zoonosenbericht\\_2014\\_Druckversion.pdf?5ozt7g](https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/tiere/publikationen/Zoonosenbericht_2014_Druckversion.pdf?5ozt7g).

BMGF Ö. TBC Anfragebeantwortung. 2013:

[https://offenesparlament.at/gesetze/XXIV/J\\_13113/](https://offenesparlament.at/gesetze/XXIV/J_13113/).

BMGF Ö. Rotwild-Tbc-Verordnung. 2017:

<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=20007322>.

BMJV. Neuerfassung der VO über anzeigepflichtige Tierseuchen. 2004:

[https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger\\_BGBI&bk=Bundesanzeiger\\_BGBI&start=//\\*\[@attr\\_id=%27bgbl104s2764.pdf%27\]#\\_bgbl\\_%2F%2F\\*%5B%40attr\\_id%3D%27bgbl104s2764.pdf%27%5D\\_1488792841587](https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBI&bk=Bundesanzeiger_BGBI&start=//*[@attr_id=%27bgbl104s2764.pdf%27]#_bgbl_%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27bgbl104s2764.pdf%27%5D_1488792841587).

BMJV. TierSeuchAnzV. 2016:

[http://www.gesetze-im-internet.de/tierseuchanzv/\\_1.html](http://www.gesetze-im-internet.de/tierseuchanzv/_1.html).

Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, Giacomelli P, Santoro G, Balato N, Castiglione F, Scarpa R, Perna F, Signoriello G, Galati D, Ponticiello A, Sanduzzi A. Performance of two commercial blood IFN- $\gamma$  release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF- $\alpha$  treatment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2008; 27: 907.

Bocci V. What are the roles of interferons in physiological conditions? *Physiology* 1988a; 3: 201-3.

Bocci V. Roles of interferon produced in physiological conditions. A speculative review. *Immunology* 1988b; 64: 1.

Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger E. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1751-9.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard J. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annual Review of Immunology* 1997; 15: 749-95.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* 2003; 83: 98-106.

- Brand J-M, Kirchner H, Poppe C, Schmucker P. Zytokinfreisetzung und Verteilung mononukleärer Zellen im peripheren Blut unter dem Einfluß der Allgemeinnarkose. *Der Anaesthesist* 1998; 47: 379-86.
- Brierley MM, Fish EN. Review: IFN- $\alpha/\beta$  receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *Journal of interferon & cytokine research* 2002; 22: 835-45.
- Bröcker E, Macher E. Der Einfluß von Narkose und Operation auf das Immunsystem. *Journal of Molecular Medicine* 1981; 59: 1297-301.
- Bröckl S (2017) Entwicklung einer Gesamtgenom-Sequenz für die molekulare Untersuchung der Ausbreitung von *Mycobacterium caprae* in Rinderbetrieben
- Brook RK, Vander Wal E, van Beest FM, McLachlan SM. Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up. *Prev Vet Med* 2013; 108: 137-47.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3684-9.
- Brown CA, Draper P, Hart PDA. Mycobacteria and Lysosomes: a Paradox. *Nature* 1969; 221: 658-60.
- Bruce DL. Effect of halothane anesthesia on extravascular mobilization of neutrophils. *Journal of Cellular physiology* 1966; 68: 81-3.
- Bruce DL. Acute and chronic anaesthetic actions on leukocytes. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie* 1973; 20: 55-63.
- Byrne AW, Quinn JL, O'Keeffe JJ, Green S, Sleeman DP, Martin SW, Davenport J. Large-scale movements in European badgers: has the tail of the movement kernel been underestimated? *J Anim Ecol* 2014; 83: 991-1001.
- Came PE, Carter WA (1984) Interferons and their applications

- Çamkerten I, Şindak N, Özkurt G, Ipek H, Biricik HS, ŞAHİN T. Effect of ketamine-xylazine Anesthesia on some hematological and serum Biochemical values of Bozova Greyhounds. Veteriner Fakültesi Dergisi Harran Üniversitesi 2013; 2: 27-31.
- Cardoso M, Cardoso R, Hirata R, Hirata M, Leite CQF, Santos A, Siqueira V, Okano W, Rocha N, Lonardoni M. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. Zoonoses Public Health 2009; 56: 465-70.
- Carter M, James V. Pituitary-adrenal response to surgical stress in patients receiving corticotrophin treatment. The Lancet 1970; 295: 328-30.
- Cassidy JP, Bryson DG, Gutiérrez Cancela MM, Forster F, Pollock JM, Neill SD. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. J Comp Pathol 2001; 124: 46-51.
- Celada A, Allen R, Esparza I, Gray P, Schreiber RD. Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes. Journal of Clinical Investigation 1985; 76: 2196.
- Chambers MA. Review of the diagnosis of tuberculosis in non-bovid wildlife species using immunological methods--an update of published work since 2009. Transbound Emerg Dis 2013; 60 Suppl 1: 14-27.
- Chang C-H, Hammer J, Loh JE, Fodor WL, Flavell RA. The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). Immunogenetics 1992; 35: 378-84.
- Chang Y, Chen T-L, Sheu J-R, Chen R-M. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. Toxicology and applied pharmacology 2005; 204: 27-35.
- Chien JC-W, Fang C-L, Chan WP. Peritoneal tuberculosis with elevated CA-125 mimicking ovarian cancer with carcinomatosis peritonei: Crucial CT findings. EXCLI journal 2016; 15: 711.
- Chu W-M. Tumor necrosis factor. Cancer letters 2013; 328: 222-5.

- Clegg TA, Duignan A, Whelan C, Gormley E, Good M, Clarke J, Toft N, More SJ. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the  $\gamma$ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Vet Microbiol* 2011; 151: 68-76.
- CliniPharm. Xylazin Streuli ad us. vet., Injektionslösung.  
[http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/05000000/00053815.01?inhalt\\_c.htm](http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/05000000/00053815.01?inhalt_c.htm).
- CliniPharm. Ketamin - Pharmakokinetik.  
[http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00007949/9517\\_\\_F.htm](http://www.vetpharm.uzh.ch/wir/00007949/9517__F.htm). 18.09.2017.
- Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul W. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *The Journal of Immunology* 1986; 136: 4538-41.
- Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- $\gamma$  via aerosol. *The Lancet* 1997; 349: 1513-5.
- Cook H. Origins of... tinctorial methods in histology. *Journal of clinical pathology* 1997; 50: 716.
- Corner L. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 53-63.
- Corner LA. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol* 2006; 112:303-12.
- Corner LA, Costello E, Lesellier S, O'Meara D, Gormley E. Vaccination of European badgers (*Meles meles*) with BCG by the subcutaneous and mucosal routes induces protective immunity against endobronchial challenge with *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2008; 88: 601-9.
- Corner LA, Costello E, O'Meara D, Lesellier S, Aldwell FE, Singh M, Hewinson RG, Chambers MA, Gormley E. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) with BCG and protective immunity against endobronchial challenge with *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* 2010; 28: 6265-72.

- Corner LA, O'Meara D, Costello E, Lesellier S, Gormley E. The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. *The Veterinary Journal* 2012; 194: 166-72.
- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1305-14.
- Cowley SC, Hamilton E, Frelinger JA, Su J, Forman J, Elkins KL. CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. *J Exp Med* 2005; 202: 309-19.
- Cullen BF, van Belle G. Lymphocyte transformation and changes in leukocyte count: effects of anesthesia and operation. *Anesthesiology* 1975; 43:563-9.
- Day MJ (2005) Atlas der klinischen Immunologie bei Hund und Katze
- De la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 2006; 81: 190-210.
- De la Rúa-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 77-109.
- De Lisle G, Havill P. Mycobacteria isolated from deer in New Zealand from 1970–1983. *New Zealand Veterinary Journal* 1985; 33: 138-40.
- Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 1989; 321: 1506-10.

- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology* 1988; 141: 2407-12.
- Domogalla J, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Gellert S, Muller M, Neuendorf E, Sedlmaier F, Buttner M. Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1381-8.
- Duncan PG, Cullen BF, Pearsall NN. Anesthesia and the Modification of Response to Infection in Mice. *Anesthesia & Analgesia* 1976; 55: 776-81.
- DWORKIN-RASTL E, DWORKIN MB, SWETLY P. Molecular cloning of human alpha and beta interferon genes from Namalwa cells. *Journal of interferon research* 1982; 2: 575-85.
- EU-Kommission. Verordnung (EG) Nr. 1226/2002 der Kommission vom 8. Juli 2002 zur Änderung von Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG des Rates. 2002: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R1226&from=DE>. 08.08.2017.
- EU-Kommission. 2003/467/EG. 2003: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:32003D0467&from=DE>.
- EU-Kommission. Neufassung 2003/467/EG. 2016: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2016:078:FULL&from=DE>.
- EU. Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen zuletzt geändert durch Entscheidung der Kommission 2008/984/EG. 2015: <https://www2.jurion.de/files/lexsoft/share/pdf/cl196410432de0190020.0001.pdf>.
- Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World journal of surgery* 1996; 20: 454-9.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual Review of Immunology* 1993; 11: 571-611.

- Felsburg PJ, Keyes LL, Krawiec DR, Rubin SI. The effect of general anesthesia on canine lymphocyte function. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 13: 63-70.
- Fernández-de-Mera IG, Jaroso R, Martín-Hernando MP, Queiros J, Carta T, Ortiz JA, Vicente J, Gortázar C. The testing season affects red deer skinfold increase in response to phytohaemagglutinin. *Prev Vet Med* 2011; 100: 79-83.
- Fernández JG, Fernández-de-Mera I, Reyes LE, Ferreras MC, Pérez V, Gortazar C, Fernández M, Garcia-Marín JF. Comparison of three immunological diagnostic tests for the detection of avian tuberculosis in naturally infected red deer (*Cervus elaphus*). *J Vet Diagn Invest* 2009; 21: 102-7.
- Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodinger WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis MP, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Buttner M. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 464-7.
- FLI. Tuberkulose Informationsblatt. 2013:  
[https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Publikationen/FLI-Informationen/FLI-Information\\_Tuberkulose\\_20130902.pdf](https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Publikationen/FLI-Informationen/FLI-Information_Tuberkulose_20130902.pdf).
- FLI. Jahresbericht 2014. 2015:  
[https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Publikationen/TGJB/TGJB\\_2014.pdf](https://www.fli.de/fileadmin/FLI/Publikationen/TGJB/TGJB_2014.pdf).  
25.10.2016.
- FLI. Jahresbericht 2015. 2016a: [https://openagrار.bmel-forschung.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrار\\_derivate\\_00001001/TGJB\\_2015\\_2016-12-06.pdf](https://openagrار.bmel-forschung.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrار_derivate_00001001/TGJB_2015_2016-12-06.pdf).
- FLI. Amtliche Methodensammlung : Anzeigepflichtige Tierseuchen. 2016b: fell  
[https://openagrار.bmel-forschung.de/receive/openagrار\\_mods\\_00005698](https://openagrار.bmel-forschung.de/receive/openagrار_mods_00005698).
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178: 2249-54.

- Franco MMJ, Paes AC, Ribeiro MG, de Figueiredo Pantoja JC, Santos ACB, Miyata M, Leite CQF, Motta RG, Listoni FJP. Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Vet Res* 2013; 9: 85.
- Fritsche A, Engel R, Buhl D, Zellweger J. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2004; 8: 903-4.
- Galindo RC, Ayoubi P, Naranjo V, Gortazar C, Kocan KM, de la Fuente J. Gene expression profiles of European wild boar naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 129: 119-25.
- García-Jiménez W, Fernández-Llario P, Gómez L, Benítez-Medina J, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Smith N. Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected Fallow deer (*Dama dama*). *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 66-75.
- Geist A (2006) Durchflusszytometrische Untersuchungen der Leukozytenphänotypen aus dem Blut von Schweinen unter besonderer Berücksichtigung postoperativer Veränderungen. Universitätsbibliothek Giessen
- Gerstmair EM (2011) Validierung molekularbiologischer und immunologischer Nachweisverfahren für die Tuberkulose bei Rindern und Tuberkulosemonitoring beim Rotwild. Ed München. TFL-M-U
- Giannopoulos A, Constantinides C, Fokaeas E, Stravodimos C, Giannopoulou M, Kyroudi A, Gounaris A. The immunomodulating effect of interferon- $\gamma$  intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence. *Clinical cancer research* 2003; 9: 5550-8.
- Goldstein I, Lind S, Hoffstein S, Weissmann G. Influence of local anesthetics upon human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. Reduction of lysosomal enzyme release and superoxide anion production. *Journal of Experimental Medicine* 1977; 146: 483-94.

- Gollob JA, Kawasaki H, Ritz J. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 regulate T cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression. *European journal of immunology* 1997; 27: 647-52.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall R. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 2000; 81: 2341-64.
- Goosen WJ, Miller MA, Chegou NN, Cooper D, Warren RM, van Helden PD, Parsons SD. Agreement between assays of cell-mediated immunity utilizing *Mycobacterium bovis*-specific antigens for the diagnosis of tuberculosis in African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 160: 133-8.
- Gormley E, Doyle M, Fitzsimons T, McGill K, Collins J. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet Microbiol* 2006; 112: 171-9.
- Gormley E, Corner LA. Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transbound Emerg Dis* 2013; 60 Suppl 1: 128-35.
- Gormley E, Doyle M, Duignan A, Good M, More SJ, Clegg TA. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN $\gamma$ ) assay. *Vet Res* 2013; 44: 117.
- Gormley E, Corner LA, Costello E, Rodriguez-Campos S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Res Vet Sci* 2014; 97 Suppl: S30-43.
- Gray PW, Goeddel DV. Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1983; 80: 5842-6.
- Gresser I. On the varied biologic effects of interferon. *Cellular immunology* 1977; 34: 406-15.
- Griffin JF, Chinn DN, Rodgers CR. Diagnostic strategies and outcomes on three New Zealand deer farms with severe outbreaks of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 293-302.

- Griffin JF, Rodgers CR, Liggett S, Mackintosh CG. Tuberculosis in ruminants: characteristics of intra-tonsillar *Mycobacterium bovis* infection models in cattle and deer. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 86: 404-18.
- Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal inflamed skin: Modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1989; 20: 617-29.
- Grobler D, De Klerk L, Bengis RG. The gamma-interferon test: its usefulness in a bovine tuberculosis survey in African buffaloes (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park. 2002;
- Gutiérrez M, Samper S, Jiménez MS, Van Embden J, Marín J, Martín C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3328-30.
- Hansen N, Seiler C, Rumpf J, Kraft P, Dlaske H, Abele-Horn M, Muellges W. Human tuberculous meningitis caused by *Mycobacterium caprae*. *Case reports in neurology* 2012; 4: 54-60.
- Hardstaff JL, Marion G, Hutchings MR, White PC. Evaluating the tuberculosis hazard posed to cattle from wildlife across Europe. *Res Vet Sci* 2014; 97 Suppl: S86-93.
- Harrington NP, Surujballi OP, Prescott JF, Duncan JR, Waters WR, Lyashchenko K, Greenwald R. Antibody responses of cervids (*Cervus elaphus*) following experimental *Mycobacterium bovis* infection and the implications for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1650-8.
- Harrington R, Jr., Karlson AG. DESTRUCTION OF VARIOUS KINDS OF MYCOBACTERIA IN MILK BY PASTEURIZATION. *Appl Microbiol* 1965; 13: 494-5.
- Hashimoto T, Hashimoto S, Hori Y, Nakagawa H, Hosokawa T. Epidural anaesthesia blocks changes in peripheral lymphocytes subpopulation during gastrectomy for stomach cancer. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 1995; 39: 294-8.

- Heimlich F, Dietz A, Daniel V, Maier H. Einfluß tumorchirurgischer Eingriffe im Kopf-Hals-Bereich auf das Immunsystem. HNO 1999; 47: 885-92.
- Hein WR, Mackay CR. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. Immunology today 1991; 12: 30-4.
- Holani AG, Ganvir SM, Shah NN, Bansode SC, Shende I, Jawade R, Bijjargi SC. Demonstration of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum and saliva smears of tuberculosis patients using Ziehl Neelsen and flurochrome staining-a comparative study. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR 2014; 8: ZC42.
- Homburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. Current Opinion in Anesthesiology 2006; 19: 423-8.
- Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Bacteriol 2006; 188: 4271-87.
- Humphrey LJ, Wingard DW, Lang R. Effect of halothane on spleen cells: in vitro studies on reversibility of immunosuppression. Surgery 1969; 65: 939-42.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 1957; 147: 258-67.
- Issekutz TB, Stoltz J, vd Meide P. Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of IFN-gamma. The Journal of Immunology 1988; 140: 2989-93.
- Jubert AV, Lee ET, Hersh EM, McBride CM. Effects of surgery, anesthesia and intraoperative blood loss on immunocompetence. Journal of Surgical Research 1973; 15: 399-403.
- Kalish RS, Askenase PW. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 192-9.
- KARLSON AG, LESSEL EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. Int J Syst Evol Microbiol 1970; 20: 273-82.

- Kasahara T, Hooks J, Dougherty S, Oppenheim J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology* 1983; 130: 1784-9.
- Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annual Review of Immunology* 1993; 11: 129-63.
- Key Jr LL, Rodriguiz RM, Willi SM, Wright NM, Hatcher HC, Eyre DR, Cure JK, Griffin PP, Ries WL. Long-term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon gamma. *New England Journal of Medicine* 1995; 332: 1594-9.
- Kinjavdekar P, Amarpal GS, Aithal H, Pawde A. Physiologic and biochemical effects of subarachnoidally administered xylazine and medetomidine in goats. *Small Ruminant Research* 2000; 38: 217-28.
- Kirchner H, Kleinicke C, Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes. *J Immunol Methods* 1982; 48: 213-9.
- Kitamura T, Ohno N, Bougaki M, Ogawa M, Yamada Y. Comparison of the effects of sevoflurane and propofol on changes in leukocyte-count induced by surgical stress. *Masui. The Japanese journal of anesthesiology* 2008; 57: 968-72.
- Knight E. Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1976; 73: 520-3.
- Kössler J. Bekämpfung der Tuberkulose beim Rotwild im oberen Lechtal aktueller Stand. 18. Österreichische Jägertagung 2012 2011: [https://www.google.de/search?q=Bek%C3%A4mpfung+der+Tuberkulose+beim+Rotwild+im+oberen+Lechtal+aktueller+Stand&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe\\_rd=cr&dcr=0&ei=E-TAWYvJCI7KXo6HnJgC](https://www.google.de/search?q=Bek%C3%A4mpfung+der+Tuberkulose+beim+Rotwild+im+oberen+Lechtal+aktueller+Stand&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab&gfe_rd=cr&dcr=0&ei=E-TAWYvJCI7KXo6HnJgC)
- Kössler J. Bericht über die 18. Österreichische Jägertagung 2012. 2012: [http://www.bundesforste.at/fileadmin/jagd/2012\\_Tagungsband\\_Jaegertagung.pdf](http://www.bundesforste.at/fileadmin/jagd/2012_Tagungsband_Jaegertagung.pdf).

- Kreeger TJ, Del Giudice GD, Seal US, Karns PD. Immobilization of white-tailed deer with xylazine hydrochloride and ketamine hydrochloride and antagonism by tolazoline hydrochloride. *J Wildl Dis* 1986; 22: 407-12.
- Kreeger TJ, Seal US, Tester JR. Chemical immobilization of red foxes (*Vulpes vulpes*). *J Wildl Dis* 1990; 26: 95-8.
- Kubica T, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3070-7.
- Kumar A, Thurmon J. Cardiopulmonary, hemocytologic and biochemical effects of xylazine in goats. *Laboratory Animal Science* 1979; 29: 486-91.
- Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune responses. *Journal of anesthesia* 2008; 22: 263-77.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14: 461-70.
- Lesellier S, Palmer S, Dalley D, Davé D, Johnson L, Hewinson R, Chambers M. The safety and immunogenicity of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine in European badgers (*Meles meles*). *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112: 24-37.
- LGL. FAQs zu Tuberkulose. 2013:  
[http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten\\_a\\_z/tuberkulose/faq\\_tuberkulose\\_mensch.htm](http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/tuberkulose/faq_tuberkulose_mensch.htm).
- Littman SJ, Faltynek C, Baglioni C. Binding of human recombinant 125I-interferon gamma to receptors on human cells. *Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 1191-5.
- López-Olvera JR, Fernández-de-Mera IG, Serrano E, Vidal D, Vicente J, Fierro Y, Gortázar C. Sex-related differences in body condition and serum biochemical parameters in red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet J* 2013; 198: 702-6.

- Lutfalla G, Gardiner K, Proudhon D, Vielh E, Uzé G. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 2802-9.
- Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, Bossink A, Magdorf K, Holscher C, Kampmann B, Arend SM, Detjen A, Bothamley G, Zellweger JP, Milburn H, Diel R, Ravn P, Cobelens F, Cardona PJ, Kan B, Solovic I, Duarte R, Cirillo DM. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2009; 33: 956-73.
- Marco I, Lavín S. Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). *Res Vet Sci* 1999; 66: 81-4.
- Marcucci F, Waller M, Kirchner H, Krammer P. Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures. *Nature* 1981; 291: 79-81.
- Markewitz A, Faist E, Niesel T, Lang S, Weinhold C, Reichart B. Changes in lymphocyte subsets and mitogen responsiveness following open-heart surgery and possible therapeutic approaches. *The Thoracic and cardiovascular surgeon* 1992; 40: 14-8.
- Markovic SN, Murasko DM. Anesthesia inhibits interferon-induced natural killer cell cytotoxicity via induction of CD8<sup>+</sup> suppressor cells. *Cellular immunology* 1993; 151: 474-80.
- Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, Müller-Holzner E, Deibl M, Doppler W, Daxenbichler G. Interferon- $\gamma$  expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology* 2004; 191: 1598-605.
- Martín-Hernando M, Torres MJ, Aznar J, Negro JJ, Gandía A, Gortázar C. Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 2010; 142: 43-50.
- McCluskey RT, Benacerraf B, McCluskey JW. Studies on the specificity of the cellular infiltrate in delayed hypersensitivity reactions. *The Journal of Immunology* 1963; 90: 466-77.

- McCorry T, Whelan A, Welsh M, McNair J, Walton E, Bryson D, Hewinson R, Vordermeier H, Pollock J. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Veterinary Record* 2005; 157: 613.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling M-H, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *New England Journal of Medicine* 1998; 339: 1485-92.
- McNair J, Welsh MD, Pollock JM. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine* 2007; 25: 5504-11.
- Melamed R, Bar-Yosef S, Shakhar G, Shakhar K, Ben-Eliyahu S. Suppression of natural killer cell activity and promotion of tumor metastasis by ketamine, thiopental, and halothane, but not by propofol: mediating mechanisms and prophylactic measures. *Anesthesia & Analgesia* 2003; 97: 1331-9.
- Meng C, Wan T, Xu Z, Liu Y, Shan F, Sun L, Yin Y, Chen X, Jiao X. Screening putative antigens as stimulators in the *Mycobacterium bovis* interferon-gamma release assay for cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2015; 168: 111-7.
- Menge C, Köhler H, Moser I, Conraths F, Homeier T. Nationwide Cross-Sectional Study on Bovine Tuberculosis by Intra Vitam Testing in Germany, 2013–2014. *Transbound Emerg Dis* 2016;
- Milanés-Virelles MT, García-García I, Santos-Herrera Y, Valdés-Quintana M, Valenzuela-Silva CM, Jiménez-Madrugal G, Ramos-Gómez TI, Bello-Rivero I, Fernández-Olivera N, Sánchez-de la Osa RB. Adjuvant interferon gamma in patients with pulmonary atypical Mycobacteriosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC infectious diseases* 2008; 8: 17.
- Miller CH, Maher SG, Young HA. Clinical Use of Interferon- $\gamma$ . *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1182: 69-79.

- Miller RS, Sweeney SJ. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. *Epidemiol Infect* 2013; 141: 1357-70.
- Miller RS, Farnsworth ML, Malmberg JL. Diseases at the livestock–wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States. *Prev Vet Med* 2013; 110: 119-32.
- Mishler JM, Emerson PM. Development of neutrophilia by serially increasing doses of dexamethasone. *British journal of haematology* 1977; 36: 249-57.
- Monaghan M, Doherty M, Collins J, Kazda J, Quinn P. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 1994; 40: 111-24.
- Moore KW, de Waal Malefyt RR, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. 2001;
- Morar D (2003) The Development of an Interferon-gamma (IFN [gamma]) Assay for the Diagnosis of Tuberculosis in African Elephants (*Loxodonta Africana*) and Black Rhinoceros (*Diceros Bicornis*)
- Morar D, Tijhaar E, Negrea A, Hendriks J, Van Haarlem D, Godfroid J, Michel A, Rutten V. Cloning, sequencing and expression of white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and the production of rhinoceros IFN- $\gamma$  specific antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 146-54.
- Morrison J, Pai M, Hopewell PC. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2008; 8: 359-68.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 1986; 136: 2348-57.

- Moss RB, Mayer-Hamblett N, Wagener J, Daines C, Hale K, Ahrens R, Gibson RL, Anderson P, Retsch-Bogart G, Nasr SZ. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalating Study of Aerosolized Interferon Gamma-1b in Patients With Mild to Moderate Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatric pulmonology* 2005; 39: 209-18.
- Moulvi BA, Parrah JD, Kalim MO, Athar H, Dedmari FH. Haemato-biochemical response to lignocaine alone or in combination with xylazine for epidural analgesia in cow calves. *Journal of Advanced Veterinary Research* 2011; 1: 17-20.
- Müller B, Durr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, van Helden PD, Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 899-908.
- Munk M, Emoto M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *The European respiratory journal. Supplement* 1995; 20: 668s-75s.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway, Immunologie*: 2009:
- Mwangi W, Mogo E, Nguhiu-Mwangi J, Mulei C. The Hematological and Cardiopulmonary Effects of Epidural Xylazine, Lidocaine and Their Combination in Acepromazine Sedated Dogs. *International Journal of Veterinary Science* 2014; 3: 46-51.
- Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 2008; 127: 1-9.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe M, Rubin BY. Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. exp. Med* 1983; 158: 1983.
- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 1987; 79: 319.
- Nebert DW, Friedman RM. Stimulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell cultures by interferon. *Journal of virology* 1973; 11: 193-7.
- Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 41-52.

- Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81: 79-86.
- Neill SD, Skuce RA, Pollock JM. Tuberculosis--new light from an old window. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1261-9.
- Nelson CJ, Lysle DT. Severity, time, and  $\beta$ -adrenergic receptor involvement in surgery-induced immune alterations. *Journal of Surgical Research* 1998; 80: 115-22.
- Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P (2009) *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie*. Georg Thieme Verlag
- Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 433-6.
- Nugent G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. *Vet Microbiol* 2011; 151: 34-42.
- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016. 2009: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.06\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.06_BOVINE_TB.pdf).
- ORTALDO JR, LANG NP, TIMONEN T, HERBERMAN RB. Augmentation of human natural killer cell activity by interferon: conditions required for boosting and characteristics of the effector cells. *Journal of interferon research* 1981; 1: 253-62.
- Page GG. Surgery-induced Immunosuppression and Postoperative Pain Management. *AACN Advanced Critical Care* 2005; 16: 302-9.
- Pai M, Riley LW, Colford Jr JM. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* 2004; 4: 761-76.

- Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Microbiol Rev 2014; 27: 3-20.
- Palacios AS, Ponce MO, Pérez AR, Medina FS, Marrero JG. Modification of mediators of immune reaction after general anaesthesia. Allergologia et immunopathologia 2004; 32: 352-60.
- Palmer M, Waters W, Whipple D. Lesion development in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Veterinary pathology 2002; 39: 334-40.
- Palmer M, Waters W, Thacker T. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Veterinary pathology 2007; 44: 863-74.
- Palmer MV, Waters WR, Whipple DL, Slaughter RE, Jones SL. Evaluation of an in vitro blood-based assay to detect production of interferon-gamma by *Mycobacterium bovis*-infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). J Vet Diagn Invest 2004; 16: 17-21.
- Palmer MV. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. Transbound Emerg Dis 2013; 60 Suppl 1: 1-13.
- Park SK, Wallace H, Brody J, Blakemore W. Immunosuppressive effect of surgery. The Lancet 1971; 297: 53-5.
- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends in Microbiology 1998; 6: 107-12.
- Pasquali S, Mocellin S. The anticancer face of interferon alpha (IFN-alpha): from biology to clinical results, with a focus on melanoma. Current medicinal chemistry 2010; 17: 3327-36.
- Pate M, Švara T, Gombač M, Paller T, Zolnir-Dovč M, Emeršič I, Prodinger WM, Bartoš M, Zdovc I, Krt B, Pavlik I, Cvetnic Z, Pogačnik M, Ocepek M. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006; 53: 387-92.

- Paul WE. Interleukin 4/B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions. *The FASEB journal* 1987; 1: 456-61.
- Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, Pacciarini M, Pasquali P. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci* 2014; 97 Suppl: S78-85.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 727-77.
- Pestka S. The human interferon  $\alpha$  species and receptors. *Peptide Science* 2000; 55: 254-87.
- Pires D, Marques J, Pombo JP, Carmo N, Bettencourt P, Neyrolles O, Lugo-Villarino G, Anes E. Role of Cathepsins in *Mycobacterium tuberculosis* Survival in Human Macrophages. *Sci Rep* 2016; 6: 32247.
- Pollock J, Pollock D, Campbell D, Girvin R, Crockard A, Neill S, Mackie D. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996; 87: 236-41.
- Pollock J, Girvin R, Lightbody K, Clements R, Neill S, Buddle B, Andersen P. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet Rec* 2000; 146: 659-65.
- Pollock J, McNair J, Welsh M, Girvin R, Kennedy H, Mackie D, Neill S. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81: 103-7.
- Pollock JM, Welsh MD, McNair J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108: 37-43.
- Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol* 2006; 112: 141-50.
- PRESIDENTE PJ, Lumsden J, PRESNELL KR, RAPLEY WA, McCRAW BM. Combination of etorphine and xylazine in captive white-tailed deer: II. Effects on hematologic, serum biochemical and blood gas values. *J Wildl Dis* 1973; 9: 342-8.

- Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2270-2.
- Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 1501-13.
- Pucken V-B, Knubben-Schweizer G, Döpfer D, Groll A, Hafner-Marx A, Hörmansdorfer S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Zimmermann P, Hartnack S. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS One* 2017; 12: e0179847.
- Pucken VB, Gotz F, Mansfeld R, Moder S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Knubben-Schweizer G. [The intradermal tuberculin test: literature, directive and implementation in practice]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2015; 43: 197-206.
- Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Delsol G, Caratero C, Altare F. An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cellular microbiology* 2004; 6: 423-33.
- Queiros J, Alvarez J, Carta T, Mateos A, Ortiz JA, Fernández-de-Mera IG, Martín-Hernando MP, Gortázar C. Unexpected high responses to tuberculin skin-test in farmed red deer: implications for tuberculosis control. *Prev Vet Med* 2012; 104: 327-34.
- Ramachandra L, Simmons D, Harding CV. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. *Current opinion in immunology* 2009; 21: 98-104.
- Ramsay MA, Stirling I, Knutsen LØ, Broughton E. Use of yohimbine hydrochloride to reverse immobilization of polar bears by ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride. *J Wildl Dis* 1985; 21: 396-400.
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS One* 2011; 6: e23481.

- Repasy T, Lee J, Marino S, Martinez N, Kirschner DE, Hendricks G, Baker S, Wilson AA, Kotton DN, Kornfeld H. Intracellular bacillary burden reflects a burst size for *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. PLoS Pathog 2013; 9: e1003190.
- Rettinger A, Broeckl S, Fink M, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Domogalla J, Just F, Gellert S, Straubinger RK, Buttner M. The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes. Transbound Emerg Dis 2015;
- Reynolds D. A review of tuberculosis science and policy in Great Britain. Vet Microbiol 2006; 112: 119-26.
- Rhodes S, Palmer N, Graham S, Bianco A, Hewinson R, Vordermeier H. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. Infect Immun 2000; 68: 5393-400.
- Riddell LA, Pinching AJ, Hill S, Ng TT, Arbe E, Lapham GP, Ash S, Hillman R, Tchamouroff S, Denning DW. A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. AIDS research and human retroviruses 2001; 17: 789-97.
- RindTb-VO. Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose Verordnung). 2014: <https://www.gesetze-im-internet.de/rindtbv/BJNR009150972.html>.
- RindTb-VO. RindTbV. 2017: <https://www.gesetze-im-internet.de/rindtbv/BJNR009150972.html>. 23.06.2017.
- Ring J, Thewes M. The clinical expression of allergy in the skin. Allergy 1999; 54: 192-7.
- Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Res Vet Sci 1991; 50: 365-7.
- RKI. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose 2015. 2015a: [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2015.pdf?__blob=publicationFile).

- RKI. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2015. 2015b:  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2015.pdf?__blob=publicationFile).
- RKI. Dem Robert Koch Institut übermittelte meldepflichtige Infektionskrankheiten bei Asylsuchenden in Deutschland. 2017:  
[http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsbericht\\_erstattung/GesundAZ/Content/A/Asylsuchende/Inhalt/meldepflichtige\\_Infektionskrankheiten\\_bei\\_Asylsuchenden.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsbericht_erstattung/GesundAZ/Content/A/Asylsuchende/Inhalt/meldepflichtige_Infektionskrankheiten_bei_Asylsuchenden.pdf?__blob=publicationFile).
- Robek MD, Wieland SF, Chisari FV. Inhibition of hepatitis B virus replication by interferon requires proteasome activity. *Journal of virology* 2002; 76: 3570-4.
- Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology* 1995; 141: 2131-8.
- Rodríguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Sáez-Llorente JL, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 532-5.
- Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *Journal of Clinical Immunology* 1995; 15
- Romagnani S. The th1/th2 paradigm. *Immunology today* 1997; 18: 263-6.
- Roos EO, Buss P, de Klerk-Lorist LM, Hewlett J, Hausler GA, Rossouw L, McCall AJ, Cooper D, van Helden PD, Parsons SD, Miller MA. Test performance of three serological assays for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in common warthogs (*Phacochoerus africanus*). *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 182: 79-84.
- Rothel J, Jones S, Corner L, Cox J, Wood P. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J* 1992; 69: 1-4.

- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 1990; 67: 134-7.
- Rüsch-Gerdes S, Hillemann D. Moderne mykobakteriologische Labordiagnostik. *Pneumologie* 2008; 62: 533-40.
- Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 39-47.
- Russell DG, Vanderven BC, Glennie S, Mwandumba H, Heyderman RS. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 594-600.
- Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology* 2012; 49: 423-39.
- Salo M. Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 1992; 36: 201-20.
- Santos N, Almeida V, Gortázar C, Correia-Neves M. Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Vet Res* 2015; 46: 129.
- Sauer J, Polack E, Wikinski S, Holsboer F, Stalla G, Arzt E. The glucocorticoid sensitivity of lymphocytes changes according to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20: 269-80.
- Schäfer B (2012) Einfluss einer Isoflurananästhesie im Vergleich zu einer Kombinationsanästhesie mit Xylazin, Ketamin und Isofluran auf die Konzentrationen ausgewählter Immunparameter im Blut von Kälbern mit und ohne chirurgischen Eingriff. *Imu*
- Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57: 205-20.

- Schiller I, RayWaters W, Vordermeier HM, Jemmi T, Welsh M, Keck N, Whelan A, Gormley E, Boschioli ML, Moyon JL, Vela C, Cagiola M, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, Oesch B. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Vet Microbiol* 2011; 151: 153-9.
- Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 157: 679-91.
- Schoepf K, Prodingler WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F. A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet Sci* 2012; 2012: 245138.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature medicine* 1996; 2: 662-7.
- Sick C, Schultz U, Staeheli P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 7635-9.
- Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Immun* 2008; 76: 3932-9.
- Singh K, Kinjavdekar P, Aithal H, Gopinathan A, Singh G, Pawde A, Pratap K. Effects of epidural ketamine–xylazine combination on the clinicophysiological and haematobiochemical parameters of uraemic and healthy goats. *Veterinary research communications* 2007; 31: 133-42.
- Singh P, Pratap K, Kinjavdekar P, Aithal H, Singh G. Effects of xylazine, lignocaine and their combination for lumbar epidural analgesia in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Journal of the South African Veterinary Association* 2005; 76: 151-8.
- Slade MS, Simmons RL, Yunis E, Greenberg LJ. Immunodepression after major surgery in normal patients. *Surgery* 1975; 78: 363-72.

- Slobbe L, Lockhart E, Kelly J, Buchan G. THE PRODUCTION AND BIOLOGICAL ASSESSMENT OF CERVINE INTERFERON GAMMA. *Cytokine* 2000; 12: 1211-7.
- Smith DC, Oster RH, Snyder L, Proutt LM. Immediate effects of ether and nembital upon some of the blood components in the cat. *American Journal of Physiology--Legacy Content* 1947; 152: 6-10.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 463-96.
- Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response—more than just antiviral cytokines. *Molecular immunology* 2005; 42: 869-77.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94: 9869-74.
- Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins MD, Aziz MA, Pai M. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* 2006; 6: 664-74.
- Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One* 2013; 8: e58374.
- Stewart W, Blalock J, Burke D, Chany C, Dunnick J, Falcoff E, Friedman R, Galasso G, Joklik W, Vilcek J. Interferon nomenclature. *Cancer Res* 1980; 40: 3860.
- Stewart WE, Lin LS. Antiviral activities of interferons. *Pharmacology & Therapeutics* 1979; 6: 443-512.
- Talpaz M, McCredie KB, Mavligit GM, Gutterman JU. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1983; 62: 689-92.

- Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, Trujillo JM, Keating MJ, Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alphaA in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* 1986; 314: 1065-9.
- Tanaka N, Sato M, Lamphier MS, Nozawa H, Oda E, Noguchi S, Schreiber RD, Tsujimoto Y, Taniguchi T. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes to Cells* 1998; 3: 29-37.
- Tar S, Bozdemir B, Gurel M, Bilgin F, Baran M, Demirkesen C. *Mycobacterium bovis caprae*: a rare agent of lupus vulgaris. *Clinical and experimental dermatology* 2009; 34: 532-3.
- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 2007; 3: 12.
- Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch R. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from cattle: possible public health relevance. *Indian journal of microbiology* 2012; 52: 289-91.
- Thoen C, LoBue P, De Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006; 112: 339-45.
- Tolksdorf W. Neue Aspekte zu Ketamin in der Anaesthesie, Intensiv-und Notfallmedizin. Springer 1988:  
[https://books.google.de/books?id=42WdBwAAQBAJ&pg=PA80&lpg=PA80&dq=wirkung+ketamin+tolksdorf&source=bl&ots=32d7D9xm7w&sig=SwGs2Z\\_MEhD6yBCEhf5gjq3s5VQ&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjjur2\\_qa\\_WAhVCPBoKHcZwB3IQ6AEIKzAB#v=onepage&q=wirkung%20ketamin%20tolksdorf&f=false](https://books.google.de/books?id=42WdBwAAQBAJ&pg=PA80&lpg=PA80&dq=wirkung+ketamin+tolksdorf&source=bl&ots=32d7D9xm7w&sig=SwGs2Z_MEhD6yBCEhf5gjq3s5VQ&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwjjur2_qa_WAhVCPBoKHcZwB3IQ6AEIKzAB#v=onepage&q=wirkung%20ketamin%20tolksdorf&f=false). 18.09.2017.
- Tomlinson AJ, Chambers MA, McDonald RA, Delahay RJ. Association of quantitative interferon-gamma responses with the progression of naturally acquired *Mycobacterium bovis* infection in wild European badgers (*Meles meles*). *Immunology* 2015; 144: 263-70.
- Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends in immunology* 2011; 32: 66-72.

- Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e2177.
- Trinchieri G (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. Seminars in immunology. 83-8
- Trylich C. Diagnosis and no visible lesions in tuberculosis of cattle. The Canadian Veterinary Journal 1960; 1: 545.
- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and membrane potential in lymphocytes. Nature 1982; 295: 68-71.
- Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet Microbiol 1994; 40: 23-39.
- Usenik E, Cronkite E. Effect of Barbiturate Anesthetics on Leukocytes in normal and splenectomized dogs. Anesthesia & Analgesia 1965; 44: 167-70.
- Vilcek J. Interferons and other cytokines. Fields virology 1996;
- Voigt K (2007) Einfluss der patientenkontrollierten epiduralen Analgesie versus der patientenkontrollierten intravenösen Analgesie auf immunologische Parameter nach großen Wirbelsäulenoperationen. Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité
- Vordermeier H, Whelan A, Cockle P, Farrant L, Palmer N, Hewinson R. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clinical and diagnostic laboratory immunology 2001; 8: 571-8.
- Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. Infect Immun 2002; 70: 3026-32.
- Wallgren A. The time-table of tuberculosis. Tubercle 1948; 29: 245-51.

- Walton B. Effects of anaesthesia and surgery on immune status. *Br J Anaesth* 1979; 51: 37-43.
- Wang BS, Heacock E, Wu A, Mannick J. Generation of suppressor cells in mice after surgical trauma. *Journal of Clinical Investigation* 1980; 66: 200.
- Wards B, Collins D, De Lisle G. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995; 43: 227-40.
- Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Slaughter RE, Jones SL. Immune responses of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *J Wildl Dis* 2004; 40: 66-78.
- Waters WR, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL, Pitzer JE, Minion FC. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon production by blood leukocytes from *Mycobacterium bovis*-infected reindeer (*Rangifer tarandus*). *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 37-44.
- Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Orloski K, Nol P, Harrington NP, Olsen SC, Nonnecke BJ. Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay. *Vet Rec* 2008; 162: 203-8.
- Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 768542.
- Waters WR, Palmer MV. *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle and White-Tailed Deer: Translational Research of Relevance to Human Tuberculosis. *Ilar j* 2015; 56: 26-43.
- Weck PK, Apperson S, May L, Stebbing N. Comparison of the antiviral activities of various cloned human interferon- $\alpha$  subtypes in mammalian cell cultures. *Journal of General Virology* 1981; 57: 233-7.
- Weigand MA, Schmidt H, Zhao Q, Plaschke K, Martin E, Bardenheuer HJ. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. *Anesthesia & Analgesia* 2000; 90: 206-12.
- Wheelock EF. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965; 149: 310-1.

- WHO. Tuberculosis. 2016: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
- Wiesner H. Medikamentenkombination Xylazin-Ketamin als "Hellabrunner Mischung". Die Praxis der Wildtierimmobilisation. Parey, Berlin 1982:27-8.
- Wiesner H. Tierschutzrelevante neuentwicklungen zur optimierung der distanzimmobilisation. Tierärztliche Praxis 1998; 26: 225-33.
- Wilson GJ, Carter SP, Delahay RJ. Advances and prospects for management of TB transmission between badgers and cattle. Vet Microbiol 2011; 151: 43-50.
- Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguet C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüschoff S, Locht C, Brisse S. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathog 2008; 4: e1000160.
- Witchell J, Maddipati S, Wangoo A, Vordermeier M, Goyal M. Time dependent expression of cytokines in *Mycobacterium bovis* infected cattle lymph nodes. Vet Immunol Immunopathol 2010; 138: 79-84.
- Wong KW, Jacobs WR, Jr. Postprimary Tuberculosis and Macrophage Necrosis: Is There a Big ConNEction? MBio 2016; 7: e01589-15.
- Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. Res Vet Sci 1990; 49: 46-9.
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust Vet J 1991; 68: 286-90.
- Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, de Witte K, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1992; 31: 71-9.
- Wood PR, Rothel JS. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1994; 40: 125-35.

- Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81: 147-55.
- Woolson RF. 2008:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471462422.eoct979/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>  
15.08.2017.
- Xie Q-w, Calaycay J. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225.
- Yokoyama M, Itano Y, Mizobuchi S, Nakatsuka H, Kaku R, Takashima T, Hirakawa M. The effects of epidural block on the distribution of lymphocyte subsets and natural-killer cell activity in patients with and without pain. *Anesthesia & Analgesia* 2001; 92: 463-9.
- Zahler S, Heindl B, Becker B. Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 1999; 43: 1011-6.
- Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle A, Fermé M, Karoui C, Boschioli ML. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl Dis* 2008a; 44: 99-108.
- Zanella G, Duvauchelle A, Hars J, Moutou F, Boschioli M, Durand B. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Vet Rec* 2008b; 163: 43-7.
- Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8: 591-9.

## IX ANHANG

	IFN- $\gamma$ Standard			Verdünnungen Plasma Positivkontrolle I			PBS
	1	2	3	4	5	6	7
A	1,675	1,510	1,932	3,537	3,657	3,367	0,039
	0,055	0,071	0,075	0,107	0,099	0,091	0,036
	1,619	1,439	1,857	3,430	3,558	3,276	0,003
B	1,271	1,113	1,057	3,250	3,087	2,830	0,043
	0,072	0,055	0,057	0,083	0,102	0,090	0,040
	1,199	1,058	1,000	3,167	2,985	2,740	0,002
C	0,644	0,631	0,715	3,156	3,352	3,181	0,050
	0,043	0,050	0,049	0,077	0,077	0,075	0,047
	0,601	0,580	0,666	3,079	3,275	3,107	0,003
D	0,388	0,340	0,359	2,346	2,428	2,402	0,040
	0,043	0,046	0,043	0,074	0,075	0,086	0,036
	0,345	0,294	0,316	2,273	2,353	2,316	0,003
E	0,236	0,231	0,232	2,074	1,973	1,945	0,040
	0,039	0,048	0,043	0,062	0,071	0,063	0,037
	0,197	0,183	0,188	2,013	1,902	1,882	0,002
F	0,146	0,140	0,133	1,109	1,105	1,135	0,043
	0,039	0,040	0,039	0,051	0,057	0,087	0,040
	0,107	0,100	0,094	1,059	1,048	1,048	0,003
G	0,108	0,106	0,108	0,720	0,594	0,631	0,040
	0,038	0,039	0,040	0,047	0,052	0,052	0,037
	0,071	0,067	0,068	0,673	0,542	0,580	0,002
H	0,093	0,089	0,105	0,371	0,423	0,372	0,049
	0,038	0,040	0,053	0,049	0,048	0,046	0,046
	0,055	0,049	0,052	0,322	0,375	0,327	0,003

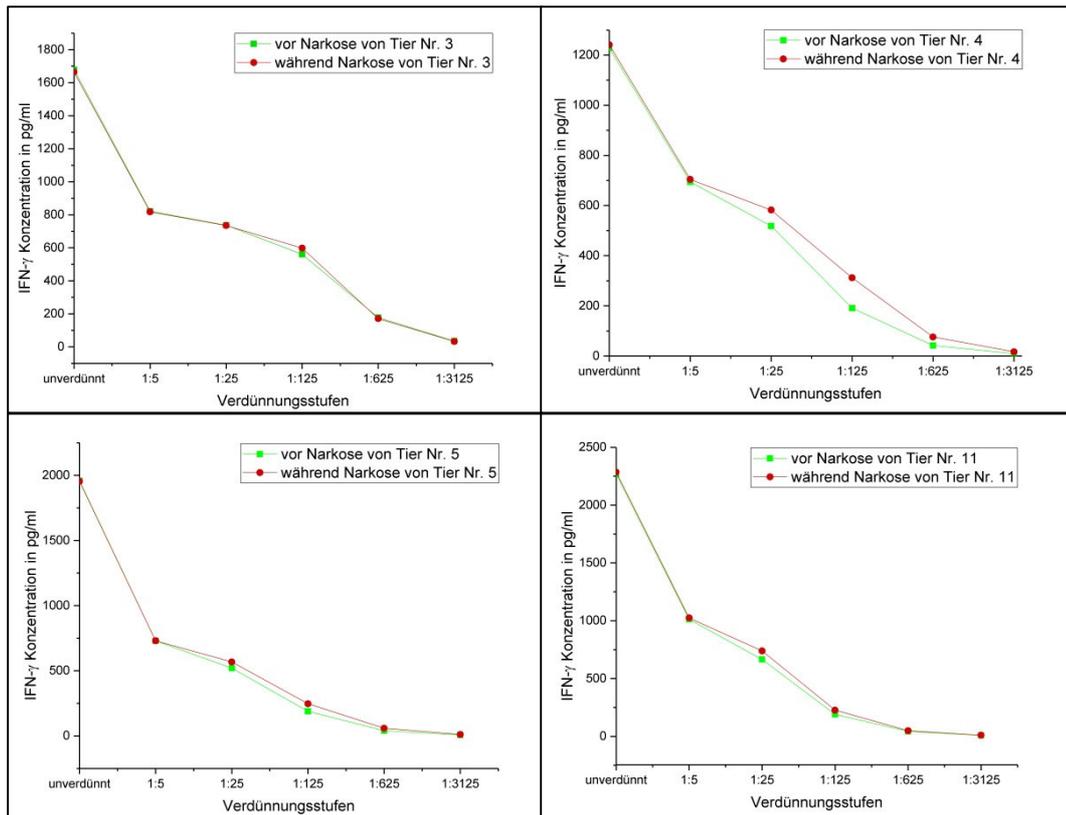
**Abbildung A1: Resultierende OD-Werte im ELISA im Zuge der Erstellung von Positivkontrolle I**

Es wurden die OD-Werte, die maßgeblich für die IFN- $\gamma$ -Freisetzung sind, für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Positivkontrolle I gemessen. Dabei wurde die Positivkontrolle im unverdünnten Zustand bis hin zu einer Verdünnung von 1:128 untersucht. Die entsprechende Plattenbelegung ist in Tabelle A1 des Anhangs dargestellt.

	IFN- $\gamma$ Standard			Plasma nach Stimulation mit PWM			Plasma nach Stimulation mit ConA			Plasma nach Stimulation mit PH			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,947	1,426	1,438	3,292	3,303	3,382	0,954	0,871	0,893	0,426	0,436	0,423	Endpoint
	0,156	0,049	0,053	0,094	0,076	0,077	0,056	0,055	0,049	0,055	0,047	0,043	Lm1 450
	0,791	1,377	1,385	3,197	3,227	3,305	0,898	0,816	0,844	0,371	0,390	0,381	Lm2 650
B	1,303	1,317	1,262	2,819	2,957	2,842	0,636	0,575	0,626	0,269	0,298	0,288	Automix: Off
	0,053	0,055	0,067	0,159	0,068	0,070	0,046	0,047	0,046	0,056	0,049	0,043	Calibrate: On
	1,250	1,263	1,194	2,660	2,888	2,773	0,589	0,528	0,580	0,213	0,248	0,245	Column Priority
C	0,775	0,747	0,726	2,057	2,029	2,114	0,374	0,340	0,358	0,181	0,219	0,193	C. Speed: Normal
	0,045	0,048	0,048	0,062	0,079	0,057	0,052	0,051	0,044	0,041	0,056	0,044	Start Read:
	0,730	0,699	0,679	1,995	1,950	2,057	0,322	0,289	0,314	0,140	0,162	0,149	14:51 15.03.2016
D	0,417	0,422	0,412	1,335	1,238	1,274	0,222	0,201	0,217	0,125	0,129	0,127	
	0,042	0,043	0,042	0,064	0,058	0,052	0,041	0,043	0,043	0,041	0,040	0,039	
	0,375	0,379	0,370	1,271	1,180	1,222	0,181	0,158	0,174	0,085	0,089	0,087	
E	0,250	0,244	0,231	0,701	0,739	0,656	0,150	0,136	0,140	0,094	0,096	0,096	
	0,039	0,044	0,042	0,050	0,047	0,047	0,051	0,041	0,041	0,040	0,040	0,040	
	0,211	0,200	0,189	0,651	0,692	0,609	0,100	0,095	0,099	0,054	0,057	0,056	
F	0,151	0,155	0,148	0,402	0,411	0,425	0,103	0,102	0,101	0,090	0,079	0,078	
	0,038	0,042	0,040	0,046	0,043	0,044	0,040	0,041	0,041	0,049	0,039	0,039	
	0,114	0,113	0,108	0,356	0,369	0,381	0,064	0,061	0,060	0,040	0,039	0,039	
G	0,108	0,105	0,101	0,246	0,248	0,238	0,081	0,081	0,091	0,086	0,073	0,076	
	0,038	0,040	0,040	0,050	0,041	0,041	0,039	0,040	0,047	0,052	0,044	0,046	
	0,070	0,065	0,061	0,197	0,207	0,197	0,041	0,041	0,044	0,034	0,029	0,030	
H	0,077	0,079	0,093	0,155	0,152	0,159	0,077	0,074	0,070	0,066	0,068	0,080	
	0,038	0,040	0,059	0,041	0,039	0,041	0,046	0,043	0,039	0,041	0,042	0,053	
	0,039	0,039	0,035	0,114	0,112	0,117	0,031	0,030	0,031	0,026	0,026	0,027	

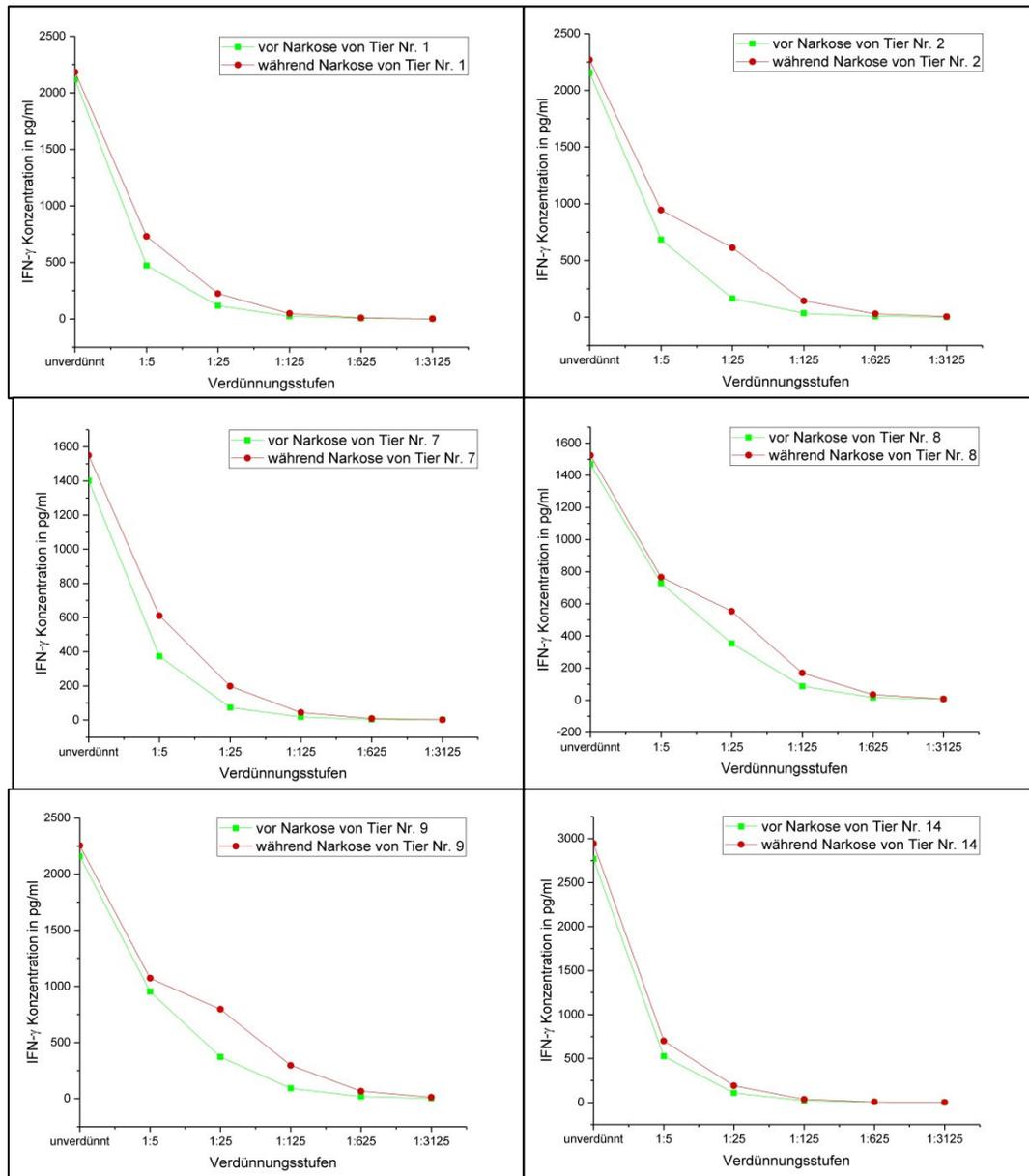
**Abbildung A2: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Plasma, welchem eine Stimulation mit einem der drei Lektine (PWM, ConA und PH) vorausging**

Die vorangegangene Plattenbelegung ist der Tabelle A2 des Anhangs zu entnehmen. Es ist deutlich zu sehen, dass mit PWM die höchsten Werte erreicht werden. Selbst in einer Verdünnung von 1:4 liegen die Werte noch deutlich oberhalb jener von ConA und PH im unverdünnten Zustand. Als zweitbestes Stimulans erwies sich ConA; die schlechtesten Werte wurden bei Einsatz von PH gemessen.



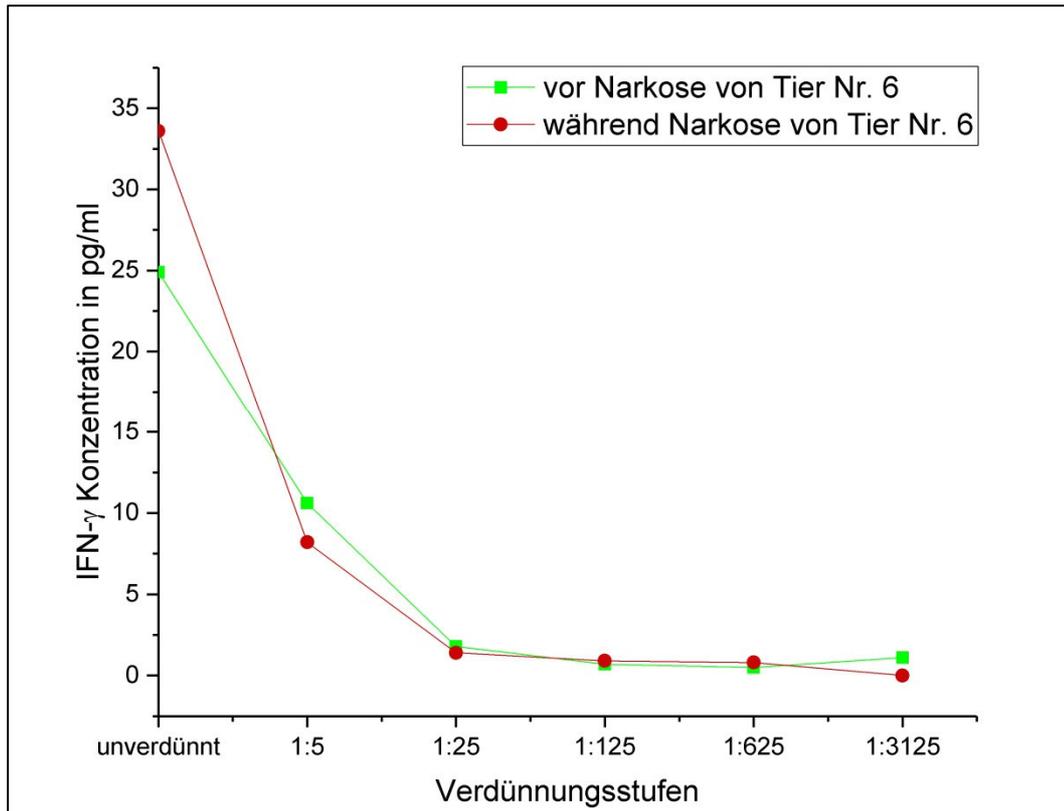
**Abbildung A3: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen (1:5)**

Neben der in IV, 2.1 dargestellten Narkose von Tier Nr. 13 wurden auch im Falle der Narkosen von den Tieren Nrn.: 3, 4, 5 und 11 nahezu identische IFN- $\gamma$ -Konzentrationen vor und während der Anästhesie gemessen.



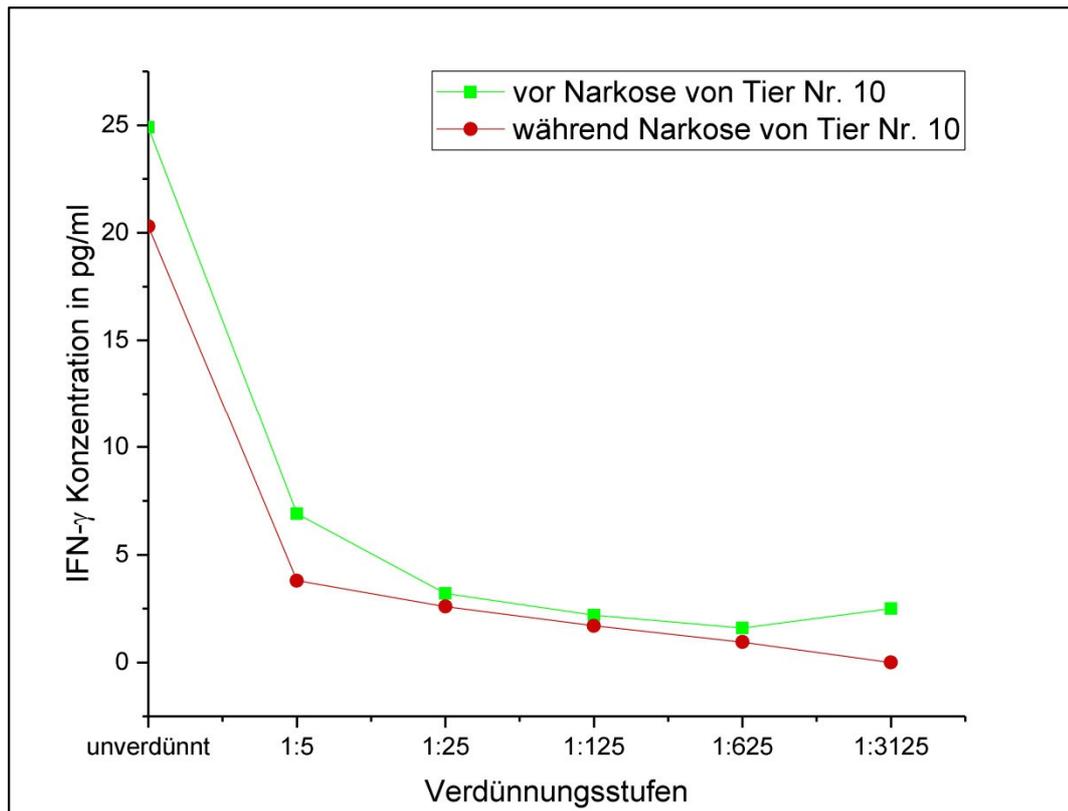
**Abbildung A4: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen**

Neben der in IV, 2.2 dargestellten Narkose von Tier Nr. 12 wurden auch im Falle der Narkosen von den Tieren Nrn.: 1, 2, 7, 8, 9 und 14 höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen während der Anästhesie als davor gemessen.



**Abbildung A5: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben des Tieres aus Narkose Nr. 6**

Das Rind aus Narkose Nr. 6 wurde vorbereitlich mit Cortison behandelt. Es erfolgte eine deutlich geringere Freisetzung an IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den Resultaten der unbehandelten Tiere (Abschnitt IV, 2.1 und 2.2). Die Ergebnisse dieses Versuchsdurchlaufs wurden nicht in der Interpretation der Studie, ob eine Narkose Leukozyten in ihrer Vitalität negativ beeinflusst, berücksichtigt.



**Abbildung A6: Darstellung der berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (pg/ml) für unterschiedliche Verdünnungsstufen der Plasmaproben des Tieres aus Narkose Nr. 10**

Das Rind aus Narkose Nr. 10 hatte vorberichtlich ggr. Fieber. Es erfolgte eine deutlich geringere Freisetzung an IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den Resultaten der Tiere ohne Fieber (Abschnitt IV, 2.1 und 2.2). Die Ergebnisse dieses Versuchsdurchlaufs wurden nicht in der Interpretation der Studie, ob eine Narkose Leukozyten in ihrer Vitalität negativ beeinflusst, berücksichtigt.

		IFN- $\gamma$ Standard			Narkose Rotwild 1 PWM I			Narkose Rotwild 1 PWM II			PBS		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lm1 Lm2 Lm1 - Lm2	A	0,895	0,889	0,870	3,278	3,270	3,301	3,270	3,359	3,230	0,005	-0,003	0,014
		0,017	0,012	0,009	0,018	0,020	0,040	0,017	0,018	0,020	0,007	-0,003	0,000
		0,878	0,876	0,860	3,260	3,251	3,262	3,253	3,341	3,210	-0,002	-0,000	0,013
B	0,855	0,876	0,887	1,716	1,741	1,684	1,652	1,699	1,637	-0,005	-0,006	0,002	
	0,008	0,004	0,004	0,008	0,010	0,010	0,007	0,016	0,009	-0,002	-0,003	-0,003	
	0,847	0,872	0,883	1,708	1,731	1,675	1,645	1,683	1,628	-0,003	-0,003	0,005	
C	0,440	0,467	0,453	0,426	0,467	0,459	0,443	0,473	0,488	-0,004	0,001	-0,005	
	0,000	-0,001	-0,000	-0,000	-0,001	0,000	-0,001	0,016	0,001	-0,002	0,002	-0,002	
	0,440	0,468	0,453	0,427	0,467	0,458	0,444	0,457	0,487	-0,002	-0,001	-0,003	
D	0,227	0,239	0,239	0,091	0,111	0,099	0,095	0,095	0,094	-0,006	-0,006	-0,005	
	-0,003	-0,002	-0,001	-0,003	0,017	0,001	-0,003	0,002	-0,002	-0,003	-0,003	-0,002	
	0,230	0,241	0,240	0,094	0,094	0,098	0,098	0,093	0,096	-0,003	-0,003	-0,003	
E	0,112	0,119	0,115	0,018	0,032	0,017	0,016	0,015	0,014	0,014	-0,006	0,027	
	-0,004	0,004	-0,002	-0,002	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,003	0,016	-0,003	-0,002	
	0,116	0,115	0,117	0,019	0,034	0,018	0,018	0,018	0,017	-0,002	-0,003	0,029	
F	0,053	0,052	0,056	-0,001	0,000	0,000	0,014	-0,001	0,006	-0,002	0,004	-0,006	
	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	-0,003	-0,002	0,001	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	-0,003	
	0,057	0,056	0,058	0,002	0,003	0,003	0,013	0,002	0,008	0,001	0,007	-0,003	
G	0,029	0,028	0,024	-0,002	-0,006	-0,003	-0,001	-0,005	-0,006	-0,001	0,000	-0,001	
	-0,002	-0,002	-0,003	-0,002	-0,003	-0,003	0,002	-0,003	-0,003	-0,003	-0,000	-0,003	
	0,031	0,030	0,027	-0,000	-0,003	-0,000	-0,003	-0,002	-0,003	0,002	0,000	0,002	
H	0,012	0,010	0,013	-0,005	-0,006	-0,005	0,001	-0,005	-0,006	0,026	0,020	-0,005	
	-0,003	-0,003	-0,003	-0,004	-0,003	-0,003	0,002	-0,003	-0,003	0,025	0,022	-0,003	
	0,015	0,013	0,016	-0,002	-0,003	-0,003	-0,001	-0,002	-0,004	0,001	-0,002	-0,002	

Endpoint

Lm1 450

Lm2 650

Automix: Off

Calibrate: On

Column Priority

C. Speed: Normal

Start Read:

14:29 16.11.2016

**Abbildung A7: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben eines anästhesierten Tieres (Narkose von Rotwild Nr. 1)**

In diesem Durchlauf wurden zwei verschiedene Plasmaproben (nach Stimulation mit PWM aus unterschiedlichen Chargen) von einem anästhesierten Rotwild untersucht.

		IFN- $\gamma$ Standard			Narkose Rotwild 2			Rotwild tot			PBS			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Lm1	→	0,506	0,492	0,499	3,660	3,641	3,659	1,405	1,442	1,442	-0,003	-0,005	-0,005	Endpoint
Lm2	→	-0,002	0,002	-0,000	0,027	0,026	0,027	0,005	0,006	0,006	-0,002	-0,004	-0,004	Lm1 450
Lm1 - Lm2	→	0,508	0,491	0,499	3,632	3,615	3,632	1,400	1,435	1,436	-0,000	-0,001	-0,000	Lm2 650
A		0,727	0,738	0,747	3,433	3,407	3,396	0,405	0,385	0,390	-0,005	-0,006	-0,006	Automix: Off
B		0,005	0,020	0,016	0,021	0,019	0,027	-0,001	-0,002	-0,001	-0,003	-0,004	-0,004	Calibrate: On
		0,722	0,719	0,731	3,412	3,389	3,369	0,406	0,386	0,391	-0,001	-0,002	-0,002	Column Priority
C		0,371	0,376	0,379	1,381	1,392	1,362	0,082	0,085	0,085	-0,006	-0,004	-0,003	C. Speed: Normal
		-0,003	-0,001	-0,001	0,005	0,006	0,006	-0,003	-0,002	-0,001	-0,003	-0,004	-0,003	Start Read:
D		0,374	0,377	0,381	1,376	1,386	1,356	0,085	0,087	0,086	-0,002	-0,001	-0,000	13:42 02.12.2016
		0,196	0,191	0,170	0,304	0,294	0,331	0,014	0,028	0,014	-0,006	0,005	0,006	
E		-0,004	-0,002	-0,003	-0,002	-0,002	-0,001	-0,004	-0,003	-0,003	-0,004	0,005	0,006	
		0,200	0,193	0,173	0,306	0,296	0,332	0,018	0,031	0,017	-0,003	0,000	-0,001	
F		0,095	0,095	0,076	0,055	0,058	0,063	-0,002	-0,000	0,011	-0,005	-0,004	-0,004	
		-0,004	-0,003	-0,003	-0,002	0,000	0,002	-0,003	-0,003	-0,004	-0,003	-0,002	-0,002	
G		0,100	0,098	0,079	0,057	0,058	0,062	0,002	0,003	0,015	-0,002	-0,002	-0,002	
		0,050	0,045	0,036	0,007	0,008	0,007	0,005	0,025	-0,005	-0,004	0,001	-0,004	
H		-0,005	-0,002	-0,004	-0,004	-0,003	-0,003	0,005	0,025	-0,003	-0,002	-0,000	-0,003	
		0,055	0,047	0,040	0,011	0,010	0,010	0,000	0,000	-0,002	-0,002	0,001	-0,001	
		0,020	0,020	0,015	-0,005	-0,005	-0,000	0,003	-0,000	-0,005	0,016	-0,006	-0,006	
		-0,004	-0,001	-0,004	-0,005	-0,004	-0,002	-0,004	0,000	-0,004	0,012	-0,004	-0,004	
		0,024	0,021	0,019	-0,000	-0,000	0,002	0,007	-0,001	-0,002	0,004	-0,002	-0,002	
		0,003	0,008	0,013	0,011	-0,004	-0,007	-0,006	0,051	-0,006	0,030	-0,006	0,003	
		-0,004	-0,004	-0,002	0,014	-0,004	-0,004	-0,005	0,023	-0,004	0,030	-0,004	0,005	
		0,007	0,012	0,015	-0,002	0,000	-0,003	-0,002	0,028	-0,002	-0,000	-0,002	-0,002	

**Abbildung A8: Resultierende OD-Werte im ELISA aus der Untersuchung von Rotwildplasmaproben eines anästhesierten Tieres (Narkose von Rotwild Nr. 2) sowie eines geschlachteten Tieres (Rotwild Nr. 3)**

**Tabelle A1: Schematische Darstellung einer Plattenbelegung für die Erstellung einer Positivkontrolle**

IFN- $\gamma$ -Standard in pg/ml			Verdünnungsstufen Plasma (Positivkontrolle I)			PBS
500	500	500	unverdünnt			
250	250	250	1:2	1:2	1:2	
125	125	125	1:4	1:4	1:4	
62,5	62,5	62,5	1:8	1:8	1:8	
31,25	31,25	31,25	1:16	1:16	1:16	
15,6	15,6	15,6	1:32	1:32	1:32	
7,8	7,8	7,8	1:64	1:64	1:64	
3,9	3,9	3,9	1:128	1:128	1:128	

Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung wurde für die Positivkontrollen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen gemessen. Die Versuchsdurchläufe wurden mehrmals wiederholt, um stabile Werte der Kontrollen zu erhalten.

**Tabelle A2: Schematische Darstellung der Plattenbelegung für die Auswahl geeigneter Stimulanzen im Zuge der Herstellung einer Positivkontrolle**

IFN- $\gamma$ -Standard in pg/ml			Verdünnungsstufen Plasma (nach Stimulation mit PWM)			Verdünnungsstufen Plasma (nach Stimulation mit ConA)			Verdünnungsstufen Plasma (nach Stimulation mit PH)		
500	500	500	1:4	1:4	1:4	unverdünnt			unverdünnt		
250	250	250	1:8	1:8	1:8	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
125	125	125	1:16	1:16	1:16	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4	1:4
62,5	62,5	62,5	1:32	1:32	1:32	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8
31,25	31,25	31,25	1:64	1:64	1:64	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
15,6	15,6	15,6	1:128	1:128	1:128	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
7,8	7,8	7,8	1:256	1:256	1:256	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64
3,9	3,9	3,9	1:512	1:512	1:512	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128

Parallel zur Erstellung einer Positivkontrolle wurden die drei Lektine: Pokeweed Mitogen (PWM), Concanavalin A (ConA) und Phytohaemagglutinin (PH) auf ihr Potential, Leukozyten zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  zu stimulieren getestet (siehe Abschnitt III, 3.2).

## X DANKSAGUNG

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Professor Straubinger aussprechen, welcher mir nicht nur ermöglicht hat, unter seiner Leitung diese Dissertation anzufertigen, sondern mir bereits im Vorfeld tatkräftige Unterstützung im Zuge der Bewerbung um ein Stipendium entgegengebracht hat. Seine fachliche Kompetenz und die stets unterstützenden und aufmunternden Worte in Zeiten, in denen nicht alles nach Plan lief, wusste ich sehr zu schätzen. Vielen Dank für die gute Betreuung, ihren Optimismus und die herzliche Art und Weise im Umgang mit ihren Doktoranden.

Bei der Hanns-Seidel Stiftung möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung während meiner Arbeit als Doktorandin bedanken. Durch dieses Stipendium wurde mir ermöglicht eine Promotion anzutreten. Vielen Dank dafür!

Auch meinen Betreuerinnen, Dr. Shari Fell und Dr. Anna Lena Rettinger, möchte ich danke sagen. Ihr wart sowohl in fachlicher als auch in persönlicher Hinsicht jederzeit eine große Stütze und tragt mitunter einen Hauptteil an den schönen Erinnerungen, welche ich an meine Zeit als Doktorandin im Institut haben werde. Vielen Dank für die vielen lustigen Momente, die Schnitzel- und Knödelausflüge und natürlich auch für die helfenden Worte in etwas dunkleren Zeiten.

Auch dem ganzen Team und allen Doktoranden des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie möchte ich danke sagen für diese unvergessliche Zeit.

Mama und Papa, euch kann ich nicht genug danken, für alles was ihr für mich während meiner Zeit als Doktorandin und während meines ganzen Studiums getan habt! Ohne euch hätte ich meine Ziele und Träume nicht in dieser Form verwirklichen können. Für eure unerschöpfliche moralische und nicht zu vergessen finanzielle Stütze, eurer Vertrauen und euren Rückhalt möchte ich euch vielmals danke sagen!!!

Oma und Opa, es macht mich ganz besonders stolz, dass ich mit euch diesen großen Tag feiern darf. Ich danke euch für die stets ermutigenden Worte und die tatkräftige Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Liebe Tante Marianne und lieber Onkel Sepp, auch euch gebührt mein größter Dank. Als Team „Wir werden Doktor“ habt ihr mit

vollem Einsatz diese Arbeit begleitet. Vielen Dank für die Unterstützung während der Dissertation aber auch während des gesamten Studiums. Lieber Florian, als mein Bruder hast auch du mich zusammen mit Melanie, Felix und Leo durch diese Zeit begleitet. Ich danke euch für die aufmunternden Worte und die fröhlichen Momente während der heimatlichen Ausflüge.

Berno, dir möchte ich für deine Geduld, deine immerzu positiven und herzlichen Worte danken, durch welche mir nie meine Zuversicht und mein Ehrgeiz verloren ging. Vielen Dank für all die schönen Momente, die ich auch während dieser Zeit mit dir verbringen durfte. Ohne dich wäre das Alles nicht annähernd so schön. Danke!!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, mit denen ich unbeschreiblich schöne Zeiten während der Doktorarbeit und während des ganzen Studiums in München verbringen durfte. Danke Caro, Krissi, Shari, Laura, Hannah und Petra. Diese Zeit wird mir immer als großes Fest in Erinnerung bleiben.