

**Differenzielle Zytokinantwort bei Ziegen nach experimenteller
Infektion mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gudrun Walter

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. C. Menge

und

dem Institut für molekulare Pathogenese
Friedrich-Loeffler-Institut in Jena

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. C. Menge und Dr. med. vet. H. Köhler

**Differenzielle Zytokinantwort bei Ziegen nach experimenteller
Infektion mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Gudrun Walter

Tierärztin aus Oldenburg in Oldenburg

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter Prof. Dr. C. Menge
Prof. Dr. C. Ewers
Prof. Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 09.06.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
---------------------------------	----------

Abkürzungsverzeichnis	VI
------------------------------------	-----------

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
	2.1 <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	3
	2.1.1 Einordnung und Erregereigenschaften	3
	2.1.2 Vorkommen in der Umwelt und natürliche Wirte des Erregers	4
	2.2 Paratuberkulose	5
	2.2.1 Übertragungswege und Empfänglichkeit	5
	2.2.2 Geschätzte Prävalenz der Paratuberkulose und Tragweite der Bekämpfung	6
	2.2.3 Bekämpfungsstrategien	7
	2.2.4 Tiermodelle	9
	2.2.5 Allgemeiner Krankheitsverlauf und Wirt-Erreger-Interaktionen	10
	2.2.6 Unterschiede in der Ausprägung von Krankheitsmerkmalen	13
	2.2.7 Bedeutung der in dieser Studie untersuchten Zytokine für den Krankheitsverlauf der Paratuberkulose	15
	2.3 Diagnostik der Paratuberkulose mittels direktem Erregernachweis.....	20
	2.3.1 Nachweis von MAP mit Hilfe kultureller Anzucht	20
	2.3.2 Nachweis von MAP-spezifischen Gensequenzen	22
	2.4 Diagnostik der Paratuberkulose mittels indirektem Erregernachweis	23
	2.4.1 Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern	23
	2.4.2 Nachweis der zellvermittelten Immunantwort auf MAP	25
3	Zielsetzung der Studie	35
4	Material und Methoden	37
	4.1 Allgemeiner Versuchsablauf	37
	4.2 Versuchstiere	38
	4.2.1 Herkunft und Gesundheitsstatus	38
	4.2.2 Einteilung der Tiere in Gruppen	38
	4.2.3 Haltung und Fütterung	41
	4.3 Inokulation	41
	4.3.1 Vorbereitung des Inokulums	41

4.3.2	Prüfung des Inokulums	42
4.3.3	Inokulation der Versuchstiere	43
4.4	Weitere während des Tierversuchs erhobene Daten, deren Ergebnisse in diese Studie einfließen	43
4.4.1	Mikrobiologische Untersuchung zum Nachweis von Mykobakterien in Kot- und Organproben	43
4.4.2	Serologische Untersuchung zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP	44
4.5	Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Stimulation	45
4.5.1	Beprobungsplan	45
4.5.2	Blutentnahme	46
4.5.3	Isolation von PBMC	46
4.5.4	<i>Ex vivo</i> Restimulation der PBMC	46
4.6	Gewinnung der Proben nach der Stimulation	48
4.6.1	Zellkulturüberstände für die ELISA	48
4.6.2	Zelllysate für die Genexpressionsanalyse	49
4.6.3	Gewinnung und Immundekoration der PBMC zur Analyse im Durchflusszytometer	49
4.7	Bearbeitung der Proben	51
4.7.1	IFN- γ -Test und IL-10-Test	51
4.7.2	Real-time PCR	54
4.7.3	Analyse der Proben im Durchflusszytometer	60
4.8	Auswertung auf Einzeltierebene	63
4.9	Statistische Auswertung	64
4.9.1	Analyse der methodischen Varianz	64
4.9.2	Darstellung der Daten und Gruppenvergleiche	65
5	Ergebnisse	68
5.1	Kontrolle des Infektionsstatus der Tiere	68
5.1.1	Kultureller MAP-Nachweis in Kotproben	68
5.1.2	Serologischer Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion	68
5.1.3	Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren	71
5.1.4	Kultureller MAP-Nachweis in Organproben zum Sektionszeitpunkt	71
5.2	Vorgehen bei der Auswertung der Daten des IFN-γ-Tests, des IL-10-Tests, der Genexpressionsanalysen und der Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression auf T-Gedächtniszellen	75
5.3	Ergebnisse des IFN-γ-Tests	75

5.3.1	Untersuchung der Varianz der mit dem IFN- γ -ELISA ermittelten Daten und des Einflusses von Rangordnungsneubildungen auf die Freisetzung von IFN- γ	76
5.3.2	IFN- γ -Freisetzung in unstimulierten PBMC	79
5.3.3	Induzierbarkeit erhöhter IFN- γ -Freisetzung durch ConA	80
5.3.4	IFN- γ -Freisetzung in restimulierten PBMC	81
5.3.5	Einfluss IL-10 blockierender Antikörper auf die IFN- γ -Freisetzung restimulierter PBMC	88
5.3.6	Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren	90
5.4	Ergebnisse des IL-10-Tests	92
5.4.1	Untersuchung der Varianz der mit dem IL-10-ELISA ermittelten Daten	92
5.4.2	IL-10-Freisetzung in unstimulierten PBMC	92
5.4.3	Induzierbarkeit der IL-10-Freisetzung durch LPS	94
5.4.4	IL-10-Freisetzung in restimulierten PBMC	96
5.4.5	Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren	100
5.5	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	102
5.5.1	Untersuchung der Varianz der in der real-time PCR ermittelten Daten und der Robustheit der Genexpression von GAPDH	102
5.5.2	Genexpression der untersuchten Zytokine in unstimulierten PBMC	106
5.5.3	Induzierbarkeit von Änderungen in der Genexpression der untersuchten Zytokine durch ConA bzw. LPS	114
5.5.4	Expression der untersuchten Zytokine in restimulierten PBMC	116
5.5.5	Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren	124
5.6	Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression auf unstimulierten und restimulierten T-Gedächtniszellen	125
5.6.1	Kontrolle der angewandten Methodik	125
5.6.2	Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten PBMC	125
5.6.3	Induzierbarkeit von Änderungen in der Expression von CD25 und CD26 auf PBMC durch ConA	127
5.6.4	Expression von CD25 bzw. CD26 auf restimulierten PBMC	133
5.6.5	Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren	138
5.7	Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern der zell-vermittelten Immunität und dem Infektionsverlauf	140
5.7.1	Definition der Teilgruppen für den kulturellen MAP-Nachweis in Kot- und	

Organproben und die MAP-spezifische Antikörperreaktion	140
5.7.2 Die zelluläre Immunantwort bei Kurzausscheidern bzw. Dauerausscheidern	143
5.7.3 Die zelluläre Immunantwort bei den Teilgruppen AK negativ bzw. AK positiv	144
5.7.4 Die zelluläre Immunantwort bei Kn-, PB- und MB-Tieren	150
5.8 Zeitliche Einordnung der inokulationsbedingten Veränderungen und Korrelationen zwischen relevanten Parametern der zellvermittelten Immunität	159
6 Diskussion	163
6.1 Ziele, Hypothesen und wichtigste Ergebnisse	163
6.2 Hypothese 1: Das angewandte Inokulationsschema ist geeignet, eine Infektion mit MAP im Tiermodell sicherzustellen.	164
6.2.1 Vergleich mit der natürlichen Infektion	165
6.2.2 Vergleich mit experimentellen Infektionen in anderen Studien	166
6.2.3 Mögliche Ursachen für Unterschiede nach experimenteller und natürlicher Infektion	166
6.2.4 Zwischenfazit	168
6.3 Hypothese 2: Die angewandten Methoden sind geeignet, die zelluläre Immunantwort auf MAP bei Kontroll- und Versuchstieren darzustellen.	168
6.3.1 Varianzanalysen	169
6.3.2 Positivkontrollen	170
6.3.3 Robustheit von GAPDH	171
6.3.4 Einfluss Rangordnungsstress	172
6.3.5 Zwischenfazit	173
6.4 Hypothese 3: Die Kontroll- und Versuchstiere lassen sich anhand ihrer zellulären Immunantwort auf MAP differenzieren und dies früher als anhand der humoralen Immunantwort bzw. der MAP Ausscheidung.	173
6.4.1 IFN- γ -Test	174
6.4.2 IL-10-Test	174
6.4.3 Genexpression von IL-12p40	175
6.4.4 Genexpression von IL-18	176
6.4.5 Genexpression von TGF- β	176
6.4.6 Genexpression von TNF- α	176
6.4.7 Expression von CD25 bzw. CD26 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Gedächtniszellen	177
6.4.8 Übertragbarkeit auf Verhältnisse nach natürlicher Infektion	179
6.4.9 Zwischenfazit	179
6.5 Hypothese 4: Die Spezifität bzw. die Sensitivität des IFN-γ-Tests lässt sich durch Verwendung MAP-spezifischer Antigene bzw. IL-10 blockierender Antikörper steigern.	181

6.5.1	MAP-spezifische Antigene für die Restimulation im IFN- γ -Test	181
6.5.2	Nutzen des IL-10-Blocks bei der Restimulation für den IFN- γ -Test	182
6.5.3	Zwischenfazit	183
6.6	Hypothese 5: Immunpathologische Prozesse in der frühen Phase der Infektion bestimmen den Verlauf der Erkrankung bei Ziegen.	183
6.6.1	Besiedlung der Organe mit MAP im Infektionsverlauf	183
6.6.2	Unterschiede in der Besiedlung durch MAP zwölf Monate <i>p.i.</i> als Kriterium für die Einteilung in Teilgruppen	184
6.6.3	Vergleiche zwischen den Teilgruppen	185
6.6.4	Ausprägung der zellulären Immunantwort in den Teilgruppen	189
6.6.5	Zwischenfazit	193
6.7	Offene Fragen und Verbesserungsoptionen	195
6.8	Bedeutung für die Paratuberkuloseforschung	196
7	Zusammenfassung	198
8	Summary	201
9	Literaturverzeichnis	204
10	Anhang	231
10.1	Übersicht über verwendete Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Lösungen.....	231
10.2	Übersicht über verwendeten Inokulationsstamm, verwendete Antigene, Antikörper, Kits und Mastermixe.....	234
10.3	Übersicht über verwendete Puffer und Medien.....	235
10.3.1	Puffer und Medien für die Vorbereitung des Inokulums, für die PBMC-Isolation und die Zellkultur.....	235
10.3.2	Puffer für den IFN- γ - bzw. den IL-10-ELISA.....	236
10.4	Beprobungsplan	237
10.5	Den Ergebnisteil ergänzende Tabellen	241
10.5.1	IL-10-Test	241
10.5.2	Genexpressionsanalyse	242
10.5.3	Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression	245
10.5.4	Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern	248
11	Abbildungsverzeichnis	249
11.1	Abbildungen	249
11.2	Tabellen	251

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	lateinisches Präfix, zu Deutsch: Bis zu (auffüllen auf)
APC	Allophycocyanin
APPD	<i>avian purified protein derivative</i> , Aviäres aufgereinigtes Protein Derivat oder Geflügeltuberkulin
<i>Aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
BFM	Bakterienfeuchtmasse
BT	Beprobungsturnus
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
d	Tag(e)
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , zu Deutsch: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E _{gemittelt}	gemittelte Effektivität der PCR
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , Bezeichnung eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae</i> , „und andere“
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSC	<i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
I.E.	Internationale Einheit
IFN-γ	Interferon-γ
IFN-γ-Test	Interferon-γ-Test
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IS	Insertionssequenz
JPPD	<i>johnin purified protein derivative</i> , Johnin
K1, K2, K3, K4	Gruppen scheininokulierter Ziegen

KBE	koloniebildende Einheiten
KT	Kontrolltiere, scheininokulierte Ziegen
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
LW	Lebenswoche
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
max.	maximal
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MAT	Milchaustauscher
MB-Tier	Tier mit vorwiegend multibazillären Läsionen
MdFI	Median der Fluoreszenzintensität
MdFI _Q	Quotient aus dem MdFI eines Stimulationsansatzes und dem MdFI der zugehörigen Mediumkontrolle
mg	Milligramm
min	Minute
MK	Mediumkontrolle
ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	Mastermix mit Enzym (Reverse Transkriptase bei der RT, SYBR® Green PCR Master Mix bei der real-time PCR)
MM RTK	Mastermix ohne Reverse Transkriptase
MRG	Mikroreaktionsgefäß/e
n	Anzahl der Elemente der Stichprobe
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i> , Natürliche Killerzellen
nM	nanomolar
NTC	<i>No Template Control</i> = Kontrollansatz der reversen Transkription ohne Zugabe von RNA-Extrakt
OD	optische Dichte
<i>p.i.</i>	<i>post inoculationem</i> , nach der Infektion
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PB-Tier	Tier mit vorwiegend paucibazillären Läsionen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RTK	Reverse-Transkription-Kontrolle = Kontrollansatz mit RNA-Extrakt, jedoch ohne Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)

S/P-Ratio	<i>sample/positive-ratio</i> , Verhältnis zwischen Probe und Positivkontrolle
SI	Stimulations-Index
sp.	Subspzies, singular
spp.	Subspezies, plural
SSC	<i>sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> , Transformierender Wachstumsfaktor β
Tiernr.	Tiernummer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	engl. <i>unit</i> , zu Deutsch: Einheit
V1, V2, V3, V4	Gruppen inokulierter Ziegen
VGr	Versuchsgruppe, umfasst: V1, V2, V3, V4, K1, K2, K3, K4
vs	lat. <i>versus</i> , zu Deutsch: Gegen(übergestellt)
VT	Versuchstiere, inokulierte Ziegen
WI	Wachstumsindex
ZKÜ	Zellkulturüberstand/-überstände

1 Einleitung

Obwohl die Paratuberkulose 120 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung bereits Ziel unzähliger Studien war, fehlt bisher ein effizientes und international umsetzbares Bekämpfungskonzept. Die Infektion mit dem *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) kann nicht sinnvoll medikamentös therapiert werden und derzeit verfügbare Impfungen schützen weder die Tiere vor der Infektion noch verhindern sie sicher die Weiterverbreitung der Erkrankung (St-Jean and Jernigan 1991, Kormendy 1994, van Schaik, Kalis *et al.* 1996, Fecteau and Whitlock 2011, Juste 2012). Somit bleiben als Mittel zur Bekämpfung der Paratuberkulose nur die Vermeidung von Neuinfektionen und die Merzung betroffener Tiere. Um dies konsequent umsetzen zu können, mangelt es allerdings an adäquaten diagnostischen Mitteln (Whittington and Sergeant 2001, Tripathi, Periasamy *et al.* 2006, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2011, Timms, Gehringer *et al.* 2011). Vor allem im Jungtialter besitzen die derzeit verfügbaren diagnostischen Tests eine sehr geringe Sensitivität, weshalb der Infektionsstatus zugekaufter Jungtiere nicht sicher bestimmt werden kann.

Die Entwicklung und Evaluierung neuer oder optimierter diagnostischer Methoden wird dabei vor allem durch drei in der Art des Erregers bzw. in der Pathogenese der Paratuberkulose begründete Aspekte erschwert:

1. Der derzeitige Gold-Standard zum Nachweis der Paratuberkulose, der direkte Nachweis von MAP nach kultureller Anzucht aus Kot- oder Organproben, ist in seiner Sensitivität unvollkommen (Sackett, Carr *et al.* 1992, Whitlock, Wells *et al.* 2000, Timms, Gehringer *et al.* 2011). Dies liegt daran, dass MAP während der Latenzphase über Monate hinweg nicht in ausreichendem Maße und auch im späteren Infektionsverlauf oftmals nur intermittierend mit dem Kot ausgeschieden wird (Whittington and Sergeant 2001, Nielsen, Gronbaek *et al.* 2002, Antognoli, Hirst *et al.* 2007, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Auch bei der Untersuchung von Organproben sind einzelne Negativ-Ergebnisse nicht aussagekräftig für den Infektionsstatus (Sweeney, Whitlock *et al.* 2006). Da also der wahre Infektionsstatus der Tiere schwer zu bestimmen ist, sind Ergebnisse neu entwickelter diagnostischer Tests oftmals nur eingeschränkt interpretierbar (Kalis, Collins *et al.* 2003). Abhilfe schaffen kann hier ein Infektionsmodell, innerhalb dessen der Infektionsstatus der Tiere bekannt ist.

2. Es hat sich gezeigt, dass der Nachweis der zellulären Immunantwort auf MAP früher gelingen kann, als der direkte Nachweis, bzw. der Nachweis der humoralen Immunantwort (Gwozdz, Thompson *et al.* 2000, Storset, Hasvold *et al.* 2001, Antognoli, Hirst *et al.* 2007). Allerdings sind Tests, die auf Parameter der zellulären Immunantwort abzielen, nur so spezifisch für Paratuberkulose, wie die bei der *ex vivo* Restimulation verwendeten Antigene (Jungersen, Huda *et al.* 2002). Nutztiere haben jedoch im normalen landwirtschaftlichen Betrieb Kontakt zu unterschiedlichen Mykobakterien, die zu MAP eine hohe Homologie aufweisen. Daher muss bei der Verwendung nicht rein MAP-spezifischer Stimulantien (wie aus MAP gewonnener Antigengemische) auf eine eventuelle Einschränkung der Spezifität des Tests geachtet werden. Bislang untersuchte MAP-spezifische Antigene wiesen jedoch keine ausreichende Stimulationskraft auf, um die aus MAP gewonnenen Antigengemische bei der Restimulation abzulösen (Santema, Overdijk *et al.* 2009, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2011, Hughes, Denham *et al.* 2013).
3. Der Infektionsverlauf der Paratuberkulose kann sowohl bei Ziegen als auch bei Schafen oder Rindern interindividuell stark variieren (Clarke and Little 1996, Perez, Garcia Marin *et al.* 1996, Burrells, Clarke *et al.* 1999, Corpa, Garrido *et al.* 2000, Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Munoz, Delgado *et al.* 2009). Die jeweilige Ausprägung des Infektionsgeschehens kann sich dabei auf alle bisher im Fokus der Forschung stehenden Nachweisparameter auswirken (Clarke and Little 1996, Navarro, Ramis *et al.* 1998, Burrells, Clarke *et al.* 1999, Perez, Tellechea *et al.* 1999). Erkenntnisse zu den Ursachen der Variation der Infektionsverläufe können daher sowohl für die Entwicklung der Diagnostik nützlich sein als auch das Verständnis der Pathogenese verbessern.

Im Folgenden werden einige, für die vorliegende Studie relevante Erkenntnisse aus der Paratuberkuloseforschung zusammengefasst.

2 Literaturübersicht

2.1 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

2.1.1 Einordnung und Erregereigenschaften

Die bovine Paratuberkulose wurde erstmals 1895 als ein „eigenthümlicher Fall“ von Tuberkulose beschrieben (Johne and Frothingham 1895). Einige Charakteristika deuteten zum damaligen Zeitpunkt auf eine Infektion mit *Mycobacterium* (*M.*) *bovis*, dem Erreger der Rindertuberkulose hin (u.a. positiver Intrakutantest mit Tuberkulin, Färbeverhalten der Bakterien wie *M. bovis*). Andere Befunde hingegen zeigten Unterschiede zu *M. bovis* auf (Morphologie der Bakterien, Histologie der pathologischen Veränderungen am Darm).

Der Erreger wurde 95 Jahre nach dieser ersten Beschreibung u.a. aufgrund von Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid* [DNA])-DNA-Hybridisierungstests als Subspezies der Spezies *M. avium* beschrieben (Thorel, Krichevsky *et al.* 1990). Weitere 15 Jahre später wurde das vollständige Genom des MAP-Stammes K-10 sequenziert (Li, Bannantine *et al.* 2005). Das Genom von MAP ist zu über 97 % identisch mit dem Genom von *M. avium* subsp. *avium* (Bannantine, Zhang *et al.* 2003). Daher sind bisher nur wenige Bestandteile von MAP als subspezies-spezifisch beschrieben (Gilot and Cocito 1993, Hughes, Bannantine *et al.* 2008). Heute sind verschiedene Stämme und Typen (Typ I, Typ II, Typ III und der Bison-Typ) von MAP bekannt, die sich voneinander u.a. im Wirtsspektrum oder in der Pathogenität unterscheiden (Collins, Gabric *et al.* 1990, Stevenson, Hughes *et al.* 2002, Sohal, Singh *et al.* 2010, Biet, Sevilla *et al.* 2012, Stevenson 2015).

MAP ist ein schwach gram-positives, im Wirtstier intrazellulär wachsendes, pleomorphes, stäbchenförmiges Bakterium mit einer stark lipidhaltigen Zellwand (Zurbrick and Czuprynski 1987, Tessema, Koets *et al.* 2001, Rowe and Grant 2006). Letztere macht es äußerst widerstandsfähig und säurefest. MAP weist vor allem in Böden, aber auch in Gewässern eine hohe Tenazität auf (Whittington, Marshall *et al.* 2004, Whittington, Marsh *et al.* 2005). Temperaturschwankungen gegenüber ist es sehr resistent, weder Einfrieren bei -70 °C noch Pasteurisierung vermögen MAP sicher abzutöten (Grant, Rowe *et al.* 2001, Raizman, Espejo *et al.* 2011).

Das Wachstum von MAP ist jedoch mit einer Generationszeit von über 24 Stunden selbst unter guten Bedingungen sehr langsam (Lambrecht, Carriere *et al.* 1988, Elguezabal, Bastida *et al.* 2011). Außerdem ist MAP, mit Ausnahme von laboradaptierten Stämmen, bei der kulturellen Vermehrung auf Zugabe des Siderophors Mykobaktin angewiesen (Twort and Ingram 1912, Merkal and Curran 1974, Thorel 1984). Dieses Merkmal wird in der Diagnostik von Mykobakterien-Kulturen zur Identifizierung als MAP herangezogen, ist jedoch nicht 100 % MAP-spezifisch (Thorel 1984).

2.1.2 Vorkommen in der Umwelt und natürliche Wirte des Erregers

Aufgrund seiner hohen Widerstandsfähigkeit ist MAP lange Zeit in der Umwelt in unterschiedlichsten Milieus überlebensfähig und kann so ubiquitär vorkommen. Selbst aus freilebenden Amöben, die in Gewässern und im Erdboden vorkommen, aus Larven von Trichostrongyliden (Darmparasiten) und bei der Untersuchung einiger Monogastrier- und Vogel-Spezies (u.a. Wildkaninchen, Fuchs, Hermelin, Wiesel, Krähe, Dohle, Ratte, Wald- und Hausmaus, Hase, Dachs) wurde MAP bereits isoliert (Beard, Daniels *et al.* 2001, Lloyd, Whittington *et al.* 2001, Florou, Leontides *et al.* 2008, White, Birtles *et al.* 2010).

Beim Kaninchen, Fuchs, Hermelin, Wiesel, bei der Krähe, der Ratte und der Waldmaus wurden dabei auch Läsionen gefunden, die Charakteristika von MAP-infiziertem Gewebe aufwiesen. Obwohl vor allem Kaninchenpopulationen große Mengen an MAP auf den Weiden ausscheiden können, ist derzeit noch unklar, welche Rolle diese Tiere wirklich in der Verbreitung der Erkrankung spielen (Daniels, Henderson *et al.* 2003). Klinisch apparente Erkrankungen der vorher genannten Spezies wurden bisher nicht beschrieben.

Bei Wiederkäuern ist MAP hingegen als monokausaler Erreger der Paratuberkulose bekannt, der die Koch'schen Postulate erfüllt (Johns and Frothingham 1895, Twort 1910, Twort and Ingram 1912, Twort 1914). Sowohl Haus- als auch Wildwiederkäuer sind empfänglich für Paratuberkulose und sorgen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien durch massenhaftes Ausscheiden des Erregers für die Verbreitung der Paratuberkulose. In Anbetracht dessen ist es wenig verwunderlich, dass das Mykobakterium durch internationalen Nutztierhandel und Wildwechsel über Landesgrenzen hinweg eine weltweite Verbreitung erfahren hat.

2.2 Paratuberkulose

2.2.1 Übertragungswege und Empfänglichkeit

Da mit MAP infizierte Tiere erst zu einem späten Zeitpunkt sicher diagnostizierbar sind (Manning and Collins 2001, Collins 2011), stellen klinisch inapparent infizierte Tiere das größte Risiko für die unbemerkte Durchseuchung eines Bestandes dar. Asymptomatische Trägartiere machen zudem den größten Teil der infizierten Tiere aus. Whitlock and Buergelt (1996) beschrieben die klinisch apparent infizierten Tiere in einem Bestand als die metaphorische Spitze des Eisbergs. Auf jedes dieser Tiere kämen demnach noch 15 bis 25 klinisch inapparent infizierte Tiere. Dies konnten Whitlock, Wells *et al.* (2000) bei einer Untersuchung zur Sensitivität und Spezifität von diagnostischen Methoden numerisch belegen.

Mit fortschreitendem Infektionsstadium nimmt sowohl die Wahrscheinlichkeit zu, dass die Tiere MAP mit dem Kot ausscheiden, als auch die Anzahl der ausgeschiedenen Bakterien. So kann MAP in frühen Infektionsstadien nicht im Kot nachgewiesen werden, weil die Tiere nur sehr geringe Mengen MAP ausscheiden (Whittington and Sergeant 2001). Im finalen Stadium der klinischen Apparenz kann ein infiziertes Tier hingegen 10^6 bis 10^8 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Gramm Kot ausscheiden (Jorgensen 1982, Whittington, Marsh *et al.* 1999, Whittington and Sergeant 2001).

Um Jungtiere zu infizieren, reicht bereits eine vergleichsweise geringe Dosis aus. Bei Infektionsversuchen mit Lämmern und Rothirsch-Kälbern konnte nach oraler Verabreichung von insgesamt 10^3 Erregern jeweils bei einem Teil der Tiere eine Infektion mit MAP festgestellt werden (Brotherston, Gilmour *et al.* 1961, Nisbet, Gilmour *et al.* 1962, O'Brien, Mackintosh *et al.* 2006). Adulte Tiere infizieren sich erst bei einer höheren Erregerexposition und zeigen in der Regel einen weniger schweren Krankheitsverlauf als Tiere, die sich als Jungtier infiziert hatten (Taylor 1953, Windsor and Whittington 2010, Sweeney 2011, McGregor, Dhand *et al.* 2012).

Auch die genetische Ausstattung der Tiere kann die Empfänglichkeit gegenüber MAP beeinflussen (Koets, Aduana *et al.* 2000, Mortensen, Nielsen *et al.* 2004, Korou, Liandris *et al.* 2010, Purdie, Plain *et al.* 2011). Sweeney (2011) bewertete allerdings den Einfluss von Betriebs-Management und Faktoren, die mit dem Umfeld der Tiere im Zusammenhang stehen, als gewichtiger als die bis dato beschriebenen genetischen Faktoren.

Der Kontakt mit MAP-haltigen Fäkalien (und damit verschmutzten Gegenständen) ist der wichtigste Übertragungsweg (Clarke 1997, Sweeney 2011, Radia, Bond *et al.* 2013). Aber auch eine diaplazentare Infektion im erkrankten Muttertier ist möglich (Seitz, Heider *et al.* 1989, Alinovi, Wu *et al.* 2009, Whittington and Windsor 2009). Der Nachweis von MAP aus Kolostrum und Sperma deutet zwar auf mögliche weitere Infektionswege, denen aber bislang in der Risikobewertung im Vergleich zu den vorher genannten kein großer Stellenwert eingeräumt wird (Philpott 1993, Nielsen, Bjerre *et al.* 2008).

2.2.2 Geschätzte Prävalenz der Paratuberkulose und Tragweite der Bekämpfung

Bisher ist es mangels ausreichend sensitiver diagnostischer Mittel *intra vitam* nicht möglich, eine genaue Angabe zur Prävalenz der Paratuberkulose in einer Population zu machen (siehe 2.3). Schätzungen der Prävalenz für deutsche Rinder reichen derzeit von 4,38 bis 33,0 % (Weber, Schafer-Schmidt *et al.* 2000, Schött 2002, Hacker, Huttner *et al.* 2004, Donat, Eulenberger *et al.* 2005, Elze, Liebler-Tenorio *et al.* 2013). Eine Studie, die veröffentlichte Untersuchungen zur Prävalenz von MAP in Europa kritisch überprüft hat, kam teilweise zu deutlich höheren Einschätzungen, als in den jeweiligen Veröffentlichungen angegeben (Nielsen and Toft 2009). Die von Nielsen *et al.* berechnete wahre Prävalenz unter Rindern wurde für Europa mit 20 % angegeben.

Selbst wenn die meisten mit MAP infizierten Nutztiere bis zu ihrem Lebensende keine klinischen Symptome zeigen, führen latente MAP-bedingte Leistungseinbußen sowie Fruchtbarkeitsstörungen zu erheblichen Verlusten in der Milch- und Fleischproduzierenden Industrie (Ott, Wells *et al.* 1999, Hasonova and Pavlik 2006, Gonda, Chang *et al.* 2007, Bhattarai, Fosgate *et al.* 2013).

Darüber hinaus ist es tierschutzrechtlich nicht zu vertreten, eine große Zahl von Tieren infiziert und mehr oder weniger gesundheitlich belastet zu wissen, ohne Maßnahmen dagegen zu ergreifen.

Ein weiterer Grund dafür, die Verbreitung von Paratuberkulose einzudämmen, ist der bislang noch nicht sicher ausgeräumte Verdacht, dass MAP an der Entstehung von *Morbus Crohn* beteiligt sein könnte. Bei *Morbus Crohn* handelt es sich um eine chronische, granulomatöse Enteritis des Menschen, die in klinischer und pathologischer Hinsicht Ähnlichkeiten zur Paratuberkulose aufweist und deren Ursache bisher unklar

ist (Chiodini 1989, Das and Seril 2012). Bei *Morbus Crohn*-Patienten wurden MAP-spezifische Antikörper nachgewiesen und MAP aus Gewebeproben isoliert (Sanderson, Moss *et al.* 1992, Feller, Huwiler *et al.* 2007). Da diese Nachweise jedoch nicht bei allen und nicht ausschließlich bei *Morbus Crohn*-Patienten gelangen, kann MAP bisher keine ursächliche Bedeutung, sondern höchstens die Rolle eines Co-Faktors zugeschrieben werden (Sanderson, Moss *et al.* 1992, Chiba, Fukushima *et al.* 1998, Kanazawa, Haga *et al.* 1999). Bisher veröffentlichte, vermeintlich deutliche Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und *Morbus Crohn* halten einer wissenschaftlichen Überprüfung nicht stand (Bach 2015, McNees, Markesich *et al.* 2015, Sechi and Dow 2015).

2.2.3 Bekämpfungsstrategien

Eine Heilung der mit MAP infizierten Tiere ist nicht möglich. Es ist lediglich eine vorübergehende Milderung klinischer Symptome durch Einsatz verschiedener Antibiotika beschrieben (St-Jean and Jernigan 1991, Fecteau and Whitlock 2011). Dies kann aber im Nutztierbereich aus Verbraucherschutzsicht und aus wirtschaftlichen Erwägungen heraus weder das Ziel sein noch die Problematik lösen.

Auch bisher erprobte Impfstoffe reduzieren zwar das Vorkommen von klinischen Erscheinungen und die Ausscheidung von MAP mit dem Kot, verhindern aber nicht die Infektion der Tiere (Juste, Garcia Marin *et al.* 1994, Kormendy 1994, van Schaik, Kalis *et al.* 1996, Juste 2012). In Deutschland sind diese Impfstoffe nicht zugelassen. Das liegt einerseits daran, dass sie die Infektion der Tiere nicht verhindern und andererseits daran, dass die Impfreaktion die derzeit verfügbare serologische Diagnostik der Paratuberkulose und durch Kreuzreaktionen auch die der Tuberkulose beeinträchtigt (Kormendy 1994, Köhler, Gyra *et al.* 2001, Storset, Berg *et al.* 2005, Perez de Val, Nofrarias *et al.* 2012).

Allgemein gibt es trotz grenzüberschreitendem Handelsverkehr mit Nutztieren keine international einheitlichen Maßnahmen oder Strategien zur Bekämpfung von Paratuberkulose. Die EU gibt für Schafe und Ziegen für den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr von Zuchttieren vor, dass diese aus einem Betrieb kommen müssen, der in den letzten zwölf Monaten keinen Fall klinischer Paratuberkulose aufgewiesen hat. Eine Testung der Tiere ist jedoch nicht vorgesehen (Richtlinie 91/68/EWG des Rates vom 28.01.1991 zur Regelung tierseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Schafen und Ziegen).

Auch innerhalb Deutschlands gibt es keine gesetzlich vorgeschriebenen Maßnahmen zur Bekämpfung der Paratuberkulose. Dennoch ist der Ausbruch von Paratuberkulose nach der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 11.02.2011 meldepflichtig (Bundesgesetzblatt I, Seite 252; zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 17.04.2014, Bundesgesetzblatt I, Seite 388). Zusätzlich entstanden über die Jahre in den verschiedenen Bundesländern voneinander unabhängige, freiwillige Paratuberkulose-Bekämpfungsprogramme, die häufig von den Tierseuchenkassen gefördert wurden. Das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft hat am 17.01.2005 „Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen“ veröffentlicht (Bundesanzeiger vom 10.02.2005, S. 2165), deren Umsetzung allerdings auf freiwilliger Basis erfolgte. Diese Leitlinien wurden durch die „Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern“ vom 07.07.2014 abgelöst. Diese wurden vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft am 01.08.2014 im Bundesanzeiger veröffentlicht (Bundesanzeiger AT 01.08.2014 B1; Seite 1). Beide Schriftstücke enthalten, wie die anderen Bekämpfungsprogramme, vor allem Vorschläge zur Verbesserung der Stall- und Abkalbehygiene, zur Verfütterung unbedenklichen Kolostrums und zur hygienischen Aufzucht von Kälbern. Eine Voraussetzung für einen sichtbaren Erfolg in der Eindämmung der Paratuberkulose ist jedoch die jahrelange, konsequente Umsetzung dieser Empfehlungen.

Zur erfolgreichen Sanierung eines Bestands gehören außer der Einhaltung eines guten Hygienemanagements idealerweise die diagnostische Testung der Tiere und das Separieren bzw. Entfernen infizierter Tiere. In Schweden wurden seit 1952 ganze Bestände der Schlachtung zugeführt, wenn es zu positiven Ergebnissen bei kulturellen oder serologischen Untersuchungen kam. Diese konsequente Entfernung erwiesener und möglicher Infektionsträger führte zu einer sehr niedrigen Prävalenz der Paratuberkulose in Schweden (Frossling, Wahlstrom *et al.* 2013). Ein solch radikales Vorgehen ist jedoch nicht flächendeckend mit freiwilliger Beteiligung durchzusetzen. Von Vorteil wären daher diagnostische Methoden, die frühzeitig beim Einzeltier die Infektion mit MAP, bzw. das von dem Tier ausgehende Risiko für die nicht-infizierten Herdenmitglieder, nachweisen können. Mit Hilfe solcher Tests wäre es möglich infizierte Tiere gezielt auszusortieren, ohne den gesamten Bestand opfern zu müssen, was die Akzeptanz solcher Vorgehensweisen erhöhen würde.

2.2.4 Tiermodelle

Da bei Tieren aus natürlich infizierten Beständen weder eine Aussage über die Dosis noch über den Zeitpunkt der Infektion gemacht werden kann, sind Infektionsmodelle unumgänglich, um Gruppen infizierter Tiere mit qualitativ und zeitlich vergleichbarer Exposition gegenüber dem Erreger untersuchen zu können. Dies ist vor allem wichtig, um das Verständnis der Pathogenese zu erweitern und um diagnostische Methoden oder Impfstoffe zu entwickeln oder zu prüfen.

Neben den natürlichen Wirtsspezies wurden auch Labormäuse für MAP-Infektionsmodelle verwendet (Chandler 1961, Chiodini and Buergelt 1993). Diese zeigten teilweise Läsionen mit einer Histologie, die der von MAP-infizierten Wiederkäuern ähnelt (Tanaka, Sato *et al.* 1994). Allerdings sind im Mausmodell gewonnene Daten nur bedingt auf die Paratuberkulose der Wiederkäuer übertragbar, da hier eher systemische als primär intestinale Infektionen erzeugt werden (Harris and Barletta 2001).

Wegen der besseren Übertragbarkeit der Daten sind natürliche Wirtstiere für Infektionsversuche mit MAP vorzuziehen (Hines, Stabel *et al.* 2007). Hier eignen sich primär Schafe und Ziegen, da diese auch über längere Zeiträume mit vergleichsweise geringem Aufwand zu halten sind. Doch auch zwischen Rindern, Schafen und Ziegen gibt es Unterschiede, die bei der Anwendung eines solchen Modells beachtet werden müssen. Ziegen gelten im Vergleich zu Schafen und Rindern als empfänglicher für MAP und zeigen einen beschleunigten Krankheitsverlauf (Ris, Hamel *et al.* 1987, Ris, Hamel *et al.* 1988, Stewart, Vaughan *et al.* 2004, Stewart, Vaughan *et al.* 2006, Hines, Stabel *et al.* 2007, Stewart, Vaughan *et al.* 2007). Außerdem zeigen sich Ziegen unter natürlichen Bedingungen für alle Typen von MAP empfänglich, während bei Schafen vor allem der Typ I bzw. Typ III und bei Rindern der Typ II gefunden wird (de Juan, Alvarez *et al.* 2006, Biet, Sevilla *et al.* 2012, Stevenson 2015).

Bei Infektionsmodellen an Wiederkäuern hat sich die orale Inokulation durchgesetzt, da sie den natürlichen fäkal-oralen Infektionsweg am besten nachahmt. Hier wurden in vergangenen Studien bei Ziegen Erregerzahlen von 3×10^7 KBE bis 8×10^{10} KBE und bei Schafen von $2,6 \times 10^1$ KBE bis $2,6 \times 10^{11}$ KBE verwendet (Hines, Stabel *et al.* 2007). Hines *et al.* (2007) empfahlen jeweils eine Infektionsdosis zu wählen, die eine sichere Infektion gewährleistet, aber dabei nicht das natürliche Abwehrsystem in einer Art überfordert, dass keine natürliche Wirtsantwort auf die Infektion möglich ist.

Um im Modell den Verhältnissen bei einer natürlichen Infektion möglichst nahe zu kommen, haben Meyer (2011) und Köhler, Soschinka *et al.* (2015) in einem Ziegenmodell vier Inokulationsschemata verglichen. Sie fanden, dass die Verabreichung von 10 mg Bakterienfeuchtmasse (ca. $1,16 \times 10^7$ bis $5,51 \times 10^7$ KBE) an zehn Zeitpunkten im Abstand von zwei bis drei Tagen eine sichere Infektion drei bis fünf Tage alter Ziegen gewährleistet. Die Infektion führte innerhalb eines Jahres nur im Einzelfall zu klinischen Symptomen, bei allen Tieren aber zu ausgedehnten MAP-spezifischen Organ-Veränderungen. Drei weitere Schemata beinhalteten eine Inokulation zu einem späteren Zeitpunkt und/oder mit einer größeren Infektionsdosis. Im Vergleich mit diesen wies jedoch das zuvor beschriebene Inokulationsschema im Hinblick auf die histopathologischen Befunde ein Jahr *post inoculationem* (*p.i.*), die größten Ähnlichkeiten mit den bei natürlich infizierten Tieren erhobenen Befunden auf (Meyer 2011).

Bei allen Bemühungen eine natürliche Infektion experimentell nachzustellen, zeigen experimentell infizierte Tiere im Vergleich zu natürlich infizierten Tieren oftmals deutliche Unterschiede: Bei experimentell infizierten Tieren konnten deutlich früher Nachweise von MAP im Kot, von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum und von MAP in Organproben erbracht werden (Reddacliff and Whittington 2003, Begg, O'Brien *et al.* 2005, Hines, Stabel *et al.* 2007). Demnach ist anzunehmen, dass experimentelle Infektionen mit im Vergleich zur natürlichen Exposition vermutlich sehr hohen Einzelinfektionsdosen einen beschleunigten Infektionsverlauf nach sich ziehen. Dieser Unterschied muss bei der Interpretation von Tiermodellen beachtet werden.

2.2.5 Allgemeiner Krankheitsverlauf und Wirt-Erreger-Interaktionen

Charakteristisch für den Verlauf der Paratuberkulose ist eine sehr lange Inkubationszeit, die in diesem Falle auch als Latenzphase bezeichnet wird. Bei den meisten Rindern beträgt diese zwei bis fünf Jahre, bei Schafen und Ziegen kommen klinische Erscheinungen bereits nach einem Jahr vor (Clarke 1997, Kennedy and Benedictus 2001, Whittington and Sergeant 2001, Olsen, Sigurgardottir *et al.* 2002, Robbe-Austerman 2011). Während der Latenzphase werden zunächst das darm-assoziierte Lymphgewebe und nachfolgend auch die Darmschleimhaut besiedelt. Dabei ist vor allem das Jejunum und Ileum, aber auch das proximale Kolon betroffen (Morin 1982, Clarke and Little 1996, Clarke 1997, Tafti and Rashidi 2000). Bei sechs bis neun Monate alten, natürlich infizierten Kälbern, Schaf- und Ziegenlämmern wurde eine

intermittierende Ausscheidung von MAP mit dem Kot nachgewiesen (Whittington and Sergeant 2001, Antognoli, Hirst *et al.* 2007, Lybeck, Storset *et al.* 2010, Logar, Kopinc *et al.* 2012). In der späten Latenzphase kann es auf hämatogenem oder lymphogenem Weg zur Dissemination des Erregers im Gesamtorganismus kommen (Gwozdz, Reichel *et al.* 1997, Manning, Steinberg *et al.* 2003, Bower, Begg *et al.* 2011, Krüger, Köhler *et al.* 2014).

In der klinisch apparenten Phase ist die normale Struktur der Darmschleimhäute in einer Weise durch Schleimhauthypertrophie, Granulome und Zottenverkürzungen bzw. -fusion verändert, dass es zu Malabsorption und Diarrhoe kommt (Clarke and Little 1996, Tafti and Rashidi 2000, Krüger, Köhler *et al.* 2014). Diarrhoe ist häufig beim Rind und selten beim kleinen Wiederkäuer zu beobachten; letztere zeigen stattdessen eher weichen, nicht speziesspezifisch geformten Kot (Chiodini, Van Kruiningen *et al.* 1984, Clarke 1997, Sweeney 2011). Unabhängig von der Spezies erleiden die so betroffenen Tiere einen Mangel an Nährstoffen und insbesondere an Eiweiß (Whitlock and Buergelt 1996, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Letzteres führt zu Hypoproteinämie und Ödemen. Meist bleibt die Fresslust über lange Zeit erhalten. Das Endstadium wird schließlich erreicht, wenn die Tiere unter Kachexie leiden und den durchfallbedingten Flüssigkeitsverlust nicht mehr ausgleichen können.

Diverse Studien zur Pathogenese der Paratuberkulose haben dazu beigetragen, zu verstehen, wie der Wirt auf die Infektion reagiert und wie MAP einer effektiven Bekämpfung seitens des Wirts entgeht. Nach der zumeist oralen Aufnahme wird MAP mit den Ingesta bis in den Dünndarm transportiert. Die widerstandsfähigen Mykobakterien überleben dabei zu großen Teilen den Kontakt mit Magensäure und Galle (Dalton and Hill 2013). Im Dünndarm wird MAP vor allem von M-Zellen, die über den Peyer'schen Platten im Darmepithel liegen, aufgenommen und gelangen in das darunter liegende lymphatische Gewebe (Momotani, Whipple *et al.* 1988, Secott, Lin *et al.* 2001). Sowohl intra- als auch subepitheliale Makrophagen nehmen MAP auf. MAP entgeht jedoch in nicht ausreichend aktivierten Makrophagen der Abtötung, indem es die Fusion und Reifung der Phagosomen inhibiert (Zurbrick and Czuprynski 1987, Kuehnelt, Goethe *et al.* 2001, Woo, Heintz *et al.* 2007). So kann MAP in Makrophagen persistieren, sich vermehren und sich der zellulären und humoralen Immunantwort entziehen. Aktivierte Makrophagen hingegen töten MAP in den Phagolysosomen und präsentieren MAP-Antigene über MHC-II-Moleküle (Clarke 1997, Stabel 2000).

Naive T-Zellen, die MHC-präsentierte Antigene erkennen, werden aktiviert, differenzieren vorwiegend zu CD4⁺ Th1-Helferzellen und produzieren ein Profil von zellulären Botenstoffen, das die zellvermittelte Immunabwehr unterstützt (Stabel 2000, Coussens 2001, Olsen and Storset 2001). Diese und die von aktivierten Makrophagen produzierten Zytokine aktivieren Makrophagen, unterhalten die proinflammatorische Reaktion und unterstützen die Granulombildung (Barbulescu, Becker *et al.* 1998, Sedgwick, Riminton *et al.* 2000, Coussens 2001, Coussens 2004). Eine starke zellvermittelte Immunantwort wurde vielfach als notwendig für die Kontrolle der Infektion mit MAP beschrieben (Burrells, Clarke *et al.* 1998, Perez, Tellechea *et al.* 1999, Toman, Faldyna *et al.* 2003).

Wo in Makrophagen aufgenommene MAP nicht im Wachstum gehemmt oder zerstört werden, vermehren sie sich intrazellulär (Zurbrick and Czaprynski 1987, Tessema, Koets *et al.* 2001). Beim Zelltod kommt es dann zur Freisetzung von MAP in das umliegende Gewebe bzw. bei vorliegenden Schleimhautläsionen in das Darmlumen. Großflächige Schleimhautläsionen gehören zwar nicht zum typischen Bild der Paratuberkulose (Clarke 1997, Kurade, Tripathi *et al.* 2004, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Dennoch ist die in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung vorkommende Ausscheidung von größeren Mengen an MAP mit dem Kot nur durch eine Freisetzung von MAP nach im Gewebe erfolgter Vermehrung erklärbar. Nur vergleichsweise geringe Mengen an MAP konnten nach oraler Aufnahme und Passage des Magen-Darm-Kanals im Kot gefunden werden, wenn keine Infektion des Tieres nachweisbar war (Sweeney, Whitlock *et al.* 1992, Hines, Stabel *et al.* 2007, Kralik, Pribylova-Dziedzinska *et al.* 2014). Eine nennenswerte Vermehrung von MAP im Darmlumen ist allein aufgrund der im Vergleich zur Generationszeit von MAP geringen Verweilzeit der Ingesta unwahrscheinlich (Hartnell and Satter 1979, Lambrecht, Carriere *et al.* 1988, Elguezal, Bastida *et al.* 2011).

Die protektive Wirkung gegen MAP gerichteter Antikörper wird allgemein angezweifelt, da eine starke Antikörperreaktion v.a. bei Tieren mit einer hohen mykobakteriellen Last gefunden wird und auch maternale Antikörper keinen Schutz für die Jungtiere bedeuten (Clarke and Little 1996, Burrells, Clarke *et al.* 1999, Pithua, Godden *et al.* 2009). Dennoch wurde sowohl bei Rindern als auch bei Schafen und Ziegen nach längerer Infektionsdauer eine Zunahme der Th2-geprägten Immunantwort und der Konzentration an MAP-spezifischen Antikörpern im Blut nachgewiesen (Clarke 1997, Burrells, Clarke *et al.* 1998).

Bei Tieren mit klinisch apparenter Infektion wurde eine gewisse Anergie der Th1-Zellen festgestellt (Bendixen 1978, Stabel 2000, Koets, Rutten *et al.* 2002). Warum die zellvermittelte Immunantwort im Verlauf der Infektion zurückgeht und letztlich der humoralen Immunantwort weicht, ist nicht bekannt. Es wurde jedoch spekuliert, dass die Entwicklung einer regulatorischen T-Zellpopulation dafür verantwortlich sein könnte, welche die MAP-spezifischen CD4⁺ Zellen hemmt oder abtötet (Chiodini and Davis 1992, Navarro, Ramis *et al.* 1998, Koets, Rutten *et al.* 1999, Coussens 2004). Dieser Wechsel von einer Th1-gelenkten zu einer vorwiegend Th-2-geprägten Immunantwort trüge so zum Kontrollverlust bei, sodass sich MAP in der Folge weitgehend ungehindert vermehren und im Organismus verbreiten kann (Sweeney 2011). Obwohl eine ganze Reihe von Studien die Vorstellung unterstützt, dass sich die Immunantwort im Infektionsverlauf wandelt, liefern andere Studien dem widersprechende Ergebnisse. So wiesen zwei Studien bei Rindern bzw. Ziegen mit klinisch apparenter Infektion teilweise hohe Reaktionen der zellulären Immunantwort im Interferon- γ -Test (IFN- γ -Test) nach. Tiere, die hohe Mengen MAP ausschieden, zeigten hier eine signifikant höhere Freisetzung von Interferon- γ (IFN- γ) als solche, die wenig oder gar kein MAP ausschieden (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Lybeck, Storset *et al.* 2010).

2.2.6 Unterschiede in der Ausprägung von Krankheitsmerkmalen

Die Entwicklung der Paratuberkulose ist abhängig vom Alter der Tiere und der Infektionsdosis (Juste, Garcia Marin *et al.* 1994, McGregor, Dhand *et al.* 2012, Mitchell, Medley *et al.* 2012). Doch auch in Infektionsmodellen bei gleichartig inokulierten Tieren zeigten sich Unterschiede in dem Erscheinungsbild der Erkrankung. Nach histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von Organproben konnten oftmals drei verschiedene Bilder beschrieben werden: Neben Tieren, die trotz nachweisbarer immunologischer Auseinandersetzung mit MAP keine histologischen Veränderungen aufwiesen, zeigten andere Tiere paucibazilläre oder multibazilläre Veränderungen. Tiere ohne histologische Veränderungen waren klinisch unauffällig, zeigten keine Ausscheidung von MAP und zum Teil auch keine kulturell nachweisbare Besiedlung mit MAP oder MAP-spezifische Antikörper (Smeed, Watkins *et al.* 2007, Gillan, O'Brien *et al.* 2010, Dennis, Reddacliff *et al.* 2011). Bei den sogenannten paucibazillären Veränderungen bestehen die zellulären Infiltrate vorwiegend aus Lymphozyten und einigen Makrophagen. Es sind vereinzel-

te, kleine granulomatöse Veränderungen zu finden, die keine bis wenige MAP enthalten. Multibazilläre Veränderungen hingegen bestehen aus Zügen von Makrophagen und Epitheloidzellen, die zahlreiche MAP enthalten können (Clarke and Little 1996, Perez, Garcia Marin *et al.* 1996, Corpa, Garrido *et al.* 2000). Diese beiden Formen der Paratuberkulose weisen Parallelen zu der tuberkuloiden bzw. lepromatösen Form der Infektion mit *M. leprae* auf (erstere ähnelt der paucibazillären, letztere der multibazillären Form), weshalb die Begriffe aus der Lepraforschung auch in der Beschreibung der Paratuberkulose verwendet werden (Alzuherri, Woodall *et al.* 1996, Clarke and Little 1996).

Die genannten Formen der Paratuberkulose wurden sowohl bei Rindern als auch bei Schafen und Ziegen beschrieben (Clarke and Little 1996, Perez, Garcia Marin *et al.* 1996, Corpa, Garrido *et al.* 2000, Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Munoz, Delgado *et al.* 2009). Allerdings wird derzeit nur bei Schafen davon ausgegangen, dass diese Befunde unterschiedlich schwere Infektionsverläufe charakterisieren, die jeweils einen bestimmten Ausgang der Infektion erreichen (Smeed, Watkins *et al.* 2007, Gillan, O'Brien *et al.* 2010). Dabei können sowohl Tiere mit der paucibazillären als auch solche mit der multibazillären Form der Paratuberkulose klinisch apparent werden, während die dritte Gruppe ohne histologische Veränderungen als weitgehend unbeeinträchtigter und stummer Träger von MAP gilt (Burrells, Clarke *et al.* 1999, Begg, O'Brien *et al.* 2005, Lybeck, Storset *et al.* 2010, McGregor, Dhand *et al.* 2012).

Paucibazilläre Veränderungen wurden bei Untersuchungen natürlich und klinisch apparent mit Paratuberkulose infizierter Schafe in 8,3 bis 30 %, multibazilläre Veränderungen in 70 bis 83,3 % der Fälle gefunden (Clarke and Little 1996, Dennis, Reddacliff *et al.* 2011). Bei Rindern hingegen wird aufgrund der Fülle an verschiedenen Zwischenformen angenommen, dass diese lediglich verschiedene Stadien innerhalb eines Infektionsverlaufes charakterisieren (Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Vazquez, Garrido *et al.* 2013). Mangels experimenteller Überprüfung in Langzeit-Infektionsversuchen mit Rindern bleibt dies eine Hypothese. Das Vorkommen von distinkten Verlaufsformen der Paratuberkulose bei Ziegen wurde bisher noch nicht beschrieben. Es wurden zwar bei Ziegen Läsionen gefunden, die denen der pauci- bzw. multibazillären Form der Schafe glichen, allerdings wiesen auch Ziegen Zwischenformen auf, die nahelegten, dass die Verhältnisse bei den Ziegen eher denen bei Rindern ähneln (Corpa, Garrido *et al.* 2000, Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Krüger, Köhler *et al.* 2014).

Es ist bisher nicht bekannt, durch welche Mechanismen die Tiere, die nach einer MAP-Infektion keine histologischen Veränderungen zeigen, vor der Besiedlung durch MAP geschützt werden. Bei der pauci- bzw. multibazillären Form hingegen konnten Zusammenhänge zwischen der Krankheitsausprägung und der Art der Immunantwort auf MAP festgestellt werden. So wurde die paucibazilläre Form mit einer ausgeprägten zellulären Immunität und einer vergleichsweise geringen Antikörperproduktion assoziiert (Clarke and Little 1996, Navarro, Ramis *et al.* 1998, Burrells, Clarke *et al.* 1999). Bei der multibazillären Form dagegen wurden eine starke humorale und eine schwache zelluläre Immunantwort gefunden. Als ein weiterer Unterschied zeigte sich, dass bei Tieren mit paucibazillärer Form mit geringerer Wahrscheinlichkeit MAP im Kot nachgewiesen wird als bei Tieren mit multibazillärer Form (Clarke and Little 1996, Whittington, Fell *et al.* 2000). Demnach stellen erstere aufgrund geringerer Ausscheidung von MAP ein niedrigeres Risiko der Weiterverbreitung von MAP dar als letztere.

2.2.7 Bedeutung der in dieser Studie untersuchten Zytokine für den Krankheitsverlauf der Paratuberkulose

Zytokine sind Botenstoffe, die von Zellen des Immunsystems gebildet und von anderen oder auch denselben Zellen erkannt werden. Das Spektrum von (Immunzell-)Subpopulationen, die auf einzelne Mediatoren reagieren, wird dabei über das Expressionsmuster spezifischer Rezeptoren auf den Subpopulationen determiniert. Zytokine wirken über Signalkaskaden auf die Genexpression und beeinflussen so den Funktionszustand verschiedener Zellen (St Georgiev and Albright 1993, Munk and Emoto 1995). Die Art und Menge an ausgeschütteten Zytokinen legt somit die Ausrichtung der Immunantwort fest. Es wird zwischen Zytokinen mit pro- und mit anti-inflammatorischen Wirkungen unterschieden. Erstere spielen vor allem bei einer Th1-lastigen Immunantwort eine Rolle, unterstützen die zellvermittelte Immunantwort und tragen zur Infiltration des Gewebes mit Makrophagen und Epitheloidzellen bei. Anti-inflammatorische Zytokine hingegen werden der Th2-Antwort zugeordnet, stimulieren die Produktion von Antikörpern, unterdrücken den Th1-Anteil der Immunantwort und mindern so Gewebsschäden durch ausufernde Entzündungsreaktionen (St Georgiev and Albright 1993, Coussens 2004). Dabei kann jedoch die Abwehr insbesondere von intrazellulären Krankheitserregern beeinträchtigt werden.

Für diese Studie ausgewählt wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , Interleukin (IL)-12, IL-18, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und Transformierender Wachstumsfaktor β (engl. *transforming growth factor β* [TGF- β]).

2.2.7.1 IFN- γ

Das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ wird vor allem von Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), aber auch von Makrophagen und diversen anderen Zellen des Körpers produziert (Boehm, Klamp *et al.* 1997, Munder, Mallo *et al.* 1998, Schroder, Hertzog *et al.* 2004). IFN- γ unterstützt die zellvermittelte Immunabwehr indem es Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen aktiviert und diese zur Produktion von IL-12 und weiterem IFN- γ stimuliert (Boehm, Klamp *et al.* 1997, Munder, Mallo *et al.* 1998, Carnaud, Lee *et al.* 1999, Schroder, Hertzog *et al.* 2004). Derart aktivierte Makrophagen können MAP erfolgreich abtöten (vgl. 2.2.5). Darüber hinaus fördert IFN- γ die Entwicklung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen und inhibiert die Th2-Zellen (Fernandez-Botran, Sanders *et al.* 1988, Mosmann 1991, Boehm, Klamp *et al.* 1997).

IFN- γ wird eine wichtige Rolle in der Kontrolle von mykobakteriellen Infektionen zugeschrieben (Cooper, Dalton *et al.* 1993, Stabel 2000, Olsen, Sigurgardottir *et al.* 2002, Over, Crandall *et al.* 2011). Eine Untersuchung zur Lepra, einer humanen Erkrankung ausgelöst durch *M. leprae*, hat gezeigt, dass eine Th1-lastige Immunantwort mit starker Produktion von IFN- γ und IL-2 mit der tuberkuloiden Form der Erkrankung korreliert. Bei dieser Krankheitsform wird die Infektion von den Patienten relativ gut kontrolliert. Sie weisen vor allem paucibazilläre Läsionen mit geringen Anzahlen an Mykobakterien auf. Die schwerere Ausprägungsform der Erkrankung hingegen, die lepromatöse, bzw. multibazilläre Form, bei der die Mykobakterien massenhaft im Gewebe nachgewiesen werden können, kommt zusammen mit einer Th2-dominierten Immunantwort mit geringer IFN- γ -Produktion vor (Yamamura, Uyemura *et al.* 1991). Für die Paratuberkulose wurden ähnliche Beobachtungen gemacht (Clarke and Little 1996, Burrells, Clarke *et al.* 1999, Gillan, O'Brien *et al.* 2010).

2.2.7.2 IL-12

Nach entsprechender Aktivierung produzieren Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten IL-12. Die Aktivierung wird erreicht, wenn

diese Zellen molekulare Muster erkennen, die mit Mikroorganismen assoziiert sind, oder ein für ein präsentierte Antigen spezifischer T-Lymphozyt das Zelloberflächenmolekül CD40 bindet (Cassatella, Meda *et al.* 1995, Heufler, Koch *et al.* 1996, Koch, Stanzl *et al.* 1996, Bliss, Zhang *et al.* 1999). Das freigesetzte IL-12 wirkt auf verschiedene Zellen des Immunsystems und zeigt dabei oftmals ähnliche Wirkungen wie das zuvor beschriebene IFN- γ . NK-Zellen werden durch IL-12 aktiviert, zeigen gesteigerte zytotoxische Aktivität und setzen IFN- γ und TNF- α frei (Kobayashi, Fitz *et al.* 1989, Robertson, Soiffer *et al.* 1992, Trinchieri 1995). Außerdem stimuliert IL-12 die Produktion von IFN- γ durch Makrophagen und Th1-T-Zellen (Manetti, Parronchi *et al.* 1993, Trinchieri 1995, Heufler, Koch *et al.* 1996, Munder, Mallo *et al.* 1998). Letztere entwickeln sich unter Einfluss von IL-12 aus naiven T-Zellen. So wird die zelluläre Immunantwort weiterhin gestützt, während gleichzeitig der Th2-Anteil der Immunantwort durch IL-12 gehemmt wird (Manetti, Parronchi *et al.* 1993, Kubin, Chow *et al.* 1994, Trinchieri 1995, Boehm, Klamp *et al.* 1997, O'Garra 1998, Dinarello 1999). In Synergie mit IL-18 potenzieren sich diese Wirkungen (Ahn, Maruo *et al.* 1997, Zhang, Kawakami *et al.* 1997, Munder, Mallo *et al.* 1998, Dinarello 1999, Akira 2000).

Für den Nachweis des Zytokins ist zu beachten, dass die biologisch aktive Form von IL-12 als Heterodimer aus den Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p35 besteht (Kobayashi, Fitz *et al.* 1989, D'Andrea, Rengaraju *et al.* 1992, Trinchieri 1995). Während die größere Untereinheit, IL-12p40, nur in Zelltypen nachgewiesen wurde, die das Heterodimer produzieren, wird IL-12p35 in geringem Maße auch in anderen Zelltypen exprimiert. Die Expression von IL-12p35 ist dabei vornehmlich konstitutiv, die von IL-12p40 hingegen vergleichsweise stärker reguliert (D'Andrea, Rengaraju *et al.* 1992, Wolf, Seiburth *et al.* 1992, D'Andrea, Aste-Amezaga *et al.* 1993, Trinchieri 1995). IL-12p40 ist für die zellvermittelte Immunantwort von größerer Wichtigkeit, da sie mit dem Polypeptid p19 die Bildung von IL-23 induziert, welches wie IL-12 die Freisetzung von IFN- γ fördert (Oppmann, Lesley *et al.* 2000, Cooper, Kipnis *et al.* 2002, Lankford and Frucht 2003).

2.2.7.3 IL-18

IL-18 war nach seiner Entdeckung zunächst unter dem Namen „IFN- γ -induzierender Faktor“ bekannt (Okamura, Nagata *et al.* 1995, Ushio, Namba *et al.* 1996, Kohno, Kataoka *et al.* 1997). Wie IL-12 wird IL-18 unter anderem von aktivierten Makrophagen produziert (Okamura, Nagata *et al.* 1995, Ushio, Namba *et al.* 1996, Akira 2000).

Beide Interleukine wirken synergistisch, wenngleich über separate Signalwege, und steigern so die IFN- γ -Produktion durch Makrophagen, NK-Zellen, naive T Zellen und Th1-Zellen (Okamura, Nagata *et al.* 1995, Robinson, Shibuya *et al.* 1997, Dinarello 1999, Akira 2000, Schroder, Hertzog *et al.* 2004). Des Weiteren stimuliert IL-18 die Zytotoxizität von NK-Zellen und die Proliferation von Th1-Zellen sowie die Produktion von TNF- α durch beide Zellarten (Barbulescu, Becker *et al.* 1998, Puren, Fantuzzi *et al.* 1998, Dinarello 1999, Akira 2000).

Ein Infektionsmodell mit IL-18-defizienten Mäusen zeigte, dass IL-18 eine wichtige Rolle für die Produktion von IFN- γ und damit für die Kontrolle einer Infektion mit Mykobakterien spielt und das Fehlen von IL-18 bei diesen Mäusen nicht durch Hochregulation von IL-12 kompensiert wird (Sugawara, Yamada *et al.* 1999).

2.2.7.4 TNF- α

TNF- α wird im Wesentlichen von aktivierten Makrophagen und Lymphozyten produziert, kann aber von unterschiedlichsten anderen Zellen gebildet werden (Vilcek and Lee 1991, Sedgwick, Riminton *et al.* 2000). Viele Wirkungen von TNF- α stimmen mit denen von IFN- γ überein, mit dem es teilweise synergistisch wirkt (Drapier, Wietzerbin *et al.* 1988, Hughes, Kaspar *et al.* 1988, Siebenlist, Franzoso *et al.* 1994, Boehm, Klamp *et al.* 1997). Darüber hinaus induziert TNF- α wie IL-12 die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen und Makrophagen. Auf letztere wirken auch TNF- α und IL-12 synergistisch (Tripp, Wolf *et al.* 1993, Munder, Mallo *et al.* 1998).

Bei einer murinen Makrophagen-Zelllinie steigerte eine Vorbehandlung mit TNF- α die Effizienz der Phagozytose von MAP (Stabel 1995). Die T-Zell-Antwort auf mykobakterielle Antigene war bei TNF- α -defizienten Mäusen im Vergleich mit dem Wildtyp unbeeinflusst. Die Infektion mit *M. tuberculosis* konnte jedoch aufgrund mangelhafter Granulombildung nicht begrenzt werden, sodass extensive Nekrosen entstanden, wo sich beim Wildtyp gut umschriebene Granulome finden ließen (Bean, Roach *et al.* 1999). Da auch andere Studien zu ähnlichen Ergebnissen kamen, wird angenommen, dass TNF- α für die Granulombildung bzw. Ausbildung von granulomatösen Prozessen und somit für die Eindämmung der Ausbreitung von mykobakteriellen Infektionen essentiell ist (Benini, Ehlers *et al.* 1999, Ehlers, Benini *et al.* 1999, Saunders and Cooper 2000).

2.2.7.5 IL-10

IL-10 wird u.a. von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und CD4⁺ sowie CD8⁺ Zellen produziert (de Waal Malefyt, Abrams *et al.* 1991, Moore, de Waal Malefyt *et al.* 2001, Kamanaka, Kim *et al.* 2006, Couper, Blount *et al.* 2008). Es ist ein früher Regulator der zellulären Immunantwort, der aufgrund von engeren Kontakten von Zellen der zellulären Immunantwort v.a. lokal in den Entzündungsherden seine Wirkung entfaltet (Coussens 2004). Die inhibierende Wirkung von IL-10 auf die Aktivierung und Proliferation von Makrophagen ist direkt vermittelt. Die Proliferation von Th1-Zellen hingegen wird sowohl auf direktem als auch auf indirektem Wege (z.B. durch verminderte Induktion durch Makrophagen) gehemmt (Macatonia, 1993; O'Farrell, 1998; Joss, 2000). Die Produktion von pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen in Makrophagen und Th1-Zellen wird ebenfalls direkt und indirekt durch IL-10 inhibiert (de Waal Malefyt, Abrams *et al.* 1991, Fiorentino, Zlotnik *et al.* 1991, D'Andrea, Aste-Amezaga *et al.* 1993, Joss, Akdis *et al.* 2000, Couper, Blount *et al.* 2008).

Ex vivo mit MAP stimulierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, engl. *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), erreichten bereits nach zwei- bzw. achtstündiger Stimulation Höchstwerte in der IFN- γ -Expression, während der Gipfel der IL-10-Expression nach 18 Stunden erreicht wurde (Coussens 2004). Die regulatorische Wirkung von IL-10 setzt damit zeitversetzt zu der pro-inflammatorischen Wirkung von IFN- γ ein. So minimiert IL-10 Gewebsschäden durch ausufernde Entzündungsreaktionen. Allerdings trägt die Inhibition der zellvermittelten Immunantwort zum Kontrollverlust über die MAP-Infektion bei. Infektionsversuche mit Mäusen und verschiedenen Stämmen von *M. bovis* bzw. *M. avium* haben gezeigt, dass eine fehlende Expression von IL-10 bzw. Neutralisation von IL-10 mit spezifischen Antikörpern zu einer vergleichsweise niedrigeren Bakterienlast in Organproben von z.B. der Milz und Leber führt (Bermudez and Champs 1993, Denis and Ghadirian 1993, Murray and Young 1999, Roque, Nobrega *et al.* 2007).

2.2.7.6 TGF- β

Aktiviert Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren TGF- β , es kann aber auch aus Thrombozyten freigesetzt werden (Assoian, Komoriya *et al.* 1983, Kehrl, Wakefield *et al.* 1986, Assoian, Fleurdelys *et*

al. 1987, Grotendorst, Smale *et al.* 1989). TGF- β ist sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirksam (Ruscetti and Palladino 1991, Wahl 1992). Zu Beginn einer Entzündungsreaktion unterstützt TGF- β maßgeblich die zelluläre Immunantwort, indem es per Chemotaxis Monozyten, neutrophile Granulozyten und T-Zellen an den Ort des Geschehens lockt und die Phagozytose fördert (Wahl, Hunt *et al.* 1987, Welch, Wong *et al.* 1990, Adams, Hathaway *et al.* 1991, Brandes, Mai *et al.* 1991, Reibman, Meixler *et al.* 1991). Auf differenzierte, aktivierte Lymphozyten wirkt TGF- β allerdings nicht mehr aktivierend, sondern regulierend, indem es die Proliferation hemmt (Kehrl, Wakefield *et al.* 1986, Wahl, Hunt *et al.* 1988, Christ, McCartney-Francis *et al.* 1994). Auch die Aktivität von bereits aktivierten Makrophagen und NK-Zellen wird durch TGF- β nicht weiter gefördert, da die Zellen in diesem Zustand die Anzahl der TGF- β -Rezeptoren herunter regulieren (Rook, Kehrl *et al.* 1986, Tsunawaki, Sporn *et al.* 1988, Wahl, McCartney-Francis *et al.* 1990). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Produktion und Wirkung von IFN- γ , TNF- α und IL-12 mindert (Espevik, Figari *et al.* 1987, Tsunawaki, Sporn *et al.* 1988, Schmitt, Hoehn *et al.* 1994, Boehm, Klamp *et al.* 1997).

Hirsch, Yoneda *et al.* (1994) fanden in einem *ex vivo* Versuch, dass eine Neutralisation von TGF- β das intrazelluläre Wachstum von *M. tuberculosis* in humanen Monozyten reduziert. Demzufolge ist die Produktion von TGF- β nicht förderlich für die Elimination von MAP und trägt zum Kontrollverlust über mykobakterielle Infektionen bei.

2.3 Diagnostik der Paratuberkulose mittels direktem Erregernachweis

Da vom lebenden Tier zwar Kot-, aber ohne Schädigung der Tiere sowie erheblichen Aufwand keine Organproben gewonnen werden können, ist *intra vitam* die Sensitivität der direkten Nachweismethoden abhängig von der MAP-Ausscheidung. Vor allem in den ersten sechs Lebensmonaten der Tiere, in denen kaum MAP ausgeschieden wird (vgl. 2.2.5), haben diese Methoden eine sehr geringe Sensitivität. Auch in späteren Infektionsstadien sind oftmals Mehrfachtestungen nötig, um bei intermittierender oder geringer Ausscheidung von MAP alle infizierten Tiere zu erkennen (Whitlock, Wells *et al.* 2000, Nielsen and Ersboll 2006).

2.3.1 Nachweis von MAP mit Hilfe kultureller Anzucht

Obwohl MAP sich im Wirtstier vor allem intrazellulär vermehrt, ist die zellfreie kulturelle Anzucht auf bestimmten Nährmedien möglich. Das Wachstumsverhalten

hinsichtlich Mykobaktinabhängigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit sowie die Morphologie von Kolonien und Bakterien und das Färbeverhalten in der Ziehl-Neelsen-Färbung geben dabei Hinweise darauf, ob es sich um MAP handeln könnte (Glanemann, Hoelzle *et al.* 2004, Douarre, Cashman *et al.* 2010, Gilardoni, Paolicchi *et al.* 2012). Letztlich muss zu einer sicheren Identifizierung der Mykobakterienspezies der sehr langwierigen kulturellen Anzucht noch eine Polymerase-Ketten-Reaktion, engl. *polymerase chain reaction* (PCR), angeschlossen werden. Bis mit bloßem Auge sichtbare Kolonien entstehen, können vier, bei bestimmten Stämmen sogar bis zu acht Monate vergehen (Collins, Stephens *et al.* 1993, de Juan, Alvarez *et al.* 2006, Sevilla, Garrido *et al.* 2007). Kontaminationen der Kulturmedien mit Bakterien oder Pilzen können trotz vorgeschalteter Dekontaminationsschritte vorkommen und die Auswertung verhindern (Collins, Stephens *et al.* 1993, Kalis, Hesselink *et al.* 1999, Glanemann, Hoelzle *et al.* 2004, Nielsen, Kolmos *et al.* 2004, de Juan, Alvarez *et al.* 2006, Sevilla, Garrido *et al.* 2007).

Aufgrund seiner Spezifität von 100 % gilt der durch die kulturelle Anzucht erbrachte, direkte Nachweis von vermehrungsfähigen MAP aus Organ- oder Kotproben nach wie vor als Goldstandard (Crossley, Zagmutt-Vergara *et al.* 2005, Douarre, Cashman *et al.* 2010, Gilardoni, Paolicchi *et al.* 2012). Bei der Verwendung als Goldstandard ist allerdings die eingeschränkte Sensitivität zu berücksichtigen (Clark, Koziczowski *et al.* 2008, Norton, Johnson *et al.* 2010, Timms, Gehringer *et al.* 2011).

So wurden für den Nachweis von MAP aus Kotproben von klinisch inapparent infizierten Rindern je nach Studie variable Sensitivitäten von 20 bis 73,8 % angegeben (McNab, Meek *et al.* 1991, Sockett, Carr *et al.* 1992, Whitlock, Wells *et al.* 2000, Nielsen, Gronbaek *et al.* 2002, Nielsen and Toft 2008). Nielsen, Gronbaek *et al.* (2002) betonten, dass die Sensitivität stark vom Infektionsstatus der untersuchten Population abhängig sei. Für den kulturellen Nachweis von MAP aus Kotproben von klinisch unauffälligen Schafen und Ziegen ermittelten Kostoulas, Leontides *et al.* (2006) Sensitivitäten von lediglich 16 bzw. 8 %. Andere Studien mit natürlich MAP-infizierten Ziegen zeigten jedoch, dass in diversen Herden 10,6 bis 40 % der klinisch unauffälligen Tiere mittels Kultur als MAP-infiziert erkannt wurden (Salgado, Kruze *et al.* 2007, Florou, Leontides *et al.* 2009, Lybeck, Storset *et al.* 2010).

Bei klinisch apparent infizierten Rindern zeigte die kulturelle Anzucht aus Kotproben eine Sensitivität von 70 % (Nielsen and Toft 2008). Der Nachweis gelang bei Ziegen

mit klinisch apparenter Infektion bei 40 % der Tiere mit paucibazillärer Form und bei 84,6 % derer, die die multibazilläre Form aufwiesen (Tripathi, Periasamy *et al.* 2006).

Die Sensitivität des MAP-Nachweises mittels kultureller Anzucht ist also auch abhängig von der Tierart. Möglicherweise ist dies bedingt durch die schwierigere kulturelle Anzucht des MAP Typ I bzw. seine größere Empfindlichkeit gegenüber Dekontaminationsschritten. Der MAP Typ I ist nämlich vor allem bei kleinen Wiederkäuern zu finden (Collins, Gabric *et al.* 1990, Juste, Marco *et al.* 1991, Whittington, Marsh *et al.* 1999, Kostoulas, Leontides *et al.* 2006).

Radiometrische Methoden können den kulturellen Nachweis von MAP noch sensibler gestalten und die Untersuchungszeit verkürzen (Collins, Kenefick *et al.* 1990, Damato and Collins 1990, Eamens, Whittington *et al.* 2000). Hierbei kommen radioisotop-markierte Stoffe zum Einsatz, die die metabolische Aktivität von MAP anzeigen, bevor sichtbare Kolonien entstehen. Jedoch findet diese Methode aus Strahlenschutzgründen kaum mehr Verwendung.

2.3.2 Nachweis von MAP-spezifischen Gensequenzen

Eine sichere Bestimmung als MAP ist möglich durch eine PCR, die durch Amplifikation selbst geringe Mengen einer für MAP spezifischen Gensequenz detektierbar macht. Im nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose am Friedrich-Loeffler-Institut Jena wird zu diesem Zweck derzeit die MAP-spezifische Insertionssequenz (IS) 900 als Zielsequenz verwendet (Collins, Gabric *et al.* 1989, Green, Tizard *et al.* 1989, Englund, Ballagi-Pordany *et al.* 1999). Die PCR kann der Kultur nachgeschaltet oder direkt mit Extrakten von Organ- oder Kotproben durchgeführt werden.

Wie beim kulturellen Nachweis von MAP wurde auch für den Nachweis mittels PCR-Untersuchung in mehreren Studien eine Spezifität von 100 % ermittelt (Stabel and Bannantine 2005, Schonenbrucher, Abdulmawjood *et al.* 2008, Imirzalioglu, Dahmen *et al.* 2011). Aber nur bei Durchführung dieser mit Koloniematerial aus der Kultur ist sichergestellt, dass lebende, vermehrungsfähige MAP nachgewiesen werden.

Mit geeigneten PCR-Systemen ist in 93 bis 100 % der mittels kultureller Anzucht als MAP-positiv ermittelten Kotproben ebenfalls MAP nachweisbar (Fang, Wu *et al.* 2002, Christopher-Hennings, Dammen *et al.* 2003, Schonenbrucher, Abdulmawjood *et al.* 2008). Der Nachweis via PCR kann sogar sensibler sein als der Nachweis mit Hilfe der kulturellen Anzucht (Vansnick, de Rijk *et al.* 2007, Salgado, Steuer *et al.*

2013). Jedoch hängt bei der Verwendung von Kot als Probenmaterial die Sensitivität der PCR wie die der kulturellen Anzucht von der Höhe der MAP-Ausscheidung zum Zeitpunkt der Probenahme ab. Die Sensitivität der PCR ist darüber hinaus abhängig von dem Erfolg der DNA-Extraktion bzw. der Beseitigung der die Reaktion störenden Substanzen (Monteiro, Bonnemaïson *et al.* 1997, Thornton and Passen 2004, Schonenbrucher, Abdulmawjood *et al.* 2008).

Die PCR ist, wenn auch nicht der Goldstandard, aus praktischen Gründen oftmals die Methode der Wahl. Während die kulturelle Anzucht mehrere Wochen benötigt, liefert die PCR je nach DNA-Extraktionsmethode innerhalb weniger Tage ein Ergebnis (Imirzalioglu, Dahmen *et al.* 2011, Salgado, Steuer *et al.* 2013, Plain, Marsh *et al.* 2014). Neue, effizientere Methoden der DNA-Extraktion könnten dazu beitragen, die Sensitivität der PCR zu erhöhen (Singh, Singh *et al.* 2008, Logar, Kopinc *et al.* 2012).

2.4 Diagnostik der Paratuberkulose mittels indirektem Erregernachweis

Beim indirekten Erregernachweis wird nicht der Erreger selbst, sondern die Reaktion des Immunsystems auf den Erreger nachgewiesen. Dabei kann sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort Ziel der Untersuchung sein. Bei ersterer werden erreger-spezifische Antikörper in Blut- oder Milchproben detektiert, bei letzterem das Vorhandensein von erreger-spezifischen T-Effektor- und T-Gedächtniszellen. Daher ist die Sensitivität dieser Nachweise abhängig vom Zeitpunkt des Einsetzens und der Beständigkeit der jeweiligen Immunreaktion.

2.4.1 Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern

Die Sensitivität des Antikörper-Nachweises ist abhängig von der Serokonversion der Tiere, welche nur selten bei Tieren in einem Alter von unter zwei Jahren nachgewiesen wurde (Nielsen and Toft 2006, Robbe-Austerman, Gardner *et al.* 2006, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Mehrere Studien zum Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern haben gezeigt, dass Jungtiere mit höherer Wahrscheinlichkeit falsch-negativ befundet werden als ältere Tiere (Muskens, Mars *et al.* 2003, Nielsen and Toft 2006, Robbe-Austerman, Gardner *et al.* 2006, Nielsen, Toft *et al.* 2013). Ältere, mit MAP infizierte Tiere weisen jedoch ebenfalls nicht immer nachweisbare Antikörpertiter auf. Diese eingeschränkte Sensitivität serologischer Tests muss bei der Interpretation der Ergebnisse bzw. schon bei der Wahl des Tests beachtet werden.

2.4.1.1 Antikörper-ELISA

Derzeit sind fünf kommerziell erhältliche ELISA-Systeme (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, zu Deutsch: Kurzbezeichnung eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens) in Deutschland zur Untersuchung von Seren und Milchproben zugelassen. Bei den meisten sind Mikrotiterplatten mit Antigenen beschichtet, welche MAP-spezifische Antikörper aus darauf geschichteten Seren oder Milchproben binden. Die Menge an gebundenen Antikörpern wird mit Hilfe von gegen diese gerichteten Antikörpern detektiert: Ein Enzym, das an diese Detektions-Antikörper gekoppelt ist, verursacht nach Zugabe eines geeigneten Substrats eine Farbreaktion, die mittels Photometer quantifiziert werden kann. Die in einer Vertiefung gemessene optische Dichte (OD) ist schließlich proportional zur Menge des darin gebundenen MAP-spezifischen Antikörpers.

Der Antikörper-ELISA mit Vorabsorption hat unter den derzeit für MAP etablierten indirekten Nachweissystemen die höchste Spezifität. Durch Zugabe von *M. phlei*-Antigenen zu den Seren können kreuzreaktive Antikörper im Vorfeld der Untersuchung absorbiert werden (Yokomizo, Yugi *et al.* 1985, Scott, Bannantine *et al.* 2010). Ohne diese Vorabsorption kann ein vorheriger Kontakt der Tiere zu in der Umwelt vorkommenden Mykobakterien zu falsch-positiven Ergebnissen führen und die Spezifität des Tests senken (Yokomizo, Yugi *et al.* 1985, Osterstock, Fosgate *et al.* 2007, Scott, Bannantine *et al.* 2010). Für verschiedene ELISA-Systeme mit Vorinkubation wurden unabhängig von der Verwendung von Serum oder Milch als Probenmaterial in Studien mit Rindern, Schafen und Ziegen Spezifitäten zwischen 93 und 100 % ermittelt (Milner, Mack *et al.* 1990, Whitlock, Wells *et al.* 2000, Munjal, Boehmer *et al.* 2004, Gumber, Eamens *et al.* 2006, van Weering, van Schaik *et al.* 2007, Singh, Singh *et al.* 2009, Nielsen, Toft *et al.* 2013, Angelidou, Kostoulas *et al.* 2014).

Die Sensitivität des Tests ist stark abhängig vom Infektionsstadium. Bei Studien mit klinisch inapparent infizierten Rindern, die keine oder nur geringe Mengen an MAP ausscheiden (für Schafe und Ziegen liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor), lag die Sensitivität des Antikörper-ELISA mit Serumproben lediglich bei 15 bis 47,8 % (Sockett, Conrad *et al.* 1992, Sweeney, Whitlock *et al.* 1995, Whitlock, Wells *et al.* 2000). Da diese Tiergruppe typischerweise ca. 70 % der infizierten Tiere in einer Herde ausmacht (Whitlock, Wells *et al.* 2000), ist die allgemeine Sensitivität nicht zu hoch einzuschätzen und wurde in verschiedenen Studien mit 32 bis 58,8 %

für Rinder und mit 21,9 bis 44 % für Schafe angegeben (Sackett, Conrad *et al.* 1992, Sweeney, Whitlock *et al.* 1995, Sergeant, Marshall *et al.* 2003, Nielsen and Toft 2008). Bei MAP-infizierten Ziegen zeigte sich der Serumantikörper-ELISA weitaus sensitiver als bei anderen Wiederkäuerspezies. Es wurden hier allgemeine Sensitivitäten von 63 bis 74,3 % ermittelt (Gumber, Eamens *et al.* 2006, Kostoulas, Leontides *et al.* 2006, Salgado, Kruze *et al.* 2007).

Bei der Testung von Seren klinisch apparent infizierter Tiere hingegen wurden durchweg höhere Sensitivitäten ermittelt: Während in verschiedenen Studien bei Rindern die Sensitivität des Serumantikörper-ELISA 50 bis 87 % betrug, wurden bei Schafen und Ziegen Sensitivitäten von 36 bis 85 % bzw. von 82 bis 100 % ermittelt (Milner, Mack *et al.* 1990, Whitlock, Wells *et al.* 2000, Nielsen and Toft 2008). Der Nutzen eines so spät im Infektionsverlauf gewonnenen Befundes ist jedoch relativ begrenzt. Bei Verwendung von Milch als Probenmaterial ermittelten unterschiedliche Studien, die keine besonderen Angaben in Bezug auf das Krankheitsstadium der Tiere machten, Sensitivitäten des Antikörper-ELISA von 21 bis 82 % (Nielsen and Toft 2008, Angelidou, Kostoulas *et al.* 2014).

2.4.1.2 Sonstige Methoden zum Nachweis von spezifischen Antikörpern

Andere serologische Methoden wie die Komplement-Bindungs-Reaktion oder der Agar-Gel-Immunodiffusionstest weisen in der Paratuberkulosedagnostik im Vergleich zum Antikörper-ELISA oftmals eine geringere Spezifität und Sensitivität auf (Ferreira, Fonseca *et al.* 2002, Tripathi, Periasamy *et al.* 2006, Ikonomopoulos, Balaskas *et al.* 2007, Timms, Gehringer *et al.* 2011). Sie sind deshalb nicht mehr zeitgemäß und finden kaum noch Anwendung.

2.4.2 Nachweis der zellvermittelten Immunantwort auf MAP

Wenn die zellvermittelte Immunantwort auf MAP nachgewiesen werden soll, sind sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch agierende, für MAP-Antigene sensibilisierte Immunzellen das Ziel. Bei mit MAP infizierten Tieren kommen diese nicht nur im mit MAP infiltrierten Gewebe, sondern auch im peripheren Blutkreislauf zirkulierend vor (de Lisle and Duncan 1981, Stabel 1996, Bassey and Collins 1997, Coussens 2004). Daher kann die zelluläre Immunantwort auf MAP nicht nur im infizierten Gewebe, sondern auch in der Peripherie nachgewiesen werden. Dies macht man sich beim Intrakutantest, aber auch beim IFN- γ -Test zu Nutze. Bei beiden Tests wird die

Reaktion zirkulierender Th1-Effektor- und entsprechender T-Gedächtniszellen auf eine Restimulation mit MAP-Antigenen detektiert (Burrells, Clarke *et al.* 1999, Waters, Miller *et al.* 2003, Koo, Park *et al.* 2004, Stabel, Kimura *et al.* 2007).

Analog zu dem für den Nachweis der Tuberkulose verwendeten Antigengemisch, Tuberkulin, wurde für die Paratuberkulosedagnostik Johnin, engl. *johnin purified protein derivative* (JPPD), aus Proteinen von MAP-Kulturen hergestellt (Steadham, Martin *et al.* 2002, Wynne, Shiell *et al.* 2012). In manchen Studien werden aber auch Vollzellantigene aus mit Ultraschall behandelten MAP-Kulturen zur Restimulation verwendet (Stabel 1996, Steadham, Martin *et al.* 2002, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006, Wynne, Shiell *et al.* 2012). Aus beiden Methoden gehen Proteingemische hervor, die nicht ausschließlich MAP-spezifische Antigene enthalten (vgl. 2.1.1; Wynne, Shiell *et al.* 2012). Reaktionen auf nicht MAP-spezifische Bestandteile dieser Stimulantien von Tieren, die mit anderen Mykobakterienspezies Kontakt hatten, können daher die Spezifität des Tests einschränken (Chiodini, Van Kruiningen *et al.* 1984, Gilot, De Kesel *et al.* 1992, Gilot and Cocito 1993). Auch sind Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen bekannt, die sich auf die Ergebnisse der Tests auswirken können (Kalis, Collins *et al.* 2003, Robbe-Austerman, Gardner *et al.* 2006). Es ist allerdings bisher kein MAP-spezifisches Antigen bekannt, das mit seiner Potenz, die IFN- γ -Freisetzung von T-Zellen zu stimulieren, die Verwendung von JPPD oder anderen Vollzellantigenen ablösen könnte (vgl. 2.4.2.3). Daher wird bei experimentellen Ansätzen zur Restimulation für den Intrakutantest oder IFN- γ -Test nach wie vor hauptsächlich JPPD verwendet. Das Geflügeltuberkulin, engl. *avian purified protein derivative* (APPD), welches in der Tuberkulosedagnostik als Spezifitätskontrolle eingesetzt wird, wird dabei ebenfalls häufig zum Vergleich eingesetzt (Kormendy 1988, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Wynne, Shiell *et al.* 2012). APPD wird analog zum JPPD aus dem zu MAP weitgehend homologen Stamm D4 von *M. avium* gewonnen (Gilot and Cocito 1993, Borsuk, Newcombe *et al.* 2009, Wynne, Shiell *et al.* 2012).

Sowohl für den Intrakutantest als auch für den IFN- γ -Test gilt, dass ihre Spezifität stark von der in der Studie verwendeten Kontrollgruppe abhängt. Kreuzreaktionen und damit einhergehende falsch-positive Ergebnisse können nicht nur auftreten, wenn das Tier Kontakt mit einer verwandten Mykobakterienspezies hatte, sondern auch, wenn es gegen *M. bovis* oder MAP geimpft wurde (Köhler, Gyra *et al.* 2001, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Storset, Berg *et al.* 2005). Es können allerdings auch

mit MAP infizierte aber nicht als solche erkannte Tiere fälschlicherweise nach Anwendung des IFN- γ -Test als falsch-positiv deklariert werden, wenn das Kriterium zur Feststellung des Infektionsstatus zum Zeitpunkt der Untersuchung keine ausreichende Sensitivität aufweist (Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006). Für die nachfolgenden Darstellungen wurden daher solche Studien herangezogen, in denen besonderes Augenmerk auf die MAP-Freiheit der nicht gegen Mykobakterien geimpften Kontrollgruppe gelegt wurde.

2.4.2.1 Intrakutantest

In experimentellen Ansätzen wird ein für die Paratuberkulose adaptierter Intrakutantest verwendet. Ziel ist es, die Reaktion sensibilisierter T-Zellen auf das subkutan verabreichte JPPD im Vergleich zur Reaktion auf APPD *in vivo* darzustellen. Obwohl dabei keine Labormethoden zum Einsatz kommen, ist der Test dennoch mit hohem Aufwand verbunden. Nach subkutaner Applikation der Antigene muss die Hautdicke an den Injektionsstellen zweimal von geschultem Personal gemessen werden. Die Zunahme der Hautdicke, gemessen direkt im Anschluss an die Injektion bzw. 24 bis 72 Stunden danach, gibt Aufschluss über die zelluläre Immunantwort auf die injizierten Antigene. Je nach Studie wird eine Zunahme der Hautdicke von mehr als 3 mm bzw. mehr als 5 mm als positive Reaktion betrachtet (de Lisle, Seguin *et al.* 1980, Chiodini, Van Kruiningen *et al.* 1984).

Für den Intrakutantest wurden in verschiedenen Studien zum Nachweis der Paratuberkulose bei Rindern, Schafen und Ziegen Spezifitäten von 91,5 bis 100 % ermittelt (Perez, Tellechea *et al.* 1999, Kalis, Collins *et al.* 2003, Storset, Berg *et al.* 2005, Antognoli, Hirst *et al.* 2007).

Mit Hilfe des Intrakutantests konnten in natürlich infizierten Herden bereits ab einem Alter von zwei Monaten bzw. ab sechs Wochen nach experimenteller Infektion erste positive Ergebnisse erbracht werden (Reddacliff and Whittington 2003, Antognoli, Hirst *et al.* 2007). Allerdings haben bisher nur wenige Studien eine Sensitivität für diesen Test ermittelt. Dies ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass bei positiven Ergebnissen in Jungtieren mangels geeigneter Tests der wahre Infektionsstatus schwer festzustellen ist (Kalis, Collins *et al.* 2003). Bei mindestens zwölf Monate alten Schafen wurden in zwei Studien Sensitivitäten von 55,6 bzw. 73,3 % ermittelt (Perez, Tellechea *et al.* 1999, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006). In einer Studie mit natürlich infizierten, zwei bis acht Monate alten Kälbern erbrachte der Intrakutan-

test hingegen lediglich bei 3,7 bis 11 % der Tiere ein positives Ergebnis (Antognoli, Hirst *et al.* 2007). Für adulte Rinder konnten jedoch insbesondere bei klinisch inapparent infizierten Tieren deutliche Reaktionen gezeigt werden (Stabel, Kimura *et al.* 2007). Tripathi, Periasamy *et al.* (2006) wandten den Intrakutantest in einer Gruppe klinisch und histopathologisch erkennbar mit MAP infizierter Ziegen an und ermittelten eine Sensitivität von 73,5 %. Anders als bei anderen diagnostischen Tests zeigte sich dabei der Intrakutantest bei den Ziegen mit paucibazillären Läsionen im Darm sensitiver (88,8 %) als bei denen mit multibazillären Läsionen (68 %). Auch bei experimentell infizierten Schafen wurden besonders starke Reaktionen auf den Intrakutantest bei Tieren gefunden, die vergleichsweise wenige MAP in den Organproben aufwiesen (Gilmour, Angus *et al.* 1977).

Es sollte beachtet werden, dass die beim Intrakutantest vorgenommene Injektion mykobakterieller Antigene die Reaktion auf nachfolgende IFN- γ -Tests beeinflussen kann. So zeigten sich die Ergebnisse im IFN- γ -Test bei klinisch inapparent infizierten Rindern bis zu drei Wochen nach einem Intrakutantest signifikant erhöht (Stabel, Kimura *et al.* 2007). Robbe-Austerman, Stabel *et al.* (2007) hielten jedoch fest, dass ein positives Ergebnis im IFN- γ -Test nicht durch Exposition mit Antigenen, sondern nur nach Kontakt mit lebenden MAP erreicht wird. Studien, die den Einfluss des Intrakutantests auf einen nachfolgenden IFN- γ -Test zum Nachweis der Rindertuberkulose beschrieben, kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen (Rothel, Jones *et al.* 1992, Whipple, Palmer *et al.* 2001, Gormley, Doyle *et al.* 2004).

2.4.2.2 IFN- γ -Test

Zum Nachweis der Rindertuberkulose wird der IFN- γ -Test, der die Freisetzung von IFN- γ nach spezifischer Restimulation der Immunzellen *in vitro* detektiert, bereits erfolgreich angewendet (Wood, Corner *et al.* 1991, Rothel, Jones *et al.* 1992, Antognoli, Remmenga *et al.* 2011). In der Paratuberkuloseforschung findet eine für diesen Zweck adaptierte Form des IFN- γ -Tests bereits experimentell Verwendung, wenngleich die Interpretation der Ergebnisse variiert (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Stabel 1996, Perez, Tellechea *et al.* 1999, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Storset, Berg *et al.* 2005).

Da beim IFN- γ -Test die Restimulation der T-Effektor- und T-Gedächtniszellen *ex vivo* vorgenommen wird, beschränkt sich die Manipulation am Tier auf eine Blutentnahme.

So erfolgt keine Beeinflussung des Immunsystems der Tiere durch Antigen-Injektion und objektivierbare Testkriterien können leichter etabliert werden. Die Art und Menge der von den Immunzellen ohne bzw. nach Restimulation mit MAP-Antigen produzierten Zytokine lässt Rückschlüsse auf den Funktionszustand der Zellen zu. Die IFN- γ -Freisetzung durch Antigen-stimulierte Lymphozyten des peripheren Blutes korreliert mit der Anzahl der im Blut zirkulierenden, antigen-spezifisch aktivierten T-Zellen, kann dabei aber sensitiver sein als Tests, die diese anhand der Proliferation von Lymphozyten darstellen (Burrells, Inglis *et al.* 1995, Bassey and Collins 1997).

Bei Anwendung des IFN- γ -Tests mit JPPD als Stimulans wurden bei Rindern, Schafen und Ziegen Spezifitäten von 93,6 bis 99 % ermittelt (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Perez, Tellechea *et al.* 1999, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Kalis, Collins *et al.* 2003, Huda, Jungersen *et al.* 2004, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Bei Jungtieren sind allerdings unspezifische Reaktionen beschrieben, die falsch-positive Ergebnisse des Tests verursachen können (McDonald, Ridge *et al.* 1999, Olsen and Storset 2001, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Huda, Lind *et al.* 2003). Antognoli, Hirst *et al.* (2007) gaben z.B. für Kälber im Alter von zwei Monaten lediglich eine Spezifität von 63,9 % an.

Bei adulten, natürlich und klinisch inapparent infizierten Rindern und Schafen wurden für den IFN- γ -Test Sensitivitäten zwischen 50 und 93,3 % berechnet (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Perez, Tellechea *et al.* 1999, Huda, Jungersen *et al.* 2004, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006, Antognoli, Hirst *et al.* 2007). Klinisch apparent infizierte Rinder wurden mit einer Sensitivität von 100 % als MAP-infiziert erkannt (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992). Aber auch bei klinisch inapparent infizierten Schafen mit paucibazillärer Form der Paratuberkulose ergaben sich Sensitivitäten von 87,5 bis 100% (Perez, Tellechea *et al.* 1999). Antognoli, Hirst *et al.* (2007) beschrieben bei natürlich infizierten Kälbern die ersten positiven Ergebnisse ab einem Alter von zwei Monaten. Bereits zwei bis elf Wochen nach experimenteller Infektion konnten positive Ergebnisse im IFN- γ -Test festgestellt werden (Gwozdz, Thompson *et al.* 2000, Storset, Hasvold *et al.* 2001, Reddacliff and Whittington 2003, Begg, O'Brien *et al.* 2005).

2.4.2.3 Modifikationen des IFN- γ -Tests

Um die Spezifität des IFN- γ -Tests zu steigern, ist es nötig, die bisher zur Stimulation verwendeten, nicht ausschließlich MAP-spezifische Bestandteile beinhaltenden Antigengemische durch ein MAP-spezifisches Stimulans zu ersetzen (Jungersen, Huda *et al.* 2002, Manning, Steinberg *et al.* 2003). Ob ein MAP-spezifisches Stimulans jedoch auch die vermehrt bei Jungtieren vorkommenden Reaktionen nicht infizierter Tiere (McDonald, Ridge *et al.* 1999, Olsen and Storset 2001, Hope, Sopp *et al.* 2002, Huda, Lind *et al.* 2003) reduzieren würde, ist noch fraglich. Aus der Studie von (Olsen and Storset 2001) ging jedenfalls hervor, dass naive Kälber unspezifische Reaktionen auf mykobakterielle Antigene zeigen, bei der möglicherweise NK-Zellen eine wesentliche Rolle spielen. Diese unspezifischen Reaktionen könnten allerdings ebenfalls bei MAP-spezifischen Proteinen auftreten, sofern diese Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren. Möglicherweise sind daher mit einem MAP-spezifischen Stimulans nur solche falsch-positiven Ergebnisse zu eliminieren, die durch Kreuzreaktionen und somit durch vorherigen Kontakt zu anderen Mykobakterien bedingt sind.

Verschiedene Studien wiesen bei infizierten Tieren eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ nach Stimulation von Blutproben bzw. PBMC mit einzelnen MAP-Proteinen nach (Olsen and Storset 2001, Shin, Chang *et al.* 2005, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2011, Gurung, Begg *et al.* 2014). Mikkelsen, Aagaard *et al.* (2011) gaben dabei an, dass es für drei der in ihrer Studie untersuchten Antigene keine Homologie in *M. avium* subsp. *avium* oder *M. bovis* gibt. Die Mehrzahl der in ähnlichen Studien verwendeten MAP-Proteine sind jedoch durch die enge Verwandtschaft mehrerer mykobakterieller Spezies und Subspezies nicht als MAP-spezifisch anzusehen (Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2011). Santema, Overdijk *et al.* (2009) untersuchten mit MAP 1718c ein MAP-spezifisches Protein und mit MAP 3515c eines, das in MAP stärker als in *M. avium* subsp. *avium* exprimiert wird. Beide rekombinanten Proteine zeigten weder beim Einsatz im Antikörper-ELISA noch im Lymphozytenstimulationstest diagnostisches Potential.

In der hier vorliegenden Studie wurden vier rekombinante MAP-spezifische Proteine eingesetzt, deren antigene Eigenschaften sich in vorherigen Untersuchungen erwiesen haben. Hughes, Bannantine *et al.* (2008) verglichen mittels 2-D Gelelektrophorese das Protein-Profil von MAP mit dem von *M. avium* subsp. *avium*. Dabei konnten

32 Proteine bei MAP identifiziert werden, die bei *M. avium* subsp. *avium* nicht oder sehr viel geringer exprimiert werden, darunter MAP 1365¹, MAP 0268c¹ und MAP 3651c¹. Die rekombinant hergestellten Proteine MAP 1365 und MAP 0268c wurden im ELISA und Western Blot durch Antikörper in Seren von klinisch apparent mit MAP infizierten Schafen erkannt. In einer nachfolgenden Studie induzierten die Proteine MAP 1365, MAP 0268c und MAP 3651c in der Mehrzahl der Blutproben von klinisch inapparent infizierten Schafen eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ (Hughes, Denham *et al.* 2013). Die berechnete Sekundärstruktur der Proteine lässt darauf schließen, dass MAP 0268c membran-assoziiert vorkommt, während für MAP 1365 und MAP 3651c anzunehmen ist, dass diese ungebunden im Inneren von MAP vorliegen (Hughes, Denham *et al.* 2013). Bull *et al.* (St George's, University of London; persönliche Mitteilung) fanden in serologischen Tests mit dem MAP-spezifischen rekombinanten Protein BLAG, dass Antikörper in Seren von *Morbus Crohn*-Patienten dieses Protein binden. Die rekombinanten MAP-Proteine MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c und BLAG sollten in größerem Maßstab auf ihre Eignung als Stimulans getestet werden und wurden dafür dankenswerterweise zur Verwendung in dieser Studie zur Verfügung gestellt.

Nicht nur zur Verbesserung der Spezifität, sondern auch hinsichtlich der Sensitivität wurden bereits Modifikationen des IFN- γ -Tests vorgenommen. Diese sind insbesondere dann von Vorteil, wenn zeitliche Verzögerungen und zu hohe Lager-temperaturen zwischen Blutentnahme und Beginn der Stimulation die Produktion von IFN- γ und damit die Sensitivität des Tests negativ beeinflussen (Robbe-Austerman, Krull *et al.* 2006, Bosward, Dhand *et al.* 2010). Die Auswertung der Probe kann jedoch auch nach einem suboptimalen Proben-transport gelingen, wenn die Probe während der Restimulation mit IL-12 oder IL-7 und IL-12 versehen wird (Jungersen, Mikkelsen *et al.* 2012, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2012, Plain, Begg *et al.* 2012). Auch bei Verwendung von frisch gewonnenen Blutproben kann eine Zugabe dieser Zytokine die IFN- γ -Freisetzung und damit die Sensitivität des Tests steigern. Ebenfalls zur Steigerung der Sensitivität beitragen kann eine Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 während der Stimulation. Dabei wird durch die Neutralisation von IL-10, dem funktionellen Antagonisten von IFN- γ , die Freisetzung von IFN- γ gesteigert

¹ Für die Verwendung der rekombinanten MAP-Proteine MAP 1365, MAP 0268c und MAP 3651c zur Restimulation von Zellen des peripheren Blutes oder der Haut mit dem Zweck der Entwicklung einer zellvermittelten Immunantwort ist ein Patent angemeldet (WO 2009/144478 A9).

(Buza, Hikono *et al.* 2004, Lybeck, Storset *et al.* 2009, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2012). Während in der Mehrzahl der Studien keine Sensitivitäten oder Spezifitäten dieser unterschiedlich modifizierten IFN- γ -Tests ermittelt wurden, gaben Mikkelsen, Aagaard *et al.* (2012) für IFN- γ -Tests mit JPPD unter Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 bzw. von IL-12 Spezifitäten von 92 bzw. 100 % an. In anderen Studien gab es jedoch Hinweise darauf, dass die Spezifität des Tests unter solchen Modifikationen leiden könnte (Lybeck, Storset *et al.* 2009, Plain, Begg *et al.* 2012).

2.4.2.4 Neue Biomarker der zellvermittelten Immunantwort

Auf der Suche nach neuen Biomarkern für eine MAP-Infektion beschäftigt sich die Wissenschaft auch mit der Erfassung der zellulären Immunantwort. Zu diesem Zweck können unter anderem Aktivierungszustände von CD4⁺ oder CD8⁺ Gedächtniszellen nach *ex vivo* Restimulation bestimmt werden. Einem anderen Ansatz folgend wird zur Darstellung der zellulären Immunantwort nach solcher Restimulation die durch MAP induzierte Zytokinproduktion auf der Ebene der Genexpression erfasst.

Aktivierungszustände ausgewählter Zellpopulationen können mit Hilfe eines Durchflusssytometers und geeigneter Antikörper bestimmt werden. Dafür werden reine oder gemischte Zellpopulationen mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch zelluläre Oberflächenantigene binden. Meistens wird die Bindung der Primärantikörper unter Verwendung von Sekundärantikörper detektiert, an welche ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Cordero, Salgado *et al.* 1997, Waters, Miller *et al.* 2003, Koo, Park *et al.* 2004). Anschließend können Zellpopulationen durch die Messung von Fluoreszenzsignalen unterschieden werden.

Anhand der Expression der Tyrosinphosphatase-Variante CD45RO und CD4- oder CD8-Rezeptoren können die antigen-spezifischen Gedächtniszellen erkannt werden (St Georgiev and Albright 1993, Trowbridge and Thomas 1994, Bembridge, MacHugh *et al.* 1995). Sie entwickeln sich bei der Auseinandersetzung des Immunsystems mit einem Antigen und sind langlebiger als T-Effektorzellen (Arlettaz, Barbey *et al.* 1999, Berard and Tough 2002). Aufgabe der Gedächtniszellen ist es, bei erneutem Auftreten des Erregers eine schnelle und stärkere Immunantwort zu initiieren (Bruno, Kirberg *et al.* 1995, Veiga-Fernandes, Walter *et al.* 2000, Berard and Tough 2002). Diese Reaktion lässt sich *ex vivo* durch eine Restimulation mit den jeweiligen Antigenen hervorrufen (Bembridge, MacHugh *et al.* 1995, Waters, Miller *et al.* 2003,

Stabel and Robbe-Austerman 2011). Im Zuge dieser erneuten Aktivierung werden die Proteine CD25 und CD26 auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert (Wallace and Beverley 1990, Fleischer 1994, Garcia, DiSanto *et al.* 1999, Gorrell, Gysbers *et al.* 2001). Mit entsprechenden Antikörpern lässt sich somit am Durchflusszytometer nicht nur der Zelltyp, sondern auch der Aktivierungszustand der Zellen messen (Bitegye, Hannier *et al.* 2002, Waters, Miller *et al.* 2003, Koo, Park *et al.* 2004).

Studien mit MAP-infizierten Rindern zeigten bereits, dass sich die Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ Gedächtniszellen durch Stimulation mit MAP-Antigenen steigern lässt (Waters, Miller *et al.* 2003, Koo, Park *et al.* 2004). Bei CD8⁺ Gedächtniszellen war dieser Effekt in geringerem Umfang zu beobachten (Koo, Park *et al.* 2004). Bei experimentell mit MAP infizierten Kälbern war mittels dieser Nachweise eine Unterscheidung zwischen Kontroll- und Versuchstieren zu einem früheren Zeitpunkt möglich als anhand des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum oder von MAP im Kot. Zu diesem Ergebnis und dem derzeitigen Verständnis der molekularen Pathogenese passend zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von CD26 und der Produktion von IFN- γ bei Lepra und anderen granulomatösen Erkrankungen (Scheel-Toellner, Richter *et al.* 1995).

In jüngeren Studien zur zellulären Immunantwort auf MAP wurden außerdem ganze Zytokinprofile von Immunzellen MAP-infizierter Tiere erhoben (Stabel 2000, Smeed, Watkins *et al.* 2007, Karcher, Beitz *et al.* 2008, Singh, Singh *et al.* 2013). Dabei ist aus diagnostischer Sicht von besonderer Bedeutung, spezifische Zytokinprofile als Biomarker für die Paratuberkulose zu finden, die Ergebnisse können jedoch auch zum Verständnis der Pathogenese der Erkrankung beitragen.

Bisher veröffentlichte Studien zur Genexpressionsanalyse bei mit Paratuberkulose infizierten Tieren weisen jedoch eine große Heterogenität bezüglich der untersuchten Tierspezies, der Art der Infektion (natürlich oder experimentell), der untersuchten Zellen (PBMC, Monozyten bzw. Proben verschiedener Organe) und der verwendeten Stimulantien auf.

Um die Ergebnisse für die Entwicklung diagnostischer Methoden nutzen zu können, untersucht man am besten *intra vitam* zugängliche Zellen, z.B. PBMC. Nach *ex vivo* Restimulation mit möglichst MAP-spezifischen Antigenen lassen sich Unterschiede in der Expression dieser Zellen zwischen naiven und MAP-infizierten Tieren finden. In einer Studie mit natürlich infizierten Rindern exprimierten mit MAP-Antigenen stimu-

lierte PBMC von klinisch inapparent infizierten Rindern signifikant mehr TNF- α und IFN- γ als solche von klinisch apparent infizierten Rindern bzw. Kontrolltieren (Stabel 2000). Die Stimulation mit MAP-Antigenen induzierte bei PBMC experimentell infizierter Ziegen im Vergleich zu PBMC von Kontrolltieren eine signifikant höhere Expression von IFN- γ vier und acht Monate *p.i.*, von IL-2 vier Monate *p.i.* und von IL-10 acht und zwölf Monate *p.i.* (Singh, Singh *et al.* 2013).

3 Zielsetzung der Studie

In Anbetracht der Defizite im Verständnis und in der Bekämpfung der Paratuberkulose, ergaben sich für die vorliegende Studie drei Hauptziele.

Das erste Ziel leitete sich aus dem Mangel an adäquaten Infektionsmodellen für die Paratuberkulose ab. So sollte die vorliegende Studie ein von Meyer *et al.* (2011) und Köhler *et al.* (2015) entwickeltes Infektionsmodell für Ziegen verwenden, um die Reproduzierbarkeit des Infektionserfolges zu beurteilen. Es sollte untersucht werden, ob auch die generelle Tauglichkeit als Modell für die natürliche Infektion mit MAP bestätigt werden kann. Es wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Hypothese 1: Das angewandte Inokulationsschema ist geeignet, eine Infektion mit MAP im Tiermodell sicherzustellen.

Die Notwendigkeit neue diagnostische Methoden mit hoher Sensitivität bei der Testung von Jungtieren zu entwickeln, führte zu der Festlegung eines zweiten Ziels für die vorliegende Studie. Es sollte die zelluläre Immunantwort auf MAP und insbesondere die Zytokinreaktion der PBMC auf eine *ex vivo* vorgenommene Restimulation derselben im Infektionsverlauf dargestellt werden. Die gewonnenen Daten sollten weiterhin dahingehend überprüft werden, ob sich die untersuchten Parameter zur Unterscheidung zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren eignen. Um letztlich das tatsächliche Potential der untersuchten Parameter für die Entwicklung neuer diagnostischer Tests gründlich zu beleuchten, wurden drei weitere Hypothesen zu diesem Themenkomplex formuliert und diskutiert:

Hypothese 2: Die angewandten Methoden sind geeignet, die zelluläre Immunantwort auf MAP bei Kontroll- und Versuchstieren darzustellen.

Hypothese 3: Die Kontroll- und Versuchstiere lassen sich anhand ihrer zellulären Immunantwort auf MAP differenzieren und dies früher als anhand der humoralen Immunantwort bzw. der MAP-Ausscheidung.

Hypothese 4: Die Spezifität bzw. die Sensitivität des IFN- γ -Tests lässt sich durch Verwendung MAP-spezifischer Antigene bzw. IL-10-blockierender Antikörper steigern.

Das dritte Ziel der vorliegenden Studie entwickelte sich schließlich aus dem Wissen um die Existenz unterschiedlicher Infektionsverläufe bei der Paratuberkulose.

Interindividuelle Unterschiede im Infektionsverlauf schlagen sich nicht nur in der Kontrolle der Infektion, sondern auch in der Ausprägung der Immunantwort auf MAP nieder. Da diese Unterschiede einerseits eine Bedeutung für die Diagnostik der Paratuberkulose haben, andererseits aber auch wichtige Erkenntnisse zu der Pathogenese liefern könnten, sollten sie in der vorliegenden Studie gesondert untersucht werden. Es wurde folgende Hypothese formuliert:

Hypothese 5: Immunpathologische Prozesse in der frühen Phase der Infektion bestimmen den Verlauf der Erkrankung bei Ziegen.

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeiner Versuchsablauf

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Reaktivität von PBMC mit Paratuberkulose infizierter Ziegen im Verlauf des ersten Lebensjahres *ex vivo* charakterisiert. Der Versuch fand am Standort Jena des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) statt (Registriernummer des Tierversuchsvorhabens: 04-001/11). Innerhalb des Projekts wurden 28 von 44 Thüringer Waldziegen experimentell mit MAP inokuliert. Dem in Abbildung (Abb.) 1 dargestellten Versuchsablauf folgend wurden über einen Zeitraum von 51 Wochen vierwöchentlich Blutproben gewonnen. Aus diesen wurden PBMC isoliert und *ex vivo* restimuliert. Nachfolgend wurde die Genexpression und Sekretion von ausgewählten Zytokinen sowie die Expression von Aktivierungsmarkern der PBMC bestimmt. Zu vier definierten Zeitpunkten fanden geplante Sektionen statt, wodurch sich im Verlauf des Versuches die Tier- und Gesamtprobenanzahl verringerte.

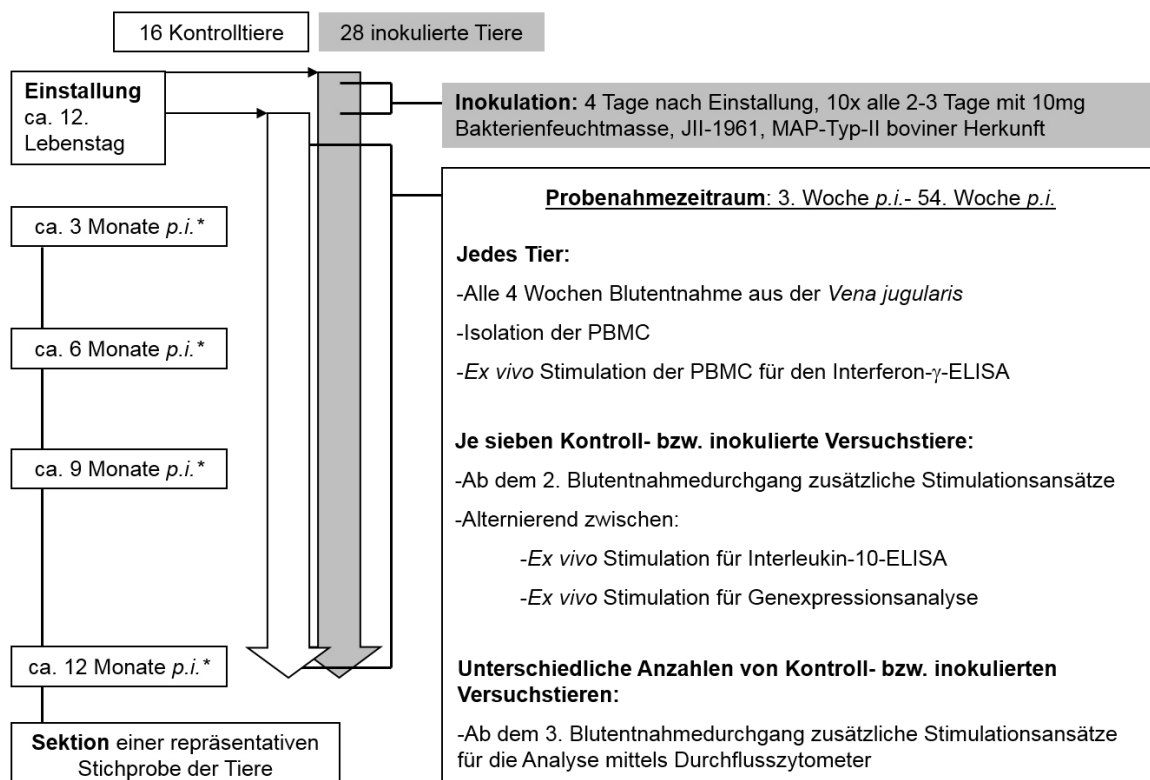


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Dargestellt sind Zeitstrahlen für die 16 Kontrolltiere (weiß) und die 28 inokulierten Versuchstiere (grau). Markiert sind die Zeitpunkte des Einstellens sowie der Sektionen, ebenso der Zeitraum der Inokulation bzw. der regelmäßigen Probenahmen.

(*) Angabe bezieht sich auf die inokulierten Versuchstiere. Die Sektionen der Kontrolltiere fanden jeweils ca. vier Wochen später statt, um Altersunterschiede auszugleichen.

Sofern nicht anders angegeben, wurden Arbeitsschritte wie auch Inkubationen bei Raumtemperatur in einem Labor der Schutzstufe S2 durchgeführt. Für alle Arbeitsschritte der Blutentnahme, PBMC-Isolation und -Stimulation wurden entweder vom Hersteller sterilisierte und steril verpackte Einwegmaterialien verwendet oder unsterile Einwegmaterialien und Glaswaren in geeigneten Verpackungen heißluft- oder dampfsterilisiert.

4.2 Versuchstiere

4.2.1 Herkunft und Gesundheitsstatus

Die 44 Thüringer Waldziegen stammten aus einem Herdbuchzuchtbestand mit Gesundheitskontrollmanagement. Anamnestisch gab es keine Hinweise auf Paratuberkulose. Alle laktierenden Tiere des Bestands wurden 2009 einmalig kotkulturell mit negativem Ergebnis auf die Ausscheidung von MAP untersucht.

Die Tiere wurden ca. am zwölften Lebenstag von ihrem Heimatbetrieb in das Friedrich-Loeffler-Institut Jena gebracht. Der Transport erfolgte in einem beheizbaren Tiertransporter, in dem die Tiere auf Einstreu untergebracht waren. Aufgrund unterschiedlicher Geburtstermine wurden 28 Tiere am 10.03.2011 und 16 Tiere am 04.04.2011 umgestallt.

Alle Tiere wurden in den ersten drei Tagen nach der Einnistung auf ausgewählte Krankheitserreger untersucht. Bei keinem der Tiere konnten durch kulturellen Nachweis *Salmonella* spp. in Kottupfern bzw. *Mycoplasma* spp. in Nasentupfern nachgewiesen werden. Der Nachweis von Chlamydiaceae-DNA gelang jeweils an einem von zwei Untersuchungstagen für die folgenden Tiere: Tier 7, Tier 8, Tier 15, Tier 23, Tier 30 (jeweils Kottupfer), Tier 20, Tier 35 (jeweils Nasentupfer) und Tier 24 (Augentupfer). Eine Behandlung entfiel, da keines der Tiere Symptome zeigte.

4.2.2 Einteilung der Tiere in Gruppen

Die Tiere wurden grundsätzlich so in die acht Versuchsgruppen eingeteilt, dass sowohl das mittlere Körpergewicht als auch das mittlere Alter bei Einnistung in allen Versuchsgruppen möglichst gleich waren. Um Häufungen von genetischen Einflüssen in einer Gruppe zu vermeiden, wurden Vollgeschwister auf unterschiedliche Versuchsgruppen aufgeteilt. Je sieben der 28 am 10.03.2011 eingestellten Ziegen wurden den Versuchstiergruppen V1, V2, V3 und V4 zugeordnet. Diese wurden nach

vier-tägiger Akklimationierung zehnmal alle zwei bis drei Tage mit MAP inokuliert. Die am 04.04.2011 eingestellten Tiere wurden den Kontrolltiergruppen K1, K2, K3 und K4 zugeteilt. Diese Tiere wurden nicht mit MAP inokuliert. K1, K2 und K3 umfassten je drei Tiere, K4 enthielt sieben Tiere. Diese Gruppeneinteilung legte den geplanten Zeitpunkt fest, zu dem die Tiere zur pathologischen Untersuchung sowie Organprobenahme aus dem Versuch entnommen wurden (Abb. 2). Die Tiere der Versuchstiergruppen V1, V2, V3 und V4 wurden jeweils 3, 6, 9 bzw. 13 Monate *p.i.* der Sektion zugeführt. Die Tiere der Kontrolltiergruppen K1, K2, K3 und K4 wurden altersgleich zu den Versuchstiergruppen V1, V2, V3 und V4 seziert, also mit jeweils ca. vier Wochen Versatz. Zwei Tiere haben außerplanmäßig den Versuch verlassen. Das Tier 24 (Gruppe V3) ist bereits am 03.04.11, vor Beginn der Blutentnahmen, verendet. Das Tier 20 (Gruppe V2) wurde am 11.05.11 aus Tierschutzgründen euthanasiert und der Sektion zugeführt.

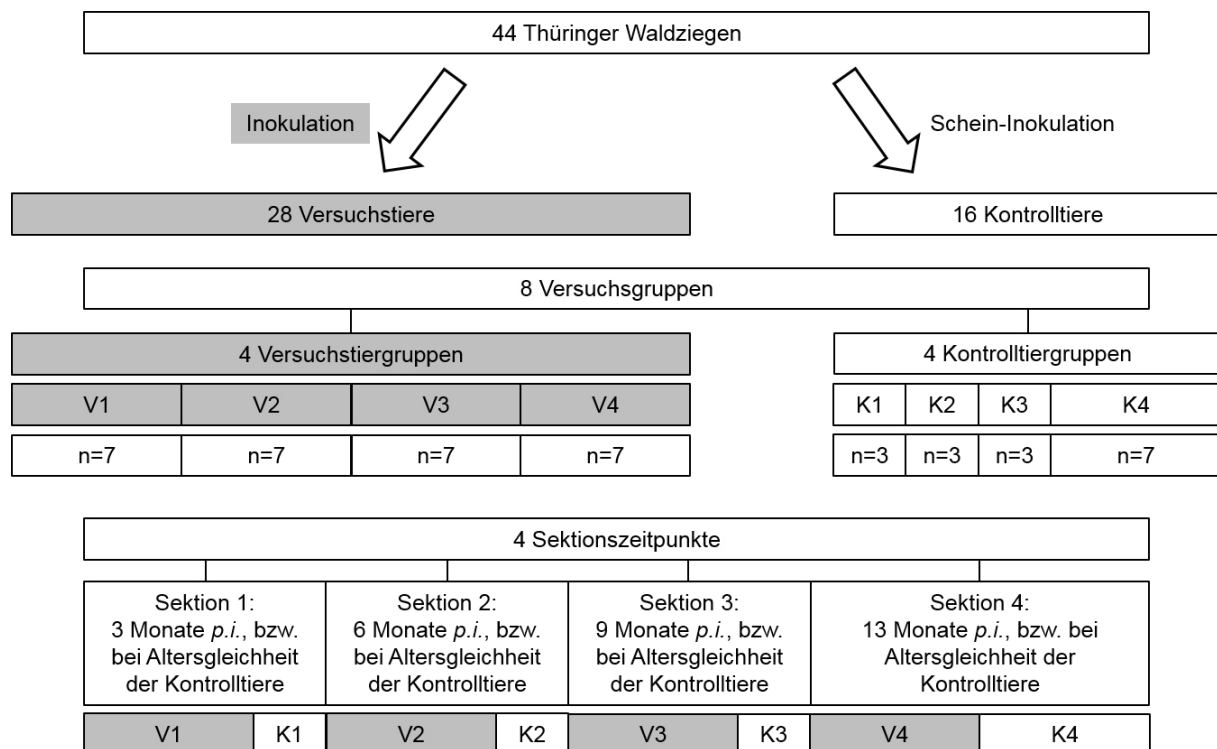


Abb. 2: Schematische Darstellung der Tiergruppeneinteilung. Dargestellt ist die Einteilung der 16 Kontrolltiere (weiß) und der 28 inokulierten Versuchstiere (grau) in Versuchsguppen. Die Sektionstermine sind mit der Einteilung in diese Gruppen determiniert.

Jedem Tier wurde eine Tiernummer (Tiernr.) zugeteilt. Eine dauerhafte Kennzeichnung der Tiere wurde mittels Ohrmarken und Halsbändern sichergestellt. Geschlecht, Alter und Gewicht der Tiere bei der Einstellung sowie die Gruppen- und Raumeinteilung sind in Tabelle (Tab.) 1 zu finden.

Tab. 1: Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen (VGr) sowie tierbezogene Daten.

VGr	Versuchs- raum	Tier- nr.	Geburts- datum	Einstellung			Sektion		
				Datum	Alter [Tage]	Gewicht [kg]	Datum	Alter [Wochen]	Woche <i>p.i.</i>
V1	R116	1	22.02.11	10.03.11	16	6,4	27.06.11	18	12
V1	R116	2*	23.02.11	10.03.11	15	6,8	29.06.11	19	12
V1	R116	3	26.02.11	10.03.11	12	5,8	04.07.11	19	13
V2	R116	4	22.02.11	10.03.11	16	6	20.09.11	31	24
V3	R116	5	23.02.11	10.03.11	15	6,4	12.12.11	42	36
V2	R116	6	26.02.11	10.03.11	12	4,6	29.09.11	31	25
V2	R116	7	26.02.11	10.03.11	12	5	29.09.11	31	25
V3	R116	8	23.02.11	10.03.11	15	6	14.12.11	43	36
V3	R116	9	24.02.11	10.03.11	14	5,8	19.12.11	43	37
V2	R116	10	25.02.11	10.03.11	13	7,6	22.09.11	30	24
V4	R116	11	23.02.11	10.03.11	15	7	31.01.12	49	43
V4	R116	12	25.02.11	10.03.11	13	5,8	16.04.12	60	54
V4	R116	13	26.02.11	10.03.11	12	5	18.04.12	60	54
V4	R116	14	27.02.11	10.03.11	11	6	19.04.12	60	54
V1	R118	15*	26.02.11	10.03.11	12	4,6	04.07.11	19	13
V1	R118	16	27.02.11	10.03.11	11	4,8	29.06.11	18	12
V1	R118	17	27.02.11	10.03.11	11	5,6	27.06.11	18	12
V1	R118	18	01.03.11	10.03.11	9	5,8	06.07.11	19	13
V2	R118	19	27.02.11	10.03.11	11	5,2	20.09.11	30	24
V2	R118	20	27.02.11	10.03.11	11	6,8	11.05.11	11	5
V2	R118	21	02.03.11	10.03.11	8	5,4	22.09.11	30	24
V3	R118	22	26.02.11	10.03.11	12	5,6	12.12.11	42	36
V3	R118	23	27.02.11	10.03.11	11	5,2	14.12.11	42	36
V3	R118	24	28.02.11	10.03.11	10	6,4	04.04.11	6	0
V3	R118	25	02.03.11	10.03.11	8	5	19.12.11	42	37
V4	R118	26	27.02.11	10.03.11	11	6	16.04.12	60	54
V4	R118	27	28.02.11	10.03.11	10	4,8	18.04.12	60	54
V4	R118	28	03.03.11	10.03.11	7	4,6	19.04.12	60	54
K 1	R112	29*	22.03.11	04.04.11	13	5,2	16.08.11	22	19
K 1	R112	30	24.03.11	04.04.11	11	6,6	18.08.11	22	19
K 1	R112	31*	26.02.11	04.04.11	37	11	16.08.11	25	19
K 2	R112	32	20.03.11	04.04.11	15	4,6	11.10.11	30	27
K 2	R112	33	22.03.11	04.04.11	13	5	11.10.11	30	27
K 2	R112	34	28.03.11	04.04.11	7	4,4	12.10.11	29	27
K 3	R112	35	20.03.11	04.04.11	15	3,2	09.01.12	43	40
K 3	R112	36	26.03.11	04.04.11	9	4,2	11.01.12	42	40
K 3	R112	37	28.03.11	04.04.11	7	3,8	09.01.12	42	40
K 4	R112	38	20.03.11	04.04.11	15	5	23.04.12	58	55
K 4	R112	39	21.03.11	04.04.11	14	6,4	25.04.12	58	55
K 4	R112	40	21.03.11	04.04.11	14	6,2	26.04.12	58	55
K 4	R112	41	22.03.11	04.04.11	13	4,4	23.04.12	57	55
K 4	R112	42	23.03.11	04.04.11	12	5	25.04.12	58	55
K 4	R112	43	23.03.11	04.04.11	12	6,2	26.04.12	58	55
K 4	R112	44	26.03.11	04.04.11	9	3,8	26.04.12	57	55

(*) Kennzeichnet weibliche Tiere. Alle anderen Tiere waren männlichen Geschlechts.

4.2.3 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden im Bereich Experimentelle Tierhaltung in drei getrennten, geschlossenen Stallräumen auf Stroheinstreu gehalten. Bei der Haltung wurden alle Anforderungen der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), die durch Artikel 1 der Verordnung vom 1. Oktober 2009 (BGBl. I S. 3223) geändert worden ist, eingehalten. Zur Minimierung des Verschleppungsrisikos wurden die Tierräume jeweils durch eine eigene Personalschleuse betreten. Alle zwei Wochen wurde die Einstreu komplett ausgetauscht und der Stall gereinigt.

Bis zur zwölften Lebenswoche (LW) wurde Milchaustauscher (MAT) per Tränkeimer angeboten. Gefüttert wurde bis zur fünften LW dreimal, danach zweimal täglich. Zusätzlich zum MAT wurden Heu und ab der sechsten LW Ziegenlämmerpellets angeboten. Etwa zweieinhalb Wochen nach Absetzen des MAT wurde innerhalb einer Woche auf Milchleistungspellets umgestellt. Die Menge an Pellets wurde schrittweise auf bis zu 200 g Pellets pro Tier und Mahlzeit erhöht (Endmenge in 33. LW erreicht). Über Selbsttränken stand im gesamten Versuchszeitraum Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Um die 7. LW wurden die männlichen Ziegen unter Betäubung unblutig kastriert.

4.3 Inokulation

Das Inokulationsschema wurde den Erkenntnissen vorangegangener Studien folgend gewählt (Meyer 2011, Köhler, Soschinka *et al.* 2015). Es wurde das Schema verwendet, das in diesen Studien eine sichere Infektion der Tiere bei möglichst hoher Übereinstimmung mit einer natürlichen Infektion zeigte. Für die Inokulation der Versuchstiere (n = 28) wurde Kulturmateriel des MAP-Stammes JII-1961 verwendet, welcher nur wenigen *in vitro* Passagen unterzogen worden war. Der Stamm wurde ursprünglich aus dem Ileozäkallymphknoten eines mit Paratuberkulose infizierten Rindes isoliert.

4.3.1 Vorbereitung des Inokulums

Der MAP-Stamm JII-1961 wurde ca. acht Wochen vor Beginn der Inokulation in Middlebrook-Bouillon mit OADC-Supplement und Mycobactinzusatz bei 37 °C im Schüttelinkubator (ca. 80 rpm) angezüchtet. Die Bouillon wurde 20 min bei 2880 x g

abzentrifugiert und der Überstand über der Bakterienfeuchtmasse (BFM) verworfen. Die BFM wurde ausgewogen und in steriler phosphatgepufferter Salzlösung, engl. *phosphate buffered saline* (PBS), resuspendiert. Von dieser Suspension wurden homogene Aliquots mit jeweils mindestens 280 mg BFM abgefüllt. Zur Lagerung wurde die BFM erneut 20 min bei $2880 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Aliquots wurden bei $5 \pm 3^\circ\text{C}$ gelagert. Am Vortag der Inokulation (bzw. drei Tage zuvor, wenn die Inokulation am Montag stattfand) wurde jeweils ein Aliquot mit BFM mit sterilem PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht. Über Nacht (bzw. von Freitag zu Montag bei Inokulation am Montag) wurde die Suspension bei 37°C im Schüttelinkubator bebrütet. Am Tag der Inokulation wurden homogene Einzeltierdosen von 10 ml Volumen abgefüllt.

Die tatsächlich verabreichte Anzahl an Koloniebildenden Einheiten wurde für jedes Inokulat durch Keimzahlbestimmung festgestellt (Tab. 2).

Tab. 2: Ermittelte Koloniebildende Einheiten (KBE) pro mg BFM bzw. KBE pro verabreichter Inokulationsdosis.

Datum der Inokulation	KBE/mg BFM	KBE/verabreichte Dosis
14.03.11	$4,8 \times 10^6$	$4,8 \times 10^7$
16.03.11	$5,51 \times 10^6$	$5,51 \times 10^7$
18.03.11	$2,51 \times 10^6$	$2,51 \times 10^7$
21.03.11	$2,26 \times 10^6$	$2,26 \times 10^7$
23.03.11	$2,23 \times 10^6$	$2,23 \times 10^7$
25.03.11	$2,24 \times 10^6$	$2,24 \times 10^7$
28.03.11	$1,16 \times 10^6$	$1,16 \times 10^7$
30.03.11	$2,04 \times 10^6$	$2,04 \times 10^7$
01.04.11	$1,66 \times 10^6$	$1,66 \times 10^7$
04.04.11	$1,63 \times 10^6$	$1,63 \times 10^7$

4.3.2 Prüfung des Inokulums

Sowohl vor der Herstellung der ersten Aliquots als auch nach der Resuspension im Vorfeld der einzelnen Inokulationen wurden Proben entnommen. Via Ziehl-Neelsen-Färbung und PCR wurde das Kulturmateriel der Amtlichen Methodensammlung folgend als MAP bestätigt. Für die PCR wurden dabei Zielsequenzen aus dem Genom von MAP (IS 900) wie auch aus dem Genom von IS 900-negativen Sub-

spezies von *Mycobacterium avium* (*avium*, *hominissuis*, *silvaticum*) bzw. *Mycobacterium intracellulare* (IS 1245) verwendet.

Nach Ausstreichen und kultureller Anzucht von Proben auf Blutagarplatten konnten Kontaminationen ausgeschlossen werden.

4.3.3 Inokulation der Versuchstiere

Einzeldosen von je 10 ml (entspricht 10 mg BFM) wurden pro Versuchstier und Inokulationstag mit 40 ml MAT vermischt. Diese Keimsuspension wurde jedem Versuchstier mittels Saugflasche kontrolliert zu Beginn der Morgenfütterung verabreicht. Mit dieser Art der Inokulation wurde vier Tage nach der Einstellung der Versuchstiere im FLI Jena begonnen. Sie wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen insgesamt zehnmal durchgeführt. Den Kontrolltieren wurde reiner MAT gefüttert.

4.4 Weitere während des Tierversuchs erhobene Daten, deren Ergebnisse in diese Studie einfließen

Durch technische Mitarbeiter des Friedrich-Loeffler-Instituts wurden zur Prüfung des Infektionserfolgs und zur weiteren Beschreibung der Pathogenese mikrobiologische und serologische Untersuchungen durchgeführt. Die so gewonnenen Befunde wurden außerdem herangezogen, um diese mit den in dieser Studie erzielten Ergebnissen in einen pathogenetischen Zusammenhang zu setzen.

4.4.1 Mikrobiologische Untersuchung zum Nachweis von Mykobakterien in Kot- und Organproben

Es wurde das Vorkommen von vermehrungsfähigen MAP im Kot und in Organproben untersucht. Von Kontroll- und Versuchstieren wurden Kotproben (mind. 3 g, aus dem Rektum) vor Beginn der Inokulation (nur Versuchstiere), einen Tag nach Abschluss der Inokulation und parallel zu den Blutentnahmen (siehe Beprobungsplan in 4.5.1 und Tab. 61 im Anhang) genommen.

Die Organproben wurden zu Beginn der jeweiligen Sektion von verschiedenen, definierten Organlokalisationen gewonnen. Diese umfassten u.a. vier Proben von der Darmschleimhaut: Vom Duodenum und je eine Probe vom proximalen, mittleren und distalen Jejunum. Des Weiteren wurden fünf Proben vom darm-assoziierten lymphatischen Gewebe genommen: Je eine Probe von den Peyer'schen Platten im

vorderen Drittel des Jejunums, im proximalen und im distalen Ileum sowie von dem lymphatischen Gewebe an der Ileozäkalklappe und im proximalen Kolon. Acht Proben von Lymphknoten wurden bei der Sektion gewonnen. Darunter waren drei mit dem Mesenterium assoziierte Lymphknoten (je einer aus dem proximalen bzw. dem mittleren Abschnitt sowie der letzte große Mesenterial-Lymphknoten), der Ileozäkalk-Lymphknoten, ein Bug-, ein Retropharyngeal- und der Leber-Lymphknoten. Zusätzlich wurden je eine Probe aus der Tonsille, der Leber, der Milz und der Niere, aus dem Zwerchfell und der Oberschenkelmuskulatur genommen. Die Proben umfassten jeweils alle Schichten bzw. Kompartimente des Organs.

Die Kot- wie auch die Organproben wurden nach dem Protokoll der Amtlichen Methodensammlung dekontaminiert und bebrütet. Gewachsene Kolonien wurden mittels PCR (wie in 4.3.2 zur Prüfung des Inokulums beschrieben) als IS 900-positive MAP bzw. als IS 900-negative/IS 1245-positive Mykobakterien (bei den Kontrolltieren nachgewiesen) identifiziert. Insgesamt wurden pro Kot- bzw. Organprobe vier Festmedium-Röhrchen (HEYM⁺) beimpft und alle 14 Tage auf sichtbare Kolonien untersucht. Sichtbare Kolonien wurden in ihrer Anzahl gezählt bzw. ab 50 Kolonien geschätzt. Den Röhrchen wurde ein Wachstums-Score von 1 bis 5 zugeordnet, der für folgende Abstufungen stand: „1-10 Kolonien“, „11-20 Kolonien“, „21-50 Kolonien“, „50-100 Kolonien“ und „konfluierender Kolonierasen“. Aus dem Wachstums-Score und der Woche der Ablesung (nach Beimpfung der Röhrchen) berechnete sich ein Wachstumsindex (WI) nach folgender Formel:

$$WI = \frac{\text{Wachstums-Score} \times 100}{\text{Woche der Ablesung}}$$

Der WI wurde über alle Röhrchen, die innerhalb von 25 Wochen Wachstum zeigten und deren Kolonien sich in der PCR als MAP bestätigten, gemittelt, gerundet und als Maß für die Belastung eines Organs mit vermehrungsfähigen MAP behandelt.

4.4.2 Serologische Untersuchung zum Nachweis von Antikörpern gegen MAP

Es wurde von jedem Tier direkt nach dem Ende der Inokulation und dann parallel zu dem Beprobungsplan (vgl. 4.5.1 und Tab. 61 im Anhang) alle vier Wochen Serum gewonnen. Durch Zentrifugation von jeweils 10 ml Vollblut (30 min bei 2000 x g) wurde das Serum von den restlichen Blutbestandteilen getrennt.

Zur Bestimmung des Gehalts an MAP-bindenden Antikörpern wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Testsystem verwendet: *ID Screen® Paratuberculosis Indirect*. Dies ist für diesen Zweck seit 2007 in Deutschland sowohl für Rinder- als auch für Schaf- und Ziegenserren zugelassen. Der Test wurde nach Gebrauchsinformation des Herstellers durchgeführt. Die Vorinkubation der Proben wurde für 15 min, die Inkubation der Proben in der beschichteten Platte für 45 min (Kurzinkubation) vorgenommen. Nach Zugabe der Substratlösung wurde für 5 min inkubiert.

Die bei der Durchführung des ELISA entstandene Färbung der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450nm mittels Mikroplattenphotometer *Spectra Fluor* quantifiziert. Von den jeweils als Doppelbestimmungen angelegten Proben wurde ein Mittelwert für die OD ermittelt. Wie in der Gebrauchsinformation des *ID Screen® Paratuberculosis Indirect* beschrieben, wurde nach folgender Formel eine sample/positive-ratio (S/P-Ratio) aus den gemittelten Werten für die OD der Probe, der mitgelieferten Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) berechnet:

$$\text{S/P-Ratio} = \frac{\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{NK}}}{\text{OD}_{\text{PK}} - \text{OD}_{\text{NK}}} \times 100$$

Die S/P-Ratio wurde gerundet und den Angaben in der Gebrauchsinformation folgend bewertet: War die ermittelte S/P-Ratio ≤ 60 , wurde die Probe als negativ angesehen. War der Wert > 60 und < 70 , wurde das Ergebnis als fraglich gewertet. Bei einem Wert ≥ 70 galt die Probe als positiv.

4.5 Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Stimulation

4.5.1 Beprobungsplan

Die Beprobung folgte einem Plan, nach dem jedes Tier einmal in einem vier Wochen dauernden Beprobungsturnus (BT) beprobt wurde (Tab. 61 im Anhang). Jede Woche wurden jeweils definierte Teilgruppen aus vier der acht Versuchsgruppen herangezogen. So ergab sich für jeden Blutentnahmeterrmin ein Datensatz mit Tieren, die zwei der Versuchstiergruppen und zwei der Kontrolltiergruppen entstammten. Durch Sektionen verringerte sich die Tierzahl im Laufe des Versuchs, sodass Blutentnahmeterrmine innerhalb des vierwöchigen Turnus wegfielen. Den

Beprobungsrhythmus für die verbliebenen Tiere beeinflusste dies aber nicht nachhaltig.

4.5.2 Blutentnahme

Alle unter 4.5 und 4.6 beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen.

Es wurde heparinisiertes Vollblut aus der *Vena jugularis externa* gewonnen. Die verwendeten 20 G *Butterfly*-Kanülen waren über Membranadapter mit 24 ml Spritzen verbunden, sodass die Blutentnahme aseptisch erfolgte. Das Endvolumen des heparinisierten Vollbluts betrug ca. 20 ml (Endkonzentration Heparin: 75 U/ml).

4.5.3 Isolation von PBMC

Das heparinisierte Vollblut wurde unverzüglich im Labor in 50 ml Röhrchen auf 20 ml des Lymphozytenseparationsmediums (LSM) *LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium* aufgeschichtet. Dabei wurde durch langsame Zugabe des Blutes eine Vermischung mit der untenliegenden LSM-Phase vermieden. Die Röhrchen wurden in einer *Heraeus® Multifuge 3 S-R* bei $1500 \times g$ für 30 min mit ungebremstem Auslauf zentrifugiert. Danach wurden 3-5 ml der direkt auf der LSM-Phase liegenden Interphase per 1 ml-Pipette abgenommen und in ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es schlossen sich drei Waschschrte an, in denen die PBMC in jeweils 10 ml Hanks` Puffer (ohne Phenolrot, frei von Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert wurden. Nach jeder Zentrifugation (im ersten Schritt für 10 min bei $350 \times g$, bei den folgenden Schritten für 5 min bei $350 \times g$) wurde jeweils der Überstand über dem Zellpellet dekantiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 μl abgenommen und 1:100 verdünnt mittels des automatischen Zellzählers *Beckman Coulter Z2 Cell and Particle Counter* nach Geräteanweisung des Herstellers untersucht. Der Messbereich wurde von 5 μm bis 10 μm eingestellt. Danach wurde eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium eingestellt. Diese Zellsuspension wurde zur Stimulation für alle folgenden Untersuchungen eingesetzt.

4.5.4 Ex vivo Restimulation der PBMC

Von den gewonnenen PBMC wurden für die verschiedenen Untersuchungsgänge jeweils separate Stimulationsansätze angelegt. Unabhängig von der angestrebten

Untersuchungsebene wurden dabei eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle und zur Darstellung der nicht antigeninduzierten Verhältnisse wurden PBMC in reinem Zellkulturmedium inkubiert. Um die allgemeine Stimulierbarkeit der PBMC zu prüfen, wurden zwei Positivkontrollen mitgeführt. Im IFN- γ -Test war dies das Mitogen Concanavalin A (ConA), welches T-Zellen unspezifisch stimuliert. Für den IL-10-Test und bei der Durchflusszytometrie boten sich wegen längerer Inkubationszeiten Lipopolysaccharide (LPS) vom *Escherichia coli* (E. coli) Serotyp 026:B6 aufgrund ihrer geringeren Zytotoxizität an. Für die Genexpressionsanalysen, die auf unterschiedliche Zytokine abzielten, wurden sowohl ConA als auch LPS verwendet.

Für die MAP-spezifische Stimulation wurden *Johnin Purified Protein Derivative* (JPPD) und die rekombinanten MAP-Proteine MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c und BLAg eingesetzt (die rekombinanten Proteine nur im IFN- γ -Test).

Zur Kontrolle, ob die durch JPPD erreichte Stimulation MAP-spezifischen Bestandteilen zuzuordnen ist, wurde APPD als Kontrollstimulans mitgeführt (Durchflusszytometrie ausgenommen).

Um im Rahmen des IFN- γ -Tests zu prüfen, ob sich die antigeninduzierte IFN- γ -Freisetzung durch Unterbindung des inhibierenden Einflusses von IL-10 steigern lässt, wurden bis zur 24. Woche *p.i.* zwei zusätzliche Stimulationsansätze mit JPPD angelegt. Diesen wurden Antikörper zugesetzt: Maus- α -IL-10-Antikörper (IL-10-Block), um IL-10 zu binden, und Maus-IgG1-negativ-Kontroll-Antikörper (Kontrollantikörper) als Isotyp-Kontrolle, um den Effekt des IL-10-Block der IL-10-bindenden Wirkung zuordnen zu können.

Bereits vor Beginn der jeweiligen PBMC-Isolation wurden dem Stimulationsschema folgend mit Zellkulturmedium Lösungen der jeweiligen Stimulantien und Antikörper hergestellt (Tab. 3). Diese wurden in Zellkulturplatten ausgebracht. Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände (ZKÜ) zur Zytokinbestimmung mittels ELISA wurden Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen (Rundboden) genutzt, für die Genexpressionsanalysen und die Durchflusszytometrie solche mit 24 Vertiefungen (Flachboden). Für erstere Anwendung wurden 2×10^5 PBMC in 200 μ l Endvolumen pro Vertiefung eingesetzt, jeweils in drei biologischen Replikaten. Für die Genexpressionsanalysen und die Durchflusszytometrie wurden 2×10^6 PBMC in 1,1 ml Endvolumen pro Vertiefung ausgebracht. Hier wurden keine biologischen

Replikate angefertigt. Die PBMC wurden jeweils unverzüglich nach dem Einstellen der Zellsuspensionen auf 2×10^6 Zellen/ml zu den Stimulantien gegeben. Die Zellkulturplatten wurden für die jeweils festgelegte Stimulationszeit im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Sättigung, befeuchtete Luft) inkubiert (Tab. 3).

Tab. 3: Stimulationsansätze, Inkubationszeiten und verwendete Konzentrationen. Dargestellt sind die für die verschiedenen Versuche eingesetzten Stimulantien mit ihren Konzentrationen. Alle Stimulantien wurden in Zellkulturmedium verdünnt.

	IFN- γ -Test		IL-10-Test	real time-PCR	Durchfluss- zytometrie
	(24 h Inkubation)		(64 h Inkubation)	(1 h und 24 h Inkubation)	(6 d Inkubation)
Stimulans	Stimulans	Antikörper	Stimulans	Stimulans	Stimulans
unstimulierte Mediumkontrolle	-	-	-	-	-
JPPD	4 μ g/ml		4 μ g/ml	4 μ g/ml	4 μ g/ml
JPPD + IL-10-Block ¹	4 μ g/ml	2,5 μ g/ml			
JPPD + Kontrollantikörper ¹	4 μ g/ml	2,5 μ g/ml			
APPD	125 I.E.		125 I.E./ml	125 I.E./ml	
MAP 1365 ²	5 μ g/ml		5 μ g/ml		
MAP 0268c ²	5 μ g/ml		5 μ g/ml		
MAP 3651c ²	5 μ g/ml		5 μ g/ml		
BLAg ³	5 μ g/ml		5 μ g/ml		
ConA ⁴	20 μ g/ml			10 μ g/ml	1,5 μ g/ml
LPS ⁴			5 μ g/ml	1 μ g/ml	

(¹) „IL-10-Block“ steht für Maus- α -bovin-IL-10-Antikörper, „Kontrollantikörper“ für Maus-IgG1-negativ-Kontroll-Antikörper. Eingesetzt von 3. bis 24. Woche *p.i.*

(²) Für die Verwendung dieser rekombinanten MAP-Proteine zur Restimulation von Zellen des peripheren Blutes oder der Haut mit dem Zweck der Entwicklung einer zellvermittelten Immunantwort ist ein Patent angemeldet (WO 2009/144478 A9).

(³) BLAg stand erst ab der 33. Woche *p.i.* zur Verfügung.

(⁴) Positivkontrolle

4.6 Gewinnung der Proben nach der Stimulation

4.6.1 Zellkulturüberstände für die ELISA

Stimulationsansätze für den IFN- γ -Test wurden für jedes Tier zu jedem Blutentnahmeterrin angelegt. Die Stimulationen für den IL-10-Test erfolgten ab der neunten Woche *p.i.* für die insgesamt 14 Tiere der Gruppen K4 und V4 alle acht Wochen und je BT abwechselnd mit der Genexpressionsanalyse.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellkulturplatten für 5 min bei 350 x *g* zentrifugiert. Unter Vermeidung der Aufwirbelung von Zellen wurden pro Vertiefung 150 µl ZKÜ entnommen. Die ZKÜ wurden in zwei Zellkulturplatten (96 Vertiefungen, Flachboden) zu je 75 µl pro Vertiefung abgegeben. So entstanden zwei identische Probenpaneele, die bis zur Verwendung im ELISA bei -20 °C gelagert wurden.

4.6.2 Zelllysate für die Genexpressionsanalyse

Die Stimulation für die Genexpressionsanalyse wurde bei den Tieren der Gruppen K4 und V4 durchgeführt. Die Beprobung erfolgte ab der 13. Woche *p.i.* alle acht Wochen.

Die Zellen wurden nach abgeschlossener Stimulation möglichst frei von ZKÜ und in Lysepuffer (*RLT-Puffer* supplementiert mit 1 % β-Mercaptoethanol) gelöst gewonnen. Zu diesem Zweck wurde der ZKÜ mit den in Suspension befindlichen PBMC mittels 1 ml-Pipette aus den Zellkulturplatten entnommen und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße (MRG) überführt. Die MRG wurden bei 300 x *g* 5 min zentrifugiert und die Überstände wurden mittels einer Vakuumsaugvorrichtung vorsichtig abgesaugt. Die in den Vertiefungen der Zellkulturplatte zurückgebliebenen Zellen wurden mit je 350 µl Lysepuffer versetzt und durch Schaben mit der Pipettenspitze gelöst. Die lysierten Zellen wurden samt Lysepuffer in die MRG mit den vom Überstand befreiten Zellpellets überführt und mit diesen vermischt. Die MRG wurden zwischen diesen Arbeitsschritten in einen gekühlten Ständer gestellt, der während der Dauer der Probenahme eine Temperatur von unter 0° C aufwies. Die vollständig lysierten Proben wurden bei -80 °C bis zu ihrer weiteren Bearbeitung gelagert.

4.6.3 Gewinnung und Immundekoration der PBMC zur Analyse im Durchflusszytometer

Die Stimulation für die Analysen im Durchflusszytometer wurde im Laufe des Infektionsversuches bei unterschiedlichen Anzahlen von Tieren aus verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt (Tab. 4). Die Beprobung erfolgte ab der 11. Woche *p.i.* bei jeder regulären Blutentnahme.

Tab. 4: Anzahl und Versuchsgruppen-Zugehörigkeit der mittels Durchflusszytometrie untersuchten Tiere.

BT	Anzahl untersuchter Tiere (n)		Untersuchte Versuchsgruppen
	Kontrolltiere	Versuchstiere	
3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3
4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3
5	6	12	K2, K3, V2, V3
6	6	12	K2, K3, V2, V3
7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4
8	10	10	K3, K4, V3, V4
10	7	6	K4, V4
11	3	3	K4, V4
12	3	3	K4, V4
13	4	4	K4, V4

Für die Dreifarbenfluoreszenz wurden Gebrauchslösungen verschiedener Kombinationen von Primär- bzw. Sekundärantikörpern in Färbe-Waschpuffer (PBS mit 0,5 % Fötalem Kälberserum) vorbereitet. Es wurden vier Kombinationen aus Primär- und Sekundärantikörpern, eine Zellkontrolle ohne Antikörper und zwei Sekundärantikörperkontrollen (ohne Primärantikörper) eingesetzt (Tab. 5).

PBMC wurden nach der Stimulation resuspendiert und zu je 100 µl pro Vertiefung in eine Zellkulturplatte (V-Form) überführt. Für jeden Stimulationsansatz wurden dabei zwei technische Replikate angelegt. Es erfolgte eine Zentrifugation (400 x *g*, 3 min, 4 °C; ebenso die folgenden Zentrifugationen) und das Ausschlagen des Überstands. Das Zellpellet wurde mit 50 µl einer Gebrauchslösung der in Färbe-Waschpuffer verdünnten Primärantikörper resuspendiert und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift (Zentrifugation, Ausschlagen des Überstands, Resuspension mit 100 µl Färbe-Waschpuffer pro Vertiefung, erneute Zentrifugation und Ausschlagen des Überstands) wurden die Zellen mit 50 µl der Gebrauchslösung mit Sekundärantikörpern resuspendiert. Es schlossen sich eine 20-minütige Inkubation im Dunkeln und ein erneuter Waschschrift an. Im Anschluss wurden die Zellen in 150 µl PBS je Probe resuspendiert und am *BD FACSCanto™ II* Durchflusszytometer analysiert.

Tab. 5: Antikörper für die Immundekoration.

Antigen-spezifität	Zelllinie / Fluorochrom	Isotyp	Verteilung auf Zellen	Bezugsquelle	Einsatz	Kombination ¹
Primärantikörper						
α -Ziege-CD4	GC1A	Maus IgG2a	T-Helfer-Zellen	VMRD, Inc.; Pullman, USA	50 μ l, 1:500	A, B
α -Rind-CD8	CC63	Maus IgG2a	zytotoxische T-Zellen	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	50 μ l, 1:500	C, D
α -Rind-CD25	CACT116A	Maus IgG1	Aktivierungsmarker	VMRD, Inc.; Pullman, USA	50 μ l, 1:500	A, C
α -Rind-CD26	CACT114A	Maus IgG2b	Aktivierungsmarker	VMRD, Inc.; Pullman, USA	50 μ l, 1:500	B, D
α -Rind-CD45RO	IL-A116	Maus IgG3	Gedächtniszellen	VMRD, Inc.; Pullman, USA	50 μ l, 1:500	A, B, C, D
Sekundärantikörper						
α -Maus-IgG1	R-Phycoerythrin (PE)			SouthernBiotech, Birmingham, USA	50 μ l, 1:1000	A, B, SK1
α -Maus-IgG2a	Allophycocyanin (APC)			SouthernBiotech, Birmingham, USA	50 μ l, 1:1000	A, B, C, D, SK1
α -Maus-IgG2b	R-Phycoerythrin (PE)			SouthernBiotech, Birmingham, USA	50 μ l, 1:1000	C, D, SK2
α -Maus-IgG3	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)			SouthernBiotech, Birmingham, USA	50 μ l, 1:1000	A, B, C, D, SK2

(¹) Es wurden vier Kombinationen von Antikörpern für die Immundekoration verwendet: A, B, C und D. Zusätzlich gab es drei Negativkontrollen: Zellkontrolle, Sekundärantikörperkontrolle 1 (SK1) und Sekundärantikörperkontrolle 2 (SK2), welche ohne Antikörper bzw. nur mit Sekundärantikörpern inkubiert wurden.

4.7 Bearbeitung der Proben

4.7.1 IFN- γ -Test und IL-10-Test

4.7.1.1 Vorbereitung und Durchführung der Tests

Vorbereitung der ELISA-Platten für den IFN- γ -Test

Der ELISA für den IFN- γ -Test wurde mit einem hauseigenen System durchgeführt. Als Grundlage dienten *MaxiSorp*TM-Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen und flachen Böden. Für alle Waschschrte wurde das Plattenwaschgerät *Skan Washer 300 Version B* verwendet. Es wurde jeweils die vorhandene Flüssigkeit abgesaugt und sechsmal 300 μ l ELISA-Waschpuffer pro Vertiefung eingefüllt und wieder entfernt.

Die Zellkulturplatten wurden zunächst mit dem Beschichtungsantikörper Maus- α -bovin-IFN- γ beschichtet. Jede Vertiefung wurde mit 100 μ l Beschichtungspuffer mit darin gelöstem Beschichtungsantikörper (1 μ g/ml) befüllt. Abgedeckt wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platten am nächsten Tag wurde je Vertiefung 300 μ l Blockungspuffer eingefüllt. Abgedeckt wurden die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen am nächsten Tag wurden die nun beschichteten Platten mit Klebefolien für Microwell™ Platten verschlossen und bei -20°C bis zur Durchführung des ELISAs gelagert.

Auftrag der Proben und Durchführung des IFN- γ -ELISA

Der ELISA bestand aus vier einstündigen Inkubationsschritten, während derer die Platten mit Folien abgedeckt waren. Abgesehen von Schritt 1 wurden die Platten vor jedem Schritt wie im letzten Abschnitt beschrieben gewaschen und die Lösungen mit jeweils 100 μ l pro Vertiefung ausgebracht.

- 1.) Jede Platte wurde mit drei Kontrollen versehen. Zellkulturmedium diente als Negativkontrolle, rekombinantes bovines IFN- γ als Positivkontrolle (3 ng/ml). Eine interne Kontrolle für die Varianzanalyse bestand aus in großer Menge hergestelltem und bei -80 °C aliquotiert gelagerten ZKÜ von für 24 h mit ConA stimulierten, caprinen PBMC. Alle Kontrollen wurden in Doppelansätzen aufgetragen. Von den aufgetauten Proben wurden jeweils die drei biologischen Replikate aufgetragen. Proben wie Kontrollen wurden zu jeweils 50 μ l eingesetzt.
- 2.) Der Detektionsantikörper Maus- α -bovin-IFN- γ -Biotin wurde in Blockungspuffer verdünnt mit einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt.
- 3.) Das an Meerrettichperoxidase gekoppelte, kommerziell erhältliche Streptavidin-Konjugat wurde 1:10000 in Reagenzienverdünnungspuffer verdünnt ausgebracht.
- 4.) Die fertige Gebrauchslösung des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrates (*TMB Chromogen Solution for ELISA*) wurde unverdünnt in die Vertiefungen gegeben und die Platte abgedunkelt inkubiert, bis die Reaktion nach zehn Minuten durch Zugabe von 100 μ l 1 N H₂SO₄ pro Vertiefung gestoppt wurde.

Die Platten wurden unverzüglich der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450nm mittels Mikroplattenphotometer *Spectra Fluor* zugeführt.

Vorbereitung der Platten und Durchführung des IL-10-ELISA

Der IL-10-ELISA wurde analog zu dem IFN- γ -ELISA durchgeführt. Einzig der Beschichtungsantikörper, der Detektionsantikörper, die Positivkontrolle und die interne Kontrolle für die Varianzanalyse unterschieden sich von denen im Protokoll für den IFN- γ -ELISA. Beim IL-10-ELISA wurde der Beschichtungsantikörper Maus- α -bovin-IL-10 in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Als Detektionsantikörper diente Maus- α -bovin-IL-10-Biotin (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$). Die Positivkontrolle bestand aus rekombinantem, bovinen IL-10, welches in einer Konzentration von 1,11 I.E./ml eingesetzt wurde. Die interne Kontrolle wurde ebenfalls analog zu der für den IFN- γ -ELISA hergestellt. Hier wurden die ZKÜ allerdings nach 64 h entnommen.

4.7.1.2 Auswertung der Daten

Für die Auswertung wurde jeweils aus den Einzelmesswerten der drei biologischen Replikate ein Mittelwert der OD berechnet. Dieser Mittelwert ging in die weiteren Berechnungen als OD der jeweiligen Probe ein. Es wurde für alle Stimulationsansätze einschließlich der Mediumkontrolle die absolute Freisetzung von IFN- γ bzw. IL-10 unter Verwendung eines S/P-Ratios ermittelt. Die S/P-Ratio ist in diesem Falle der Quotient aus der OD einer Probe und der OD der auf derselben Platte liegenden Positivkontrolle:

$$\text{S/P-Ratio} = \frac{\text{OD Probe}_{\text{gemittelt}}}{\text{OD Positivkontrolle}_{\text{gemittelt}}}$$

Die durch die Stimulation bedingte Änderung der Zytokin-Freisetzung gegenüber der Mediumkontrolle wird abgrenzend zur absoluten als relative IFN- γ /IL-10-Freisetzung bezeichnet. Zur Darstellung dieser Veränderung in Relation zur Mediumkontrolle wurde aus der S/P-Ratio der stimulierten Probe und der der zugehörigen Mediumkontrolle ein Stimulations-Index (SI) gebildet:

$$\text{SI} = \frac{\text{S/P-Ratio}_{\text{stimuliert}}}{\text{S/P-Ratio}_{\text{MK}}}$$

4.7.2 Real-time PCR

4.7.2.1 Vorbereitung der Proben und Durchführung der PCR

Um Kontaminationen mit RNasen oder Nukleinsäuren aus der Umgebung zu minimieren, wurde soweit möglich unter eigens für den jeweiligen Reaktionsschritt vorgesehenen und räumlich voneinander getrennten Arbeitshauben gearbeitet.

Ribonukleinsäure-Extraktion

Die gelagerten Zelllysate wurden aufgetaut und die Extraktion der Ribonukleinsäure, engl. *ribonucleic acid* (RNA), mittels *RNeasy® Mini Kit* durchgeführt. Es wurde das darin enthaltene Protokoll zur Aufreinigung der Gesamt-RNA aus tierischen Zellen unter Verwendung der „*Spin Technology*“ verwendet. Folgende im Protokoll empfohlene Varianten wurden umgesetzt:

- 1) Dem *RLT-Puffer* wurde vor der Verwendung als Lysepuffer 1% β -Mercaptoethanol zugesetzt.
- 2) Zur Homogenisation der Lysate wurden diese fünfmal durch eine Kanüle mit 0,9 mm Durchmesser aufgezogen und wieder abgegeben.
- 3) Es wurde mit Hilfe des *RNase-freien DNase Sets* ein DNA-Verdau auf den Säulen durchgeführt. Dabei wurden wiederum die Herstellerangaben befolgt. Die Inkubationszeit wurde auf 30 min festgelegt.

Bei dem letzten Schritt des Aufreinigungsprotokolls wurde die aufgereinigte RNA von den Säulen eluiert und befand sich in 1,5 ml MRG. Für die RNA-Konzentrationsmessung wurden zunächst jeweils 6 μ l in 200 μ l-MRG abgefüllt und die MRG in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die Eluate bei -80 °C gelagert.

RNA-Konzentrationsmessung

Die Aliquots für die RNA-Konzentrationsmessung wurden nach der Behandlung mit flüssigem Stickstoff gekühlt gehalten und direkt am *Nanodrop® ND-1000* Spektrophotometer nach Anleitung des Herstellers untersucht. Es wurde das Analysenprotokoll ‚RNA-40‘ zum Messen von RNA eingestellt. Aus der Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet die Software des Geräts mittels Lambert-Beer'schem Gesetz die RNA-Konzentration der Probe in ng/ μ l.

Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben der gewonnenen RNA in komplementäre DNA, engl. *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA), wurde mit Hilfe des *Omniscript® Reverse Transcriptase Kits* durchgeführt. Das Protokoll wurde dem dazugehörigen Handbuch entnommen.

Es wurden Reaktionsansätze mit 20 µl Gesamtvolumen gewählt. Als Primer wurden *random*-Hexamere verwendet. Dem Mastermix wurde der RNase-Inhibitor *RNasin® Plus* zugesetzt. Als Kontrollen wurden pro RT-Lauf eine Wasserkontrolle ohne Probe (engl. *no template control* [NTC]) und für jede Probe eine RT-Kontrolle ohne Enzym (RTK) mitgeführt. Die Zusammensetzungen der Mastermixe für die Umschreibung der RNA in cDNA (MM) und für die Kontrollen ohne Enzym (MM RTK) finden sich in Tab. 6. Der NTC wurde statt Probenverdünnung 12,75 µl RNase-freies Wasser zugegeben.

Tab. 6: Zusammensetzung der Mastermixe für die reverse Transkription. Aufgeführt sind alle Komponenten der Mastermixe für die reverse Transkription mit Endkonzentration und Volumen pro Einzelansatz von 20 µl.

Komponente	Volumen pro Einzelansatz im MM (µl)	Volumen pro Einzelansatz im MM RTK (µl)	Endkonzentration im MM bzw. im MM RTK
10 x <i>RT-Puffer</i>	2	2	1-fach
<i>dNTPs</i>	2	2	0,5 mM je dNTP
<i>random</i> Hexamere	2	2	10 µM
RNase-Inhibitor	0,25	0,25	0,5 U/µl
Reverse Transkriptase	1	-	MM: 0,2 U/µl MM RTK: -
RNase-freies Wasser	-	1	
Probenverdünnung	12,75	12,75	5 ng RNA/µl

Die Komponenten stammten mit Ausnahme der *random* Hexamere, des RNase-Inhibitors und der Probenverdünnung aus dem *Omniscript® Reverse Transcriptase Kit*. dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate

Die Probenverdünnungen und die NTC wurden vor der Zugabe des Mastermix zur Denaturierung der RNA im Thermocycler für 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden die Proben unverzüglich in einen bei -20 °C vorgekühlten Kühlständer gestellt. Den Probenverdünnungen wurden jeweils 7,25 µl des jeweiligen Mastermix zugegeben. Die NTC wurde wie die umzuschreibenden Proben mit enzymhaltigem Mastermix versetzt, die RTK mit dem Mastermix ohne Reverse Transkriptase. Gut gemischt wurden diese Ansätze für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde schließlich durch eine fünfminütige Inkubation bei 97 °C inaktiviert. Die cDNA wurde bis zum Einsatz in der real-time PCR bei -20 °C gelagert.

Durchführung der PCR

Die real-time PCR wurde mit SYBR® Green PCR Master Mix durchgeführt. Der zweifach konzentrierte Master Mix wurde 1:1 verdünnt mit DEPC-behandeltem Wasser, den jeweiligen Primerlösungen und der Probe eingesetzt. Es wurden Primer eingesetzt, die auf Sequenzen innerhalb der Gene von Interleukin (IL-) 10, IL-12p40, IL-18, Tumornekrosefaktor α (TNF- α), *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) abzielen. Das konstitutiv exprimierte Gen für GAPDH diente als Referenzgen zur relativen Quantifizierung der anderen Gensequenzen. Die optimalen Konzentrationen der verwendeten Primer für IL-12p40, TNF- α und TGF- β wurden institutsintern ermittelt (Beate Appelt, unveröffentlicht). Die übrigen Primer-Konzentrationen folgten institutsinternen Erfahrungswerten (Tab. 7).

Tab. 7: Verwendete Primer mit Zielgen, Accessionnumbers, Sequenzen, Endkonzentrationen der Primer im PCR-Ansatz und Referenzen.

Zielgen	Accession-number	Sequenz von 5'-Ende zu 3'-Ende	Endkonzentration (nM)	Referenz
IL-10	U00799	GTGATGCCACAGGCTGAGAA	900	1
		TGCTCTTGTTTTTCGACGGCA	300	1
IL-12p40	AY603406	AACCTGCAACTGAGACCACT	300	2
		ATCCTTGTGGCATGTGACTT	300	2
IL-18		AGACCTGGAATCAGATCACTTTGG	300	3
		TTGTTCTCACAGGAGAGAGTAGAC	300	3
TNF- α	D86587	GGCTCTCCTGTCTCCCGT	900	4
		GTTGGCTACAACGTGGGC	50	4
TGF- β	X76916	GAACCTGCTGTGTTTCGTCAGC	50	5
		GGTTGTGCTGGTTGTACAGG	50	5
GAPDH		GCGATACTCACTCTTCTACCTTCGA	300	6
		TCGTACCAGGAAATGAGCTTGAC	300	6

(¹) Lahouassa *et al.*, 2007 (²) Tourais-Esteves *et al.*, 2008 (³) Nagai *et al.*, 2008

(⁴) Egan *et al.*, 1996 / Schnittger *et al.*, 2000 (⁵) Smeed *et al.*, 2007 (⁶) Taubert *et al.*, 2006

Je Ansatz wurden 18,5 μ l des mit Wasser und Primern vermischten SYBR® Green PCR Master Mix in eine Vertiefung einer *MicroAmp® Optical 96- Well Reaction Plate* (Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen für real-time PCR-Reaktionen) gegeben. Um die Pipettiergenauigkeit bei der Zugabe des RT-Produkts gering zu halten, wurden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:12 mit Wasser (mit DEPC behandelt) vermischt. Nachfolgend wurden jeweils 6,5 μ l dieser Verdünnung in die Reaktionsansätze gegeben. Das so pro Reaktionsansatz (Endvolumen 25 μ l) eingesetzte Volumen

entsprach 0,5 µl des unverdünnten RT-Produkts. Die Proben wurden für jedes Zielgen im Doppelansatz angelegt. Die Reaktionsplatten wurden mit *MicroAmp® Optical Adhesive Film*-Folien abgedeckt und nach kurzer Zentrifugation (bei Erreichen von 1000 x *g* gestoppt) in das *7500 Real-Time PCR-System* eingelegt. In dem zugehörigen Programm, *7500 Software v2.0.4*, wurde ein Standardlauf mit angeschlossener Schmelzkurven-Analyse eingestellt. Für die Temperaturen während des Laufs und die Anzahl der Zyklen siehe Tab. 8.

Tab. 8: Temperaturstadien während der real-time PCR und Schmelzkurven-Analyse.

Reaktionsphase	Temperatur	Erhaltung der Temperatur
Vorwärmphase	50 °C	2 min
	95 °C	10 min
Amplifikationsphase (40 Zyklen)	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
Schmelzkurven-Analyse	95 °C	15 s
	60 °C	1 min
	95 °C ¹	30 s
	60 °C	15 s

(¹) Hier: Heizen auf 95 °C über 30 min mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung

Zur Kontrolle der Mastermixe und RT-Produkte auf Kontaminationen mit externen Nukleinsäuren bzw. unverdauter PBMC-DNA wurden Kontrollen mitgeführt. Dafür wurden die RT-Produkte der NTC und der RTK analog zu den Proben eingesetzt. Für die NTC wurden jeweils zwei Replikate pro Zielgen angelegt. Die RTK wurden im Einfachansatz nur für GAPDH angelegt. Um die Reinheit des PCR-Mastermix zu belegen, wurde eine PCR-Wasserkontrolle angelegt. Statt Probenverdünnung wurde der PCR-Wasserkontrolle DEPC-behandeltes Wasser zugesetzt. Sie wurde im Einfachansatz für alle Zielgene mitgeführt.

Als interne Kontrolle der Varianz wurde ein RT-Produkt mitgeführt, welches zuvor in großer Menge aus unstimulierten PBMC gewonnen, in cDNA umgesetzt und homogen aliquotiert wurde. Für jeden Versuchstag wurde ein frisches Aliquot aufgetaut und jeweils analog zu den übrigen Proben im Doppelansatz für GAPDH angelegt.

4.7.2.2 Auswertung der Daten

Effizienzberechnung

Die Amplifikationsdaten der real-time PCR wurden in *Microsoft Excel 2010* exportiert und mit *LinReg Version 11.1*, einem Programm zur Analyse quantitativer real-time PCR-Daten, verarbeitet. Aus den Amplifikationsdaten der einzelnen Reaktionen wurde die Effektivität der Amplifikation berechnet. Für jedes Primerpaar wurde eine mittlere Effektivität über alle Reaktionen bestimmt ($E_{\text{gemittelt}}$).

Datenprüfung und Umgang mit fehlerhaften Läufen

Um fehlerhafte Läufe zu erkennen und diese von der Auswertung auszuschließen, wurden sowohl die für die einzelnen technischen Replikate gelisteten Fehlermeldungen der *7500 Software v2.0.4* als auch die jeweiligen Schmelzkurven (erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung über die Temperatur) betrachtet. Unter den folgenden Bedingungen wurde das Ergebnis eines Replikats als nicht uneingeschränkt auswertbar angesehen:

- 1) Die *7500 Software v2.0.4* gab die Fehlermeldung „No Amplification“ aus, es war also keine Amplifikation nachweisbar.
- 2) Der Höhepunkt der Schmelzkurve wich um mehr als 1 °C vom Erwartungswert² ab.
- 3) Die Schmelzkurve wies einen zweiten, vom Erwartungswert abweichenden Höhepunkt auf, dessen Höhe auf der y-Achse
 - a) mehr als 65 % von der des Höhepunkts am Erwartungswert ausmacht.
 - b) mehr als 50 % von der des Höhepunkts am Erwartungswert ausmacht; das zweite Replikat weist diesen zusätzlichen Höhepunkt nicht auf.

Trat einer dieser Fälle ein, wurde das Replikat von der Auswertung ausgeschlossen. Wurde bei einer Probe eines von zwei Replikaten ausgeschlossen, so galt für die weitere Auswertung der CT-Wert³ des nicht ausgeschlossenen Replikats. Es wurde

² Der Erwartungswert beschreibt die Temperatur, bei der der Höhepunkt der Schmelzkurve erwartet wird. Dieser Wert ergab sich aus dem Median der Werte, die in 100 zufällig ausgewählten Experimenten für die jeweilige Zielsequenz ermittelt wurden. Siehe Tab. 9.

³ „CT“ steht für „cycle threshold“, und beschreibt eine Größe, die den Beginn der exponentiellen Amplifikation kennzeichnet. Von der *7500 Software v2.0.4* wird automatisch, an die Verläufe der Amplifikationskurven angepasst und für jedes Primerpaar gesondert, ein Schwellenwert festgelegt. Der CT-Wert beschreibt den Punkt der Amplifikationskurve, ab dem die gemessene Fluoreszenz exponentiell über den Schwellenwert, und damit über die Hintergrundfluoreszenz, ansteigt.

davon ausgegangen, dass entweder bei einem Replikat ein Fehler vorgelegen oder aber die Konzentration der Zielsequenz in der Probe nahe der Nachweisgrenze gelegen haben musste. Trat bei beiden Replikaten einer Probe einer der oben genannten Fälle ein, wurde angenommen, dass die Konzentration der Zielsequenz in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze lag. In solchen Fällen ist der von der Software ermittelte CT-Wert, so eine Amplifikation stattgefunden hat, als verfälscht anzusehen. Um diese Proben dennoch mit in die Auswertung übernehmen zu können, wurde ihnen ein CT-Wert von 40 zugewiesen, wie es von Goni, Garcia *et al.* (2009) für solche Fälle vorgeschlagen wurde.

Tab. 9: Erwartungswerte für den Höhepunkt der Schmelzkurve.

	Zielsequenzen					
	IL-10	IL-12p40	IL-18	TNF- α	TGF- β	GAPDH
Erwartungswert für den Höhepunkt der Schmelzkurve	85,2	81,9	79,1	86,6	84,6	79,6

Datenverarbeitung

Die CT-Werte der technischen Replikate wurden jeweils in einem Mittelwert zusammengefasst. Um zusätzlich mögliche Schwankungen im cDNA-Gehalt der Proben auszugleichen, wurden alle Ergebnisse für die zu analysierenden Zytokine mit denen des Referenzgens (GAPDH) derselben Probe abgeglichen. Dafür wurde die Differenz zwischen dem CT-Wert für das Referenzgen und dem CT-Wert der Zielsequenz (Δ CT) einer Probe (stimulierte Probe oder Mediumkontrolle) berechnet:

$$\Delta\text{CT}_{\text{Probe}} = (\text{CT}_{\text{Probe/Referenzgen}} - \text{CT}_{\text{Probe/Zielsequenz}})$$

Der Δ CT diente dazu, Expressionsniveaus unstimulierter oder stimulierter Zellen auszudrücken und statistische Unterschiede zwischen solchen zu erkennen. Der Δ CT einer Probe wird als Maß der absoluten Expression einer bestimmten Zielsequenz angesehen.

Um die Expressionsänderung durch Stimulation relativ, also in Relation zur Mediumkontrolle darzustellen, wurde eine *Ratio* berechnet. Sie ergibt sich aus der Differenz der CT-Werte einer unbekannten Probe und einer Kontrolle, jeweils normalisiert auf ein Referenzgen. Die Formel nach Pfaffl (2001) bezieht die Effektiv-

tät der Amplifikation für beide Zielsequenzen mit ein und wird in dieser Studie für die Berechnung der *Ratio* verwendet:

$$Ratio = \frac{(E_{\text{gemittelt/Zielsequenz}})^{(CT_{\text{MK/Zielsequenz}} - CT_{\text{Probe/Zielsequenz}})}}{(E_{\text{gemittelt/Referenzgen}})^{(CT_{\text{MK/Referenzgen}} - CT_{\text{Probe/Referenzgen}})}}$$

Die *Ratio* wurde zur Darstellung der relativen Expression der Zielsequenzen in stimulierten Proben herangezogen und ging wie der ΔCT in die statistischen Auswertungen ein.

4.7.3 Analyse der Proben im Durchflusszytometer

4.7.3.1 Vorbereitung der Proben und Durchführung der Analyse

Zur Probenanalyse wurde ein *BD FACSCanto™ II* Durchflusszytometer eingesetzt. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten, spezifischen Antikörper, die zur Detektion der Zellpopulationen dienten, wurden mit Laserlicht der Wellenlängen 488 und 635 nm angeregt. Die anhand von Vorversuchen eingestellten Geräteparameter wurden in Form von Standardprotokollen gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Unter Verwendung der gerätespezifischen Software *BD FACSDiva™ Software v6.1.3* wurden von jeder Probe zehntausend Ereignisse gemessen. Diese wurden als repräsentativ für die Gesamtzahl der Zellen einer Probe definiert. Die Aufarbeitung und Auswertung der Daten wurde ebenfalls mit Hilfe der *BD FACSDiva™ Software v6.1.3* vorgenommen.

Die Zellpopulationen wurden nach den Parametern Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften differenziert. Diese Parameter finden bei Untersuchungen am Durchflusszytometer Ausdruck im Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter* [FSC]), Seitwärtsstreulicht (engl. *sideward scatter* [SSC]) und in der Fluoreszenzintensität auf speziellen Kanälen. Zellsubpopulationen mit gleichen Eigenschaften konnten innerhalb elektronischer Auswertefenster (engl. *gate*) zusammengefasst und weiteren Untersuchungen unterzogen werden (Abb. 3, Abb. 4).

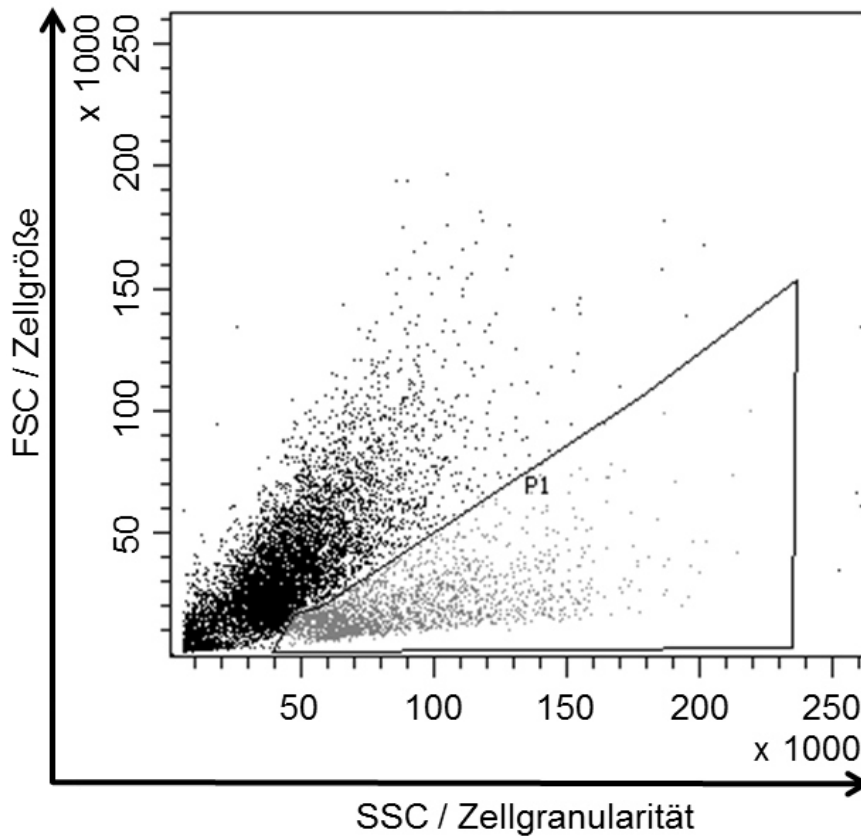


Abb. 3: Identifizierung der Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität. Dargestellt ist beispielhaft ein Dotplot, der bei der Analyse von mit ConA stimulierten PBMC eines Versuchstiers entstanden ist. Die Zellen sind hier als Punkte ihrer Größe und Granularität nach aufgetragen. Das *gate* P1 wurde so gelegt, dass es die Lymphozyten einschließt.

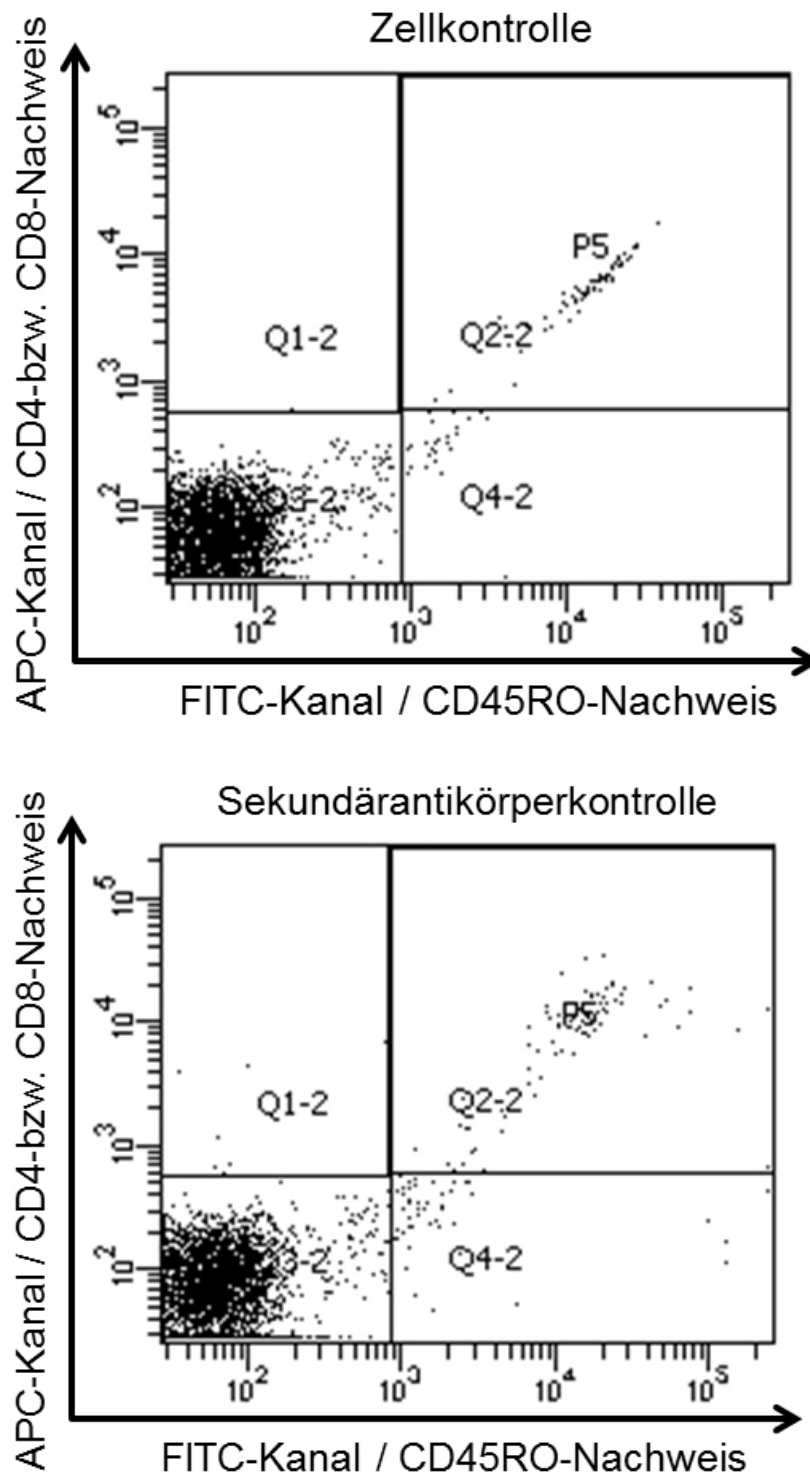


Abb. 4: Anlegen der Grenzen des *gate* P5 an die Zell- bzw. Sekundärantikörperkontrolle. Dargestellt sind beispielhaft Dotplots einer Zell- und einer Sekundärantikörperkontrolle, die bei der Analyse von PBMC eines Versuchstiers erstellt wurden. Die Lymphozyten, die innerhalb des *gate* P1 (vgl. Abb. 3) liegen, sind in Abhängigkeit von ihren Fluoreszenzeigenschaften im APC- bzw. FITC-Kanal dargestellt. Das im rechten, oberen Quadranten angelegte *gate* für die doppeltpositiven Zellen wurde so gelegt, dass es maximal 2 % der Zellen der Zell- bzw. Sekundärantikörperkontrolle einfasste.

4.7.3.2 Auswertung der Daten

Für die Auswertung wurden wie in 4.7.2.3 beschrieben die zu untersuchenden Zellpopulationen identifiziert. Mit Hilfe der Software wurde für die in *gate* P5 liegenden Lymphozyten der Median der Fluoreszenzintensität (MdFI) für den Kanal bestimmt, auf dem die Fluoreszenz von PE gemessen wird. Die Fluoreszenzintensität auf diesem Kanal korreliert je nach verwendetem Primärantikörper mit der Anzahl von CD25- bzw. CD26-Antigenen auf der Zelloberfläche. Aus den MdFI der technischen Replikate wurden vor weiteren Berechnungen oder statistischen Tests Mittelwerte berechnet, die weiterhin zur Vereinfachung als MdFI bezeichnet werden. Während die MdFI die absolute Expression von CD25 bzw. CD 26 auf der Zelloberfläche darstellt, wurde zur Veranschaulichung der Änderung gegenüber der Mediumkontrolle die relative Expression ermittelt. Dafür wurde ein Quotient (MdFI_Q) aus dem MdFI des Stimulationsansatzes und dem der zugehörigen Mediumkontrolle (MK) berechnet:

$$\text{MdFI}_Q = \frac{\text{MdFI}_{\text{stimuliert}}}{\text{MdFI}_{\text{MK}}}$$

4.8 Auswertung auf Einzeltierebene

Um Aussagen über die Eignung der untersuchten Parameter als Kenngröße für diagnostische Untersuchungen machen zu können, wurde die Differenzierbarkeit von Tieren nach ihrem Inokulationsstatus auf Einzeltierebene getestet. Für den IFN- γ -Test, den IL-10-Test, die Genexpressionsanalyse und die Analyse von Lymphozyten mittels Durchflusszytometer wurden Grenzwerte als Entscheidungskriterien festgelegt. Diese Grenzwerte wurden aus den Gesamtdaten der von Kontrolltieren stammenden Proben abgeleitet. Je Parameter wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der bei den Kontrolltieren über den Versuchsverlauf ermittelten Daten berechnet. Probenergebnisse wurden dann als positiv angesehen, wenn sie diesen Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung überstiegen. Für den jeweiligen Stimulationsansatz wurde je BT aus der Anzahl richtig-negativer Ergebnisse unter den Kontrolltieren und der Gesamtzahl der Kontrolltiere die Richtig-Negativ-Rate des Tests berechnet:

$$\text{Richtig-Negativ-Rate} = \frac{\text{richtig negativ (n)}}{\text{Kontrolltiere (n)}} \times 100$$

Analog dazu wurde je BT aus der Anzahl richtig-positiver Ergebnisse unter den Versuchstieren und der Gesamtzahl der Versuchstiere die Richtig-Positiv-Rate ermittelt:

$$\text{Richtig-Positiv-Rate} = \frac{\text{richtig positiv (n)}}{\text{Versuchstiere (n)}} \times 100$$

Dies wurde jeweils für die Stimulationsansätze untersucht, die gegenüber der Mediumkontrolle eine signifikante Steigerung der Zytokin-Freisetzung zeigten. Es wurden je Stimulationsansatz sowohl die absolute (S/P-Ratios/ Δ CT-Werte/MdFI-Werte) wie auch die relative (SI-Werte/*Ratios*/MdFI_Q-Werte) Freisetzung bzw. Genexpression der Zytokine oder Expression von CD25 bzw. CD26 auf den Gedächtniszellen der Berechnung zugrunde gelegt.

4.9 Statistische Auswertung

4.9.1 Analyse der methodischen Varianz

Die bei den ELISA und der real-time PCR mitgeführten internen Kontrollen dienten der Analyse der methodisch bedingten Varianzanteile der Testsysteme. Es wurden jeweils die S/P-Ratios bzw. die CT-Werte der internen Kontrollen für die Berechnungen verwendet. So wurde mit der Statistik-Software *STATGRAPHICS Centurion XVI.I* eine Varianzanalyse durchgeführt. Folgende Varianzanteile wurden bestimmt:

- 1) Der Anteil der Varianz, der auf die Unterschiede zwischen den Plattenchargen (nur beim IFN- γ -ELISA zutreffend) entfällt.
- 2) Der Anteil der Varianz, der auf die Unterschiede zwischen Tagesansätzen entfällt.
- 3) Der Anteil der Varianz, der auf die Unterschiede zwischen Einzelplatten eines Tagesansatzes entfällt.
- 4) Der Anteil der Varianz, der auf die Unterschiede zwischen den technischen Replikaten einer Probe entfällt.

Die Wurzeln dieser Varianzanteile, die Standardabweichungen, wurden als Streuungsmaße herangezogen. Berechnung der Standardabweichung einer Zufallsvariable X :

$$\text{Standardabweichung}(X) = \sqrt{\text{Varianz}(X)}$$

Um die Streuung in Relation zum Mittelwert zu betrachten, wurde der Variationskoeffizient berechnet (bezogen auf eine Zufallsvariable X ; $E(X)$ steht für den Erwartungswert bzw. Mittelwert der Zufallsvariable X):

$$\text{Variationskoeffizient}(X) = \frac{\sqrt{\text{Varianz}(X)}}{E(X)}$$

4.9.2 Darstellung der Daten und Gruppenvergleiche

Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Kot- und Organproben, der Serologie, die berechneten S/P-Ratios der ELISA, die berechneten *Ratios* und ΔCT -Werte aus der Genexpressionsanalyse sowie die MdFI- und MdFI_Q-Werte aus den Analysen am Durchflusszytometer wurden in einer Tabelle zusammengefasst. Diese Daten wurde mit der Statistik-Software *IBM® SPSS® Statistics Version 19* bearbeitet. Damit bei der Anwendung von statistischen Tests die Gesamtheit der im Versuch stehenden Tiere erfasst werden konnte, wurden jeweils die Ergebnisse eines BT als eine Einheit behandelt. Die den BT entsprechenden Wochen *p.i.* sowie das Alter der Tiere finden sich in Tab. 10.

Tab. 10: Gegenüberstellung von Beprobungsturnus, Wochen *p.i.* und dem Alter der Tiere. KT = Kontrolltiere; VT = Versuchstiere

	Beprobungsturnus (BT)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Woche <i>p.i.</i>	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43	47	51
(von / bis)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42	46	50	54
Alter KT	4	8	12	16	21	25	28	34	38	43	47	51	55
(Wochen;	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
von / bis)	9	13	17	21	24	28	32	36	39	44	48	52	56
Alter VT	8	12	16	20	24	28	34	38	41	46	50	54	58
(Wochen;	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
von / bis)	11	15	19	23	27	31	35	39	42	47	51	55	59

Die Ergebnisse wurden grafisch dargestellt in Form von *Box-Whisker-Plots*, die robuste Streuungs- und Lagemaße zusammenfassen. Die mittleren 50 % der Datenwerte werden bei dieser Darstellungsart durch ein Rechteck eingefasst. Dessen untere Grenze bezeichnet das untere, die obere entsprechend das obere Quartil. Ein waagerechter Strich im Inneren kennzeichnet den Median. Bis zu einer 1,5-fachen Länge des Rechtecks führen senkrechte Striche zu den kleinsten bzw. größten Werten. Liegen Werte außerhalb dieser Spanne, werden sie als Ausreißer angesehen. Diese werden mit Kreisen und der zugehörigen Tiernummer markiert.

Für die Prüfung der Datensätze auf signifikante Unterschiede zwischen verbundenen Stichproben (z.B. verschiedene Stimulationsansätze) wurde der Wilcoxon-Test eingesetzt. Wurden Vergleiche zwischen unabhängigen Stichproben (z.B. verschiedene Gruppen von Tieren) angestellt, so wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Um zu prüfen, ob der zeitliche Verlauf der Ausscheidung von MAP mit dem Kot, das Ausmaß der Organbesiedlung mit MAP oder das Entwickeln einer MAP-spezifischen Antikörperreaktion mit bestimmten Mustern in der zellvermittelten Immunität korrelieren, wurden retrospektiv Teilgruppen charakterisiert (Abb. 5). Diese Teilgruppen konnten im Folgenden zur Aufschlüsselung von Datensätzen anderer Parameter bzw. für statistische Tests (Mann-Whitney-U-Test) verwendet werden.

Des Weiteren wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (*Spearman's Rho*) berechnet, um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern der zellvermittelten Immunität zu bestimmen. Das Signifikanzniveau wurde auch hier auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Korrelationen wurden der Höhe des Rangkorrelationskoeffizienten folgend bewertet (Bühl and Zöfel 2008).

28 Versuchstiere Einteilung nach Parameter X

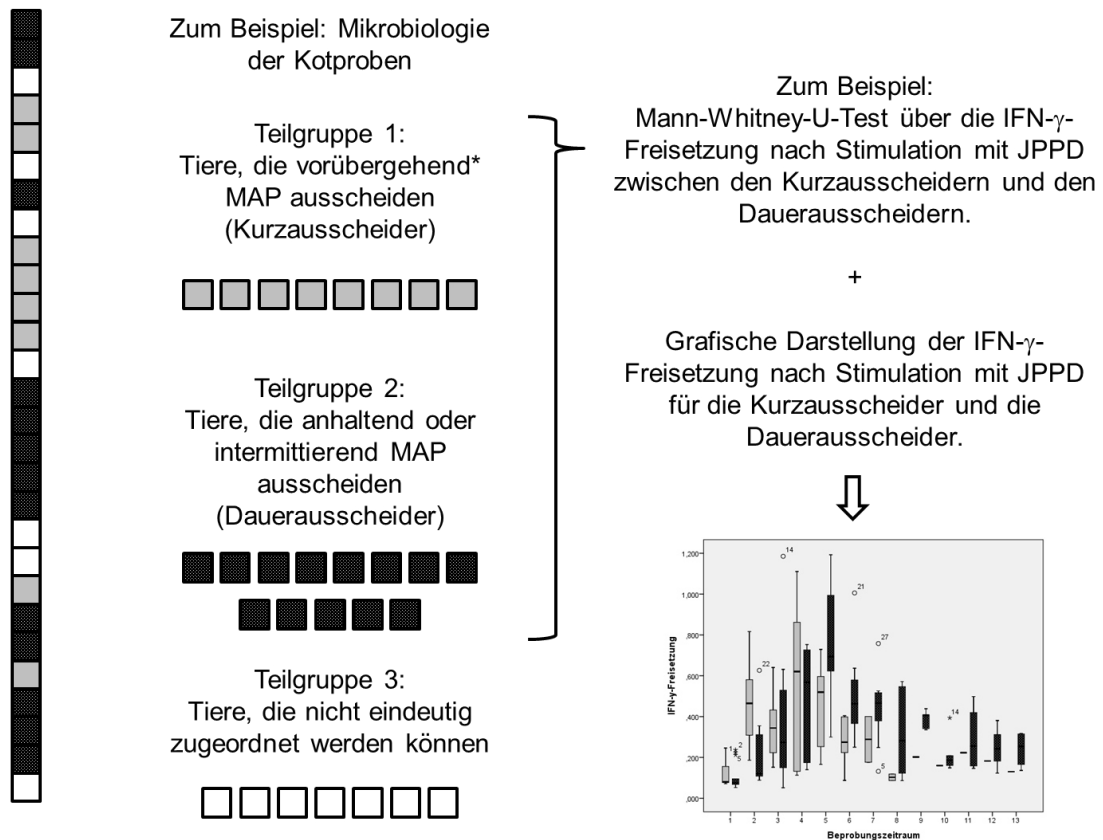
Weiterführende statistische Tests:
Mann-Whitney-U-Tests für Parameter Y
zwischen Teilgruppen

Abb. 5: Schematische Darstellung der Charakterisierung von Teilgruppen. Die heterogene Gesamtheit der Versuchstiere wird anhand eines Parameters in Teilgruppen eingeteilt, die für diesen Parameter homogen sind. Diese werden im Folgenden zur Auswertung der Ergebnisse anderer Parameter mit herangezogen. (*) Bis max. zum dritten BT

Tab. 11: Bewertung der Korrelation anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman mit negativem Vorzeichen werden ohne Beachtung desselben bewertet. Für die Korrelation gilt jedoch, dass der festgestellte Zusammenhang negativer Natur ist.

Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman	Bewertung der Korrelation
0	keine
> 0 und $\leq 0,2$	sehr gering
> 0,2 und $\leq 0,5$	gering
> 0,5 und $\leq 0,7$	mittel
> 0,7 und $\leq 0,9$	hoch
> 0,9	sehr hoch

5 Ergebnisse

5.1 Kontrolle des Infektionsstatus der Tiere

Um die in dieser Studie gewonnenen Daten korrekt mit dem Infektionsstatus der Tiere in Bezug setzen zu können, wurde dieser anhand von drei Parametern kontrolliert. Dafür herangezogen wurden der kulturelle Nachweis von MAP in Kot- und Organproben sowie der Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum. Die Kontrolltiere unterschieden sich durch ihre durchgehend negativen Befunde in allen vorgenannten Aspekten eindeutig von den Versuchstieren. Die Ergebnisse der Versuchstiere jedoch erwiesen sich in ihrer Ausprägung nicht als einheitlich, sondern vielmehr als interindividuell verschieden.

5.1.1 Kultureller MAP-Nachweis in Kotproben

Während in Kotproben der Kontrolltiere zu keinem Zeitpunkt vermehrungsfähige MAP nachweisbar waren (nicht dargestellt), schieden alle Versuchstiere zumindest vorübergehend vermehrungsfähige MAP aus (Tab. 12). Die Versuchstiere unterschieden sich allerdings in der Höhe des berechneten Wachstumsindex (WI) sowie der Kontinuität des MAP-Nachweises über den Versuchszeitraum. Bei insgesamt zehn Versuchstieren scheint die Ausscheidung nach BT 1 bzw. BT 2 aufzuhören. Für fünf Versuchstiere wurde zu jedem BT MAP im Kot nachgewiesen. Bei neun Versuchstieren konnte eine intermittierende Ausscheidung von MAP festgestellt werden.

5.1.2 Serologischer Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion

In Serumproben der Kontrolltiere konnten zu keinem Zeitpunkt MAP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Die Versuchstiere hingegen zeigten überwiegend die Entwicklung eines stabilen MAP-spezifischen Antikörpertiters (Tab. 13). Dieser konnte mit Ausnahme eines Tieres (bei Tier Nr. 7 bereits in BT 2, allerdings nicht konsistent) bei den Versuchstieren ab BT 3 nachgewiesen werden. Doch auch unter den Versuchstieren gab es Individuen, die über einen längeren Zeitraum keinen positiven Antikörpertiter ausbildeten (Tiere Nr. 6, 10, 25 und 13).

Tab. 12: Kultureller MAP-Nachweis in Kotproben von Versuchstieren. Dargestellt ist der für die technischen Replikate gemittelte Wachstumsindex der Kotproben in Abhängigkeit vom BT.

VGr	Tiernr.	E	BT														
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
V1	1	k	50	16	8	12	†										
V1	2	k	37	k	12	3	†										
V1	3	k	42	k	8	0	†										
V1	15	0	7	k	0	0	†										
V1	16	0	41	17	0	0	†										
V1	17	0	40	5	0	nd	†										
V1	18	0	27	k	13	9	†										
V2	4	k	42	k	17	0	k	0	8	†							
V2	6	k	41	k	0	0	0	0	0	†							
V2	7	0	23	11	4	0	0	0	k	†							
V2	10	k	50	27	5	0	0	0	k	†							
V2	19	k	45	23	8	0	0	0	0	†							
V2	20	0	43	k	†												
V2	21	0	33	k	6	10	15	5	0	†							
V3	5	0	33	10	19	8	0	7	0	13	6	†					
V3	8	k	50	10	2	15	10	0	46	13	5	†					
V3	9	0	23	30	19	29	24	17	9	3	5	†					
V3	22	k	40	k	15	13	13	0	6	2	8	†					
V3	23	0	41	k	7	0	19	k	0	k	0	†					
V3	24	k	†														
V3	25	k	k	5	0	4	0	0	0	0	0	†					
V4	11	0	46	26	2	12	10	5	32	21	28	22	25	†			
V4	12	k	38	12	10	22	3	0	6	10	4	k	7	8	1	0	
V4	13	0	41	14	10	0	0	0	k	0	0	0	0	k	0	0	
V4	14	k	37	25	8	k	0	0	0	0	8	5	3	3	0	10	
V4	26	0	31	10	17	32	58	71	63	63	32	22	61	65	77	68	
V4	27	0	23	7	9	58	49	67	63	44	69	44	61	59	112	75	
V4	28	0	32	7	31	51	19	2	0	5	4	k	0	0	0	0	

VGr = Versuchsgruppe; Tiernr. = Tiernummer; BT E = Beprobung vor Inokulationsbeginn; BT 0 = Beprobung nach Abschluss der Inokulation; † = Tier aus dem Versuch genommen; k = fehlendes Ergebnis aufgrund von Kontamination mit schnellwachsenden Bakterien oder Pilzen; nd = nicht durchgeführt.

Grau hinterlegt sind Ergebnisse, die als MAP bestätigt wurden.

Tab. 13: Nachweis MAP-spezifischer Antikörper im Serum von Versuchstieren.
Dargestellt sind die S/P-Ratios der Serumproben in Abhängigkeit vom BT.

VGr	Tiernr.	BT													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
V1	1	2	4	5	134	†									
V1	2	16	27	11	112	†									
V1	3	2	4	11	25	†									
V1	15	0	4	3	9	†									
V1	16	1	1	15	7	†									
V1	17	2	6	5	3	†									
V1	18	8	27	19	5	†									
V2	4	1	3	13	8	41	94	154	†						
V2	6	1	3	12	11	12	4	5	†						
V2	7	2	19	135	66*	35	16	16	†						
V2	10	6	9	15	28	33	27	27	†						
V2	19	3	1	2	121	107	106	75	†						
V2	20	2	9	†											
V2	21	4	2	7	27	202	230	251	†						
V3	5	3	8	3	2	5	82	130	166	176	†				
V3	8	1	2	5	63*	168	274	261	259	254	†				
V3	9	3	1	6	184	240	280	256	261	257	†				
V3	22	4	2	6	164	198	209	180	195	183	†				
V3	23	1	1	8	181	228	263	243	51	226	†				
V3	24	†													
V3	25	1	3	5	3	7	39	24	51	18	†				
V4	11	3	6	5	38	128	229	233	240	236	252	222	†		
V4	12	1	3	7	54	121	143	137	155	142	146	129	126	142	143
V4	13	2	7	4	8	11	5	7	3	5	4	3	3	4	5
V4	14	4	15	9	98	119	140	131	140	127	129	112	125	123	132
V4	26	14	14	12	197	244	259	233	246	244	223	222	227	249	261
V4	27	6	2	2	18	75	165	182	183	183	168	173	177	185	207
V4	28	5	24	19	174	225	229	213	203	199	177	169	164	172	185

VGr = Versuchsgruppe; Tiernr. = Tiernummer; BT 0 = Beprobung nach Abschluss der Inokulation; † = Tier aus dem Versuch genommen; (*) = Ergebnis nach Herstellerangaben fraglich.

Grau hinterlegt sind Ergebnisse, die nach Herstellerangaben als fraglich bis positiv gewertet wurden.

5.1.3 Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren

Weder der kulturelle Nachweis von MAP in Kotproben noch der Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion ergab falsch-positive Ergebnisse. Die Richtig-Positiv-Raten schwankten jedoch über den Versuchszeitraum von 36,8 % bis 80,8 % für den kulturellen MAP-Nachweis bzw. von 0 % bis 85,7 % für den Antikörpernachweis (Tab. 14).

Tab. 14: Richtig-Positiv-Rate beim kulturellen MAP-Nachweis in Kotproben bzw. beim Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion in Abhängigkeit vom BT.

BT	Richtig-Positiv-Rate [%] beim Nachweis von	
	MAP in Kotproben	MAP-spezifischen Antikörpern in Serumproben
1	65,4	0
2	80,8	3,8
3	53,8	30,8
4	52,6	63,2
5	36,8	73,7
6	42,1	73,7
7	69,2	76,9
8	76,9	84,6
9	57,1	85,7
10	71,4	85,7
11	66,7	85,7
12	50	83,3
13	50	83,3

5.1.4 Kultureller MAP-Nachweis in Organproben zum Sektionszeitpunkt

Auch der kulturelle MAP-Nachweis in Organproben gelang ausschließlich bei inokulierten Versuchstieren (Tab. 15, Tab. 16). Aus Organproben von Kontrolltieren gelang keine Anzucht von MAP, jedoch wurden bei drei Tieren in ein bis zwei Lokalisationen IS 900-negative, aber IS 1245-positive Mykobakterien nachgewiesen. Bei den Versuchstieren hingegen war, mit Ausnahme von Tier Nr. 13, bei jedem Tier in mindestens zwei Organproben MAP nachweisbar.

Der Nachweis von MAP gelang häufiger und mit größerem WI bei Proben aus dem Darmtrakt und aus darm-assoziierten Lymphknoten als bei Proben von anderen Lokalisationen. MAP-Nachweise in nicht darm-assoziierten Lokalisationen gelangen vor allem bei den Versuchstieren, die nach drei (V1) bzw. nach zwölf Monaten (V4) der Sektion zugeführt wurden.

In den Versuchsgruppen V1 und V4 wurden außerdem die höchsten WI von allen untersuchten Organproben gefunden. In Gruppe V1 wiesen fünf von sieben Tieren und in Gruppe V4 drei von sieben Tieren Organproben mit $WI \geq 75$ auf; in den Gruppen V2 und V3 wurden keine Organproben mit einem WI über 70 gefunden. Eine Korrelation zwischen der Zeit bis zur Sektion der Tiere und der Anzahl vermehrungsfähiger MAP in den untersuchten Organproben war demnach nicht erkennbar.

Bereits bei den beiden Versuchstieren, die frühzeitig den Versuch verließen, wurde MAP im Gewebe nachgewiesen. Das Tier Nr. 24 verstarb spontan vor der letzten Inokulation; die Organproben konnten erst am folgenden Tag entnommen werden. Das Tier Nr. 20 hingegen wurde aufgrund schlechter gesundheitlicher Verfassung einen Monat *p.i.* aus Tierschutzgründen euthanasiert und danach der Sektion zugeführt. In keinem der beiden Fälle konnte MAP ursächlich für die schlechte Verfassung der Tiere zugeordnet werden. Die Organproben des Tieres Nr. 24 zeigten, dass MAP auch schon zum Ende der Inokulationsphase in dem darm-assoziierten Lymphgewebe vorlag (Tab. 15). Einen Monat *p.i.* konnte bei dem Tier Nr. 20 MAP im Darmgewebe, im darm-assoziierten Lymphgewebe sowie in der Leber, dem Leberlymphknoten und der Niere nachgewiesen werden (Tab. 15, Tab. 16).

Abgesehen von den Unterschieden, die sich aufgrund des Infektionsverlaufs zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zeigten, unterschieden sich die Versuchstiere innerhalb einer Versuchsgruppe ebenfalls in der Höhe der WI und in der Ausdehnung der Befunde. Am deutlichsten zeigten sich diese Unterschiede in Versuchsgruppe V4.

Tab. 15 : Kultureller Nachweis von Mykobakterien in Proben aus dem Darmtrakt und aus darm-assoziiertem Lymphgewebe bei Kontroll- und Versuchstieren. Dargestellt ist der für die technischen Replikate gemittelte Wachstumsindex (WI) der Organproben, in Symbolen kodiert (+ = $0 < WI < 25$; ++ = $25 \leq WI < 50$; +++ = $50 \leq WI < 75$; ++++ = $75 \leq WI$). Es sind nur die Tiere aufgeführt, bei denen Koloniewachstum beobachtet wurde.

Inokulationsstatus	Sektion (Monat <i>p.i.</i>)	Tiernummer	Duodenum	Proximales Jejunum	Mittleres Jejunum	Distales Jejunum	Jejunum PP	Proximales Ileum	Terminales Ileum	LG Ileozäkal-Klappe	LG proximales Colon	Mesenterial-Ln (1)	Mesenterial-Ln (2)	Mesenterial-Ln (3)	Ileozäkal-Ln
VT	0	24	x	k	0	k	x	k	k	+	+	k	k	k	+
1	20	+	+	+++	0	+	++++	+++	k	+++	+++	++	+	++++	++
3	1	+	+	++	+	+	+++	+++	++	+++	++++	+++	++++	+++	+++
	2	k	k	++	+++	++	+++	+	+	+++	++++	++++	++	++	++
	3	k	k	+	0	+	++++	+	+	+++	++++	++	+	+	++++
	15	k	k	+	k	k	k	k	k	+	++	+	++	+	++
	16	k	k	k	k	k	k	k	k	k	++	++++	++	k	++++
	17	k	k	+	+	+	+++	+	+	+++	++	++	+	++	+++
	18	k	k	k	k	k	k	k	k	+++	++++	++	++	++	++++
6	4	+	+	+++	++	+	+++	++	++	+++	+++	+	+++	+	+++
	6	0	0	k	k	0	k	0	0	+	+	+	0	0	+
	7	0	0	0	0	0	+	+	0	++	+	+	+	+	++
	10	k	k	+	k	0	+	+	0	+	++	+	+	+	++
	19	k	k	0	k	0	+	0	k	0	0	+	+	0	++
	21	+	+	++	k	+	++	k	0	++	+	k	+	k	++
9	5	0	0	++	+++	+	+++	+	+	++	+	+	++	+	++
	8	k	k	k	+	+	+++	+	+	+	++	+	++	+	+++
	9	k	k	k	k	0	+	+	0	+	+++	k	0	+	++
	22	0	0	k	+	0	+++	+	+	++	++	+	++	+	++
	23	k	k	+	0	0	+	0	+	+	+++	k	k	+	+
	25	k	k	k	0	0	0	0	0	0	0	k	+	0	+++
12	11	k	k	++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++++
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	++++	+	+	0	+
	13	0	0	k	k	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	k	k	+	0	+	+	+	0	+++	+++	++	+	+	+++
	26	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	27	k	k	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++
	28	0	0	k	+	++	0	0	0	++	+	+	+	+	+
KT	9	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
		36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		37	k	0	0	k	0	k	0	0	+	0	0	0	0

VT = Versuchstier; KT = Kontrolltier; PP = Peyer'sche Platte; LG = Lymphatisches Gewebe; Ln = Lymphknoten; x = keine Probe, da Gewebe autolytisch; k = kein Ergebnis, da Kultur mit schnellwachsenden Bakterien oder Pilzen kontaminiert; (*) = Nachweis von IS 900-negativen/IS 1245-positiven Mykobakterien. Grau hinterlegt sind Ergebnisse, die als MAP bestätigt wurden. Die Tiere Nr. 24 und Nr. 20 verließen vorzeitig den Versuch.

Tab. 16 : Kultureller Nachweis von Mykobakterien in Proben von nicht darm-assoziierten Lokalisationen bei Kontroll- und Versuchstieren. Dargestellt ist der für die technischen Replikate gemittelte Wachstumsindex (WI) der Organproben, in Symbolen kodiert (+ = $0 < WI < 25$; ++ = $25 \leq WI < 50$; +++ = $50 \leq WI < 75$; ++++ = $75 \leq WI$). Es sind nur die Tiere aufgeführt, bei denen Koloniewachstum beobachtet wurde.

Inokulationsstatus	Sektion (Monat <i>p.i.</i>)	Tiernummer	Bug-Ln	Retropharyngeal-Ln	Tonsille	Leber	Leber-Ln	Milz	Niere	Zwerchfell	Oberschenkelmuskel
VT	0	24	x	x	x	k	0	k	x	x	k
	1	20	0	0	0	+	+	0	+	0	0
	3	1	+	+	+	+	+++	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	+	0	0	0	0
		3	+	0	0	0	+	0	0	0	0
		15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		16	0	0	+	0	+	0	0	0	0
		17	+	0	0	+	+	0	0	0	0
		18	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	6	4	0	0	0	0	+	0	0	0	0
		6	0	0	0	k	0	0	0	0	0
		7	0	0	0	0	+	0	0	0	0
		10	0	0	0	k	+	0	0	0	0
		19	0	0	0	0	+	0	0	0	0
		21	0	0	0	0	+	0	k	0	0
	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	0	0	0	0	+	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0	k	0	0	0
		22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	11	+	+	0	0	++	0	0	+	0
		12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		14	+	0	+	0	0	0	0	0	0
		26	+	++	++++	++	++++	+	0	0	++
		27	++	+	++++	+++	++++	+	0	+	+
		28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KT	9	35	0	0	0	0	0	0	0	+	0
		36	0	0	+	0	0	0	0	0	0
		37	0	0	+	0	0	0	0	0	0

VT = Versuchstier; KT = Kontrolltier; Ln = Lymphknoten; k = kein Ergebnis, da Kultur mit schnellwachsenden Bakterien oder Pilzen kontaminiert; (*) = Nachweis von IS 900-negativen/IS 1245-positiven Mykobakterien. Grau hinterlegt sind Ergebnisse, die als MAP bestätigt wurden. Die Tiere Nr. 24 und Nr. 20 verließen vorzeitig den Versuch.

5.2 Vorgehen bei der Auswertung der Daten des IFN- γ -Tests, des IL-10-Tests, der Genexpressionsanalysen und der Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression auf T-Gedächtniszellen

Um die Lesbarkeit der folgenden Kapitel zu erhöhen sei kurz zusammengefasst, wie sich die Kapitel 5.3, 5.4, 5.5 und 5.6 aufbauen. Die ersten drei Kapitel beginnen mit einer Varianzanalyse des Testsystems, für die Daten der jeweils mitgeführten internen Kontrollen ausgewertet wurden. Bei der Quantifizierung der Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Gedächtniszellen wurde keine solche Kontrolle mitgeführt. Gegebenenfalls wurden in diesem Abschnitt auch andere mögliche Einflüsse auf die Testergebnisse untersucht. Als nächstes wurden die Verhältnisse bei den unstimulierten PBMC dargestellt. Diese reflektieren die spontane Sekretion oder Genexpression von Zytokinen bzw. die spontane Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Gedächtniszellen. Nachfolgend wurde gezeigt, dass die PBMC die Fähigkeit besaßen, auf geeignete Stimuli (Positivkontrollen) mit einer Veränderung der zu messenden Parameter zu reagieren. Mit dieser Voraussetzung wurde dann die Änderung der Messparameter nach spezifischer Stimulation untersucht. Diese reflektiert das Vorkommen und die Reaktion von auf das jeweilige Antigen (oder eines der Antigene) spezifisch reagierenden Immunzellen im peripheren Blut. Zum Schluss der einzelnen Kapitel wurde das diagnostische Potential des jeweiligen Tests unter den Voraussetzungen dieser Studie mit den beschriebenen Messparametern dargestellt. Dafür wurden nach Festlegung eines Grenzwertes für das Testergebnis „MAP-positiv“ Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten berechnet.

5.3 Ergebnisse des IFN- γ -Tests

Anhand des IFN- γ -Tests wurden die spontane IFN- γ -Freisetzung in unstimulierten PBMC sowie die Freisetzung von IFN- γ nach Stimulation der PBMC charakterisiert. Die errechneten S/P-Ratios bzw. SI-Werte wurden zur sprachlichen Vereinfachung im Fließtext auch als „absolute IFN- γ -Freisetzung“ bzw. „relative IFN- γ -Freisetzung“ bezeichnet.

5.3.1 Untersuchung der Varianz der mit dem IFN- γ -ELISA ermittelten Daten und des Einflusses von Rangordnungsneubildungen auf die Freisetzung von IFN- γ

Um verfahrensbedingte Einflüsse auf die IFN- γ -Freisetzung während der Durchführung des IFN- γ -ELISA beschreiben zu können, wurden die S/P-Ratios der internen Kontrollen mittels Varianzanalyse untersucht (Tab. 17). Die Gesamtvarianz der S/P-Ratios betrug für den IFN- γ -ELISA 0,02. Die Plattenchargen (Beschichtungsansätze) hatten dabei mit 63,2 % den größten Anteil an der Gesamtvarianz. Die Tagesansätze machten einen Anteil von 24,4 %, die Einzelplatten eines Tagesansatzes 10,4 % aus. Auf die technischen Replikate einer Probe entfielen lediglich 2,1 %.

Tab. 17: Einflüsse der Plattenchargen, Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der S/P-Ratios der internen Kontrolle im IFN- γ -ELISA. In den Test gingen 5 Plattenchargen und 19 Tagesansätze auf insgesamt 178 Einzelplatten mit je 2 technischen Replikaten ein (356 Einzelwerte).

Einflussgröße	Varianzanteil der Einflussgröße	Anteil an der Gesamtvarianz [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Plattenchargen	,012	63,2	,111	17,37
Tagesansätze	,005	24,4	,069	10,83
Einzelplatten eines Tagesansatzes	,002	10,4	,045	7,09
Technische Replikate einer Probe	,000	2,1	,020	3,09
Alle Einflussgrößen zusammengefasst	,020	100	,122	19,09

Weiterhin wurde der Einfluss von Rangordnungsneubildungen auf die Freisetzung von IFN- γ untersucht. Diese kamen nach Sektionen vor, da es durch Wegnahme von Tieren aus den Versuchsräumen zu Veränderungen in der Gruppenzusammensetzung kam. Um einen möglichen Effekt auf die Testergebnisse zu untersuchen, wurden die Tiere für jeden Beprobungszeitpunkt danach kategorisiert, ob in der vorangegangenen Woche aus ihrem Versuchsraum ein Tier der Sektion zugeführt wurde („Rangordnung beeinflusst“) oder ob die Gruppenzusammensetzung im Versuchsraum in der vorangegangenen Woche gleich geblieben war („Rangordnung unbeeinflusst“). Die Kontrolltiere ließen sich dahingehend nicht differenzieren, da sie alle in einem Raum standen. Bei den Versuchstieren zeigte sich jedoch, unabhängig vom betrachteten Stimulationsansatz, bei den Tieren der Gruppe „Rangordnung

beeinflusst“ eine Tendenz zu einer höheren IFN- γ -Freisetzung als bei Tieren der Gruppe „Rangordnung unbeeinflusst“ (Abb. 6). Die Unterschiede in der Freisetzung von IFN- γ zwischen den Gruppen war allerdings nur in Einzelfällen statistisch signifikant (Abb. 6, Tab. 18).

Tab. 18: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen Tieren, deren Rangordnung vor Probenahme beeinflusst bzw. Tieren, deren Rangordnung vor Probenahme unbeeinflusst war. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann Whitney-U-Test).

BT	Medium-kontrolle	JPPD 4 μ g/ml	APPD 125 I.E./ml	MAP 1365 5 μ g/ml	ConA 20 μ g/ml
3	,000	,311	,479	,000	,223
6	,120	,167	,083	,592	,083
13	,800	,133	1,000	,133	,533

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die Tiere mit der beeinflussten Rangordnung haben jeweils die höheren S/P-Ratios.

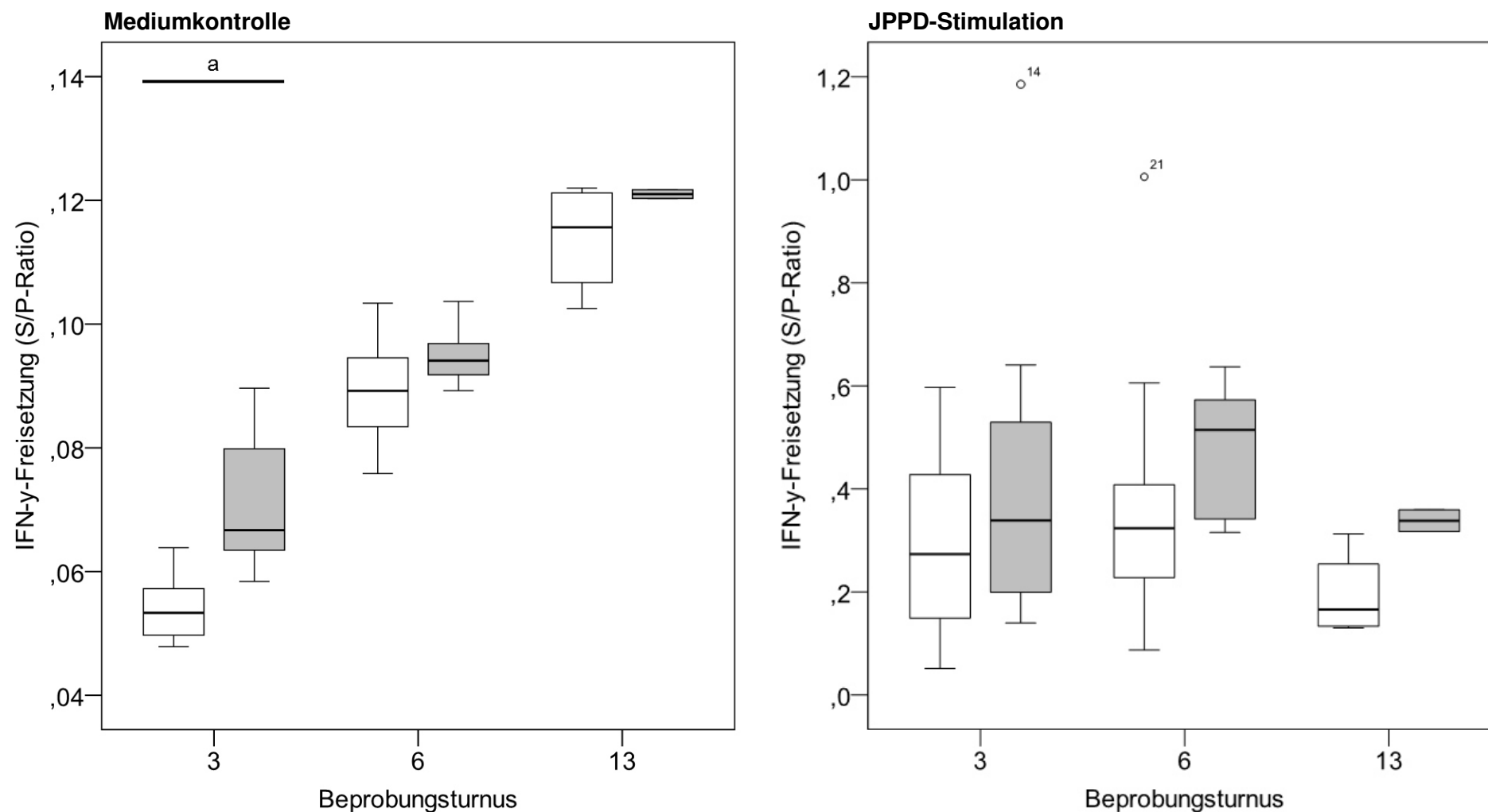


Abb. 6: IFN- γ -Freisetzung der Mediumkontrolle und von JPPD-stimulierten PBMC bei verschiedenen Gruppen von Versuchstieren in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h inkubierten Mediumkontrolle und der für 24 h mit JPPD (4 μ g/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). BT 9 nicht dargestellt, da hier alle Versuchstiere unter „Rangordnung beeinflusst“ fielen.

□ = „Rangordnung unbeeinflusst“; ■ = „Rangordnung beeinflusst“; (a) = Signifikanter Unterschied zwischen den dargestellten Tiergruppen.

5.3.2 IFN- γ -Freisetzung in unstimulierten PBMC

Die spontane IFN- γ -Freisetzung der PBMC von Kontroll- und Versuchstieren variierte von Beprobung zu Beprobung, zeigte aber keine Entwicklung über den Versuchszeitraum. Die Streuung der S/P-Ratios von Mediumkontrollen war jedoch sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchstieren in BT 1 größer als in nachfolgenden BT (Abb. 7).

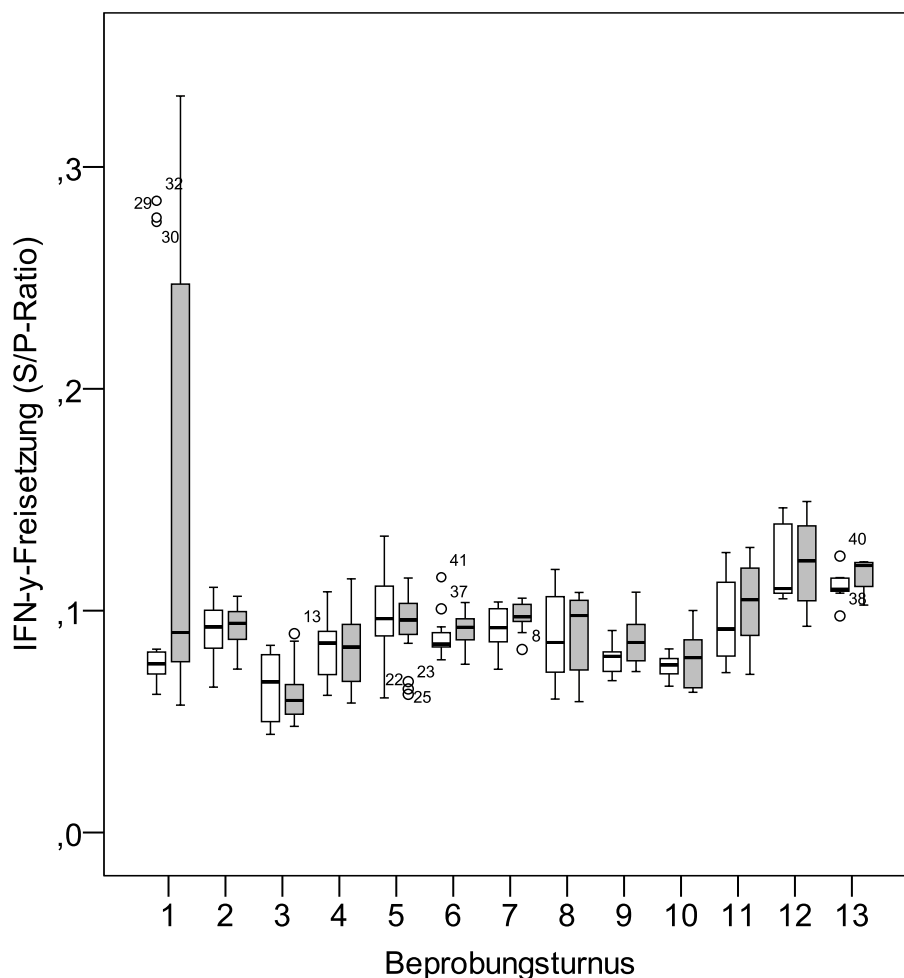


Abb. 7: IFN- γ -Freisetzung der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h inkubierten Mediumkontrolle in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). □ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere.

Verglich man jeweils die Kontroll- und Versuchstiere eines BT miteinander, so ergaben sich in der IFN- γ -Freisetzung zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Tab. 19). Berücksichtigte man die Altersdifferenz der Kontroll- und Versuchstiere und testete die IFN- γ -Freisetzung der Versuchstiere gegen die altersgleicher Kontrolltiere (einen BT später untersucht), so konnten signifikante Unterschiede für BT 2 bis BT 4 festgestellt werden (Tab. 19). Dabei war in BT 2 die IFN- γ -Freisetzung

bei den Versuchstieren höher als bei den Kontrolltieren; in BT 3 und BT 4 verhielt es sich umgekehrt.

Tab. 19: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios von Mediumkontrollen für den Nachweis von IFN- γ zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

Testung zwischen Tieren eines BT		Testung zwischen altersgleichen Tieren	
BT	exakte Signifikanz (zweiseitig)	BT	exakte Signifikanz (zweiseitig)
1	,081	1/2	,969
2	,636	2/3	,000
3	,673	3/4	<u>,000</u>
4	,935	4/5	<u>,020</u>
5	,570	5/6	,054
6	,158	6/7	,932
7	,110	7/8	,522
8	,832	8/9	,164
9	,142	9/10	,097
10	,805	10/11	,128
11	,731	11/12	,181
12	,945	12/13	,509
13	,277		

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.3.3 Induzierbarkeit erhöhter IFN- γ -Freisetzung durch ConA

Es sollte bestätigt werden, dass die Methode geeignet ist, bei isolierten PBMC *ex vivo* induzierte Steigerungen der IFN- γ -Freisetzung nachzuweisen. Dafür wurde der Nachweis erbracht, dass die gemessene Freisetzung von IFN- γ in der Positivkontrolle zu jedem Zeitpunkt höher war als in der Mediumkontrolle: Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchstieren zeigten die PBMC nach ConA-Stimulation eine signifikant höhere IFN- γ -Freisetzung als in der Mediumkontrolle (Tab. 20). Bei den Versuchstieren konnten von BT 2 (bei Testung altersgleicher Tiere) bzw. von BT 3 (bei Testung von Tieren eines BT) bis BT 7 signifikant höhere S/P-Ratios festgestellt werden als bei den Kontrolltieren (Tab. 21).

Tab. 20: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen mit ConA (20 μ g/ml) stimulierten PBMC und der Mediumkontrolle. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

	BT												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Kontrolltiere	,004	,000	,000	,000	,000	,000	,001	,002	,004	,016	,016	,016	,016
Versuchstiere	,001	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,016	,016	,031	,031	,031

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die S/P-Ratios waren jeweils nach ConA-Stimulation signifikant höher als die der Mediumkontrolle.

Tab. 21: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ nach ConA-Stimulation (20 μ g/ml) zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

Testung zwischen	BT												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Tieren eines BT	,408	,107	,000	,000	,000	,000	,003	,257	,210	,620	,628	,445	,836
Altersgleichen Tieren	<u>,041</u>	,000	,017	,000	,000	,000	,000	<u>,003</u>	,209	,805	,181	,534	

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.3.4 IFN- γ -Freisetzung in restimulierten PBMC

Zur statistischen Untermauerung der antigen-induzierten Freisetzung von IFN- γ wurden die S/P-Ratios der Antigen-Stimulationsansätze (JPPD, APPD, MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c und BLAG) gegen die der zugehörigen Mediumkontrollen getestet (Tab. 22). Während keines der getesteten Stimulantien bei den PBMC von Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Freisetzung von IFN- γ induzierte, zeigten die PBMC von Versuchstieren eine signifikant erhöhte Freisetzung von IFN- γ nach Stimulation mit JPPD, APPD und MAP 3651c. JPPD induzierte in PBMC von Versuchstieren von BT 2 bis zum Ende des Versuchs eine signifikant höhere Freisetzung von IFN- γ . APPD erreichte dies nicht durchgehend. Für das rekombinante MAP-Protein MAP 3651c war lediglich in BT 5 eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Freisetzung zu verzeichnen. Unabhängig vom Infektionsstatus der Tiere war nach Stimulation der PBMC mit den rekombinanten MAP-Proteinen 1365, 0268c und BLAG die IFN- γ -Freisetzung zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht.

Tab. 22: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen und der Mediumkontrolle. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		exakte Signifikanz zweiseitig bei entsprechender Testvariable					
		rekombinantes MAP Antigen					
	BT	JPPD 4 µg/ml	APPD 125 I.E.	1365 5 µg/ml	0268c 5 µg/ml	3651c 5 µg/ml	BLAg 5 µg/ml
Kontrolltiere	1	<u>,000</u>	<u>,000</u>	<u>,000</u>	<u>,000</u>	<u>,000</u>	
	2	,413	,252	,562	,375	,940	
	3	<u>,012</u>	<u>,009</u>	,368	,231	,074	
	4	,454	<u>,021</u>	,083	,117	<u>,013</u>	
	5	,839	,455	,519	,685	,486	
	6	,787	<u>,001</u>	<u>,001</u>	<u>,005</u>	<u>,008</u>	
	7	,542	<u>,002</u>	<u>,002</u>	<u>,048</u>	,204	
	8	1,000	<u>,002</u>	<u>,012</u>	<u>,010</u>	<u>,002</u>	<u>,004</u>
	9	,570	<u>,020</u>	<u>,039</u>	,297	,203	<u>,008</u>
	10	,438	,578	<u>,016</u>	,578	,078	,688
	11	1,000	,078	,281	,078	<u>,016</u>	,688
	12	,078	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,031</u>
	13	1,000	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,063
Versuchstiere	1	<u>,001</u>	<u>,000</u>	<u>,001</u>	<u>,000</u>	<u>,000</u>	
	2	,000	,000	,578	,090	,367	
	3	,000	,000	,520	,247	,075	
	4	,000	,000	,352	,241	,465	
	5	,000	,000	,568	,551	<u>,035</u>	
	6	,000	,000	<u>,014</u>	<u>,012</u>	,984	
	7	,000	,013	,486	,622	1,000	
	8	,000	,635	<u>,001</u>	<u>,013</u>	<u>,006</u>	<u>,004</u>
	9	,016	,016	<u>,031</u>	<u>,031</u>	1,000	<u>,016</u>
	10	,016	,047	<u>,031</u>	,938	,938	,297
	11	,031	,313	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,125
	12	,031	,313	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,188
	13	,031	1,000	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Stimulationsansätze signifikant höher als die der Mediumkontrolle. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist. Das rekombinante MAP-Antigen BLAg wurde erst ab der 33. Woche *p.i.* (in BT 8) eingesetzt.

Die Stimulationsansätze mit JPPD, APPD und MAP 3651c, die bei den Versuchstieren signifikant die Freisetzung von IFN- γ induzierten, unterschieden sich jedoch untereinander deutlich in der Höhe der induzierten IFN- γ -Freisetzung (Tab. 23, Abb. 8). Diese war zu fast jedem Zeitpunkt bei JPPD-Stimulation signifikant höher als bei Stimulation mit APPD bzw. MAP 3651c. Die Stimulation mit APPD ergab in der Mehrzahl der BT signifikant höhere Werte als die mit MAP 3651c.

Tab. 23: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen mit JPPD, APPD bzw. MAP 3651c bei Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

	BT	JPPD (4 μ g/ml) vs APPD (125 I.E./ml)	JPPD (4 μ g/ml) vs MAP 3651c (5 μ g/ml)	APPD (125 I.E./ml) vs MAP 3651c (5 μ g/ml)
Versuchstiere	1	,002	,066	,671
	2	,000	,000	,000
	3	,000	,000	,000
	4	,000	,000	,000
	5	,000	,000	,000
	6	,000	,000	,002
	7	,000	,000	,893
	8	,000	,000	,168
	9	,016	,016	,078
	10	,016	,016	,297
	11	,031	,031	,063
	12	,031	,031	,031
	13	,031	,031	,031

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Es sind jeweils die S/P-Ratios des erstgenannten Stimulationsansatzes signifikant höher als die des zweitgenannten Stimulationsansatzes.

Die Entwicklung der IFN- γ -Freisetzung stimulierter PBMC über den Versuchsverlauf war bei den Kontroll- und Versuchstieren unterschiedlich (Abb. 8). Bei den Kontrolltieren änderte sie sich kaum, es konnte allerdings eine höhere Streuung der S/P-Ratios im ersten BT festgehalten werden. Bei den Versuchstieren hingegen zeigte sich ein charakteristischer Verlauf der IFN- γ -Freisetzung. Sowohl durch JPPD wie auch durch APPD induziert stieg bei den Versuchstieren die gemessene Freisetzung von IFN- γ bis zum BT 5 an und sank dann bis zum Versuchsende wieder ab. Das Ausgangsniveau wurde bei JPPD-Stimulation jedoch nicht wieder erreicht. MAP 3651c induzierte, über die Gesamtheit der untersuchten Versuchstiere betrachtet, nur in BT 5 signifikant die Freisetzung von IFN- γ , erzielte aber bei einzelnen Versuchstieren gegenüber der Mediumkontrolle erhöhte Ergebnisse (Abb. 9). Diese waren ihrem Ausmaß nach nicht mit der JPPD-Stimulation vergleichbar, standen aber in einem zeitlichen Zusammenhang mit der gesteigerten Reaktion auf JPPD.

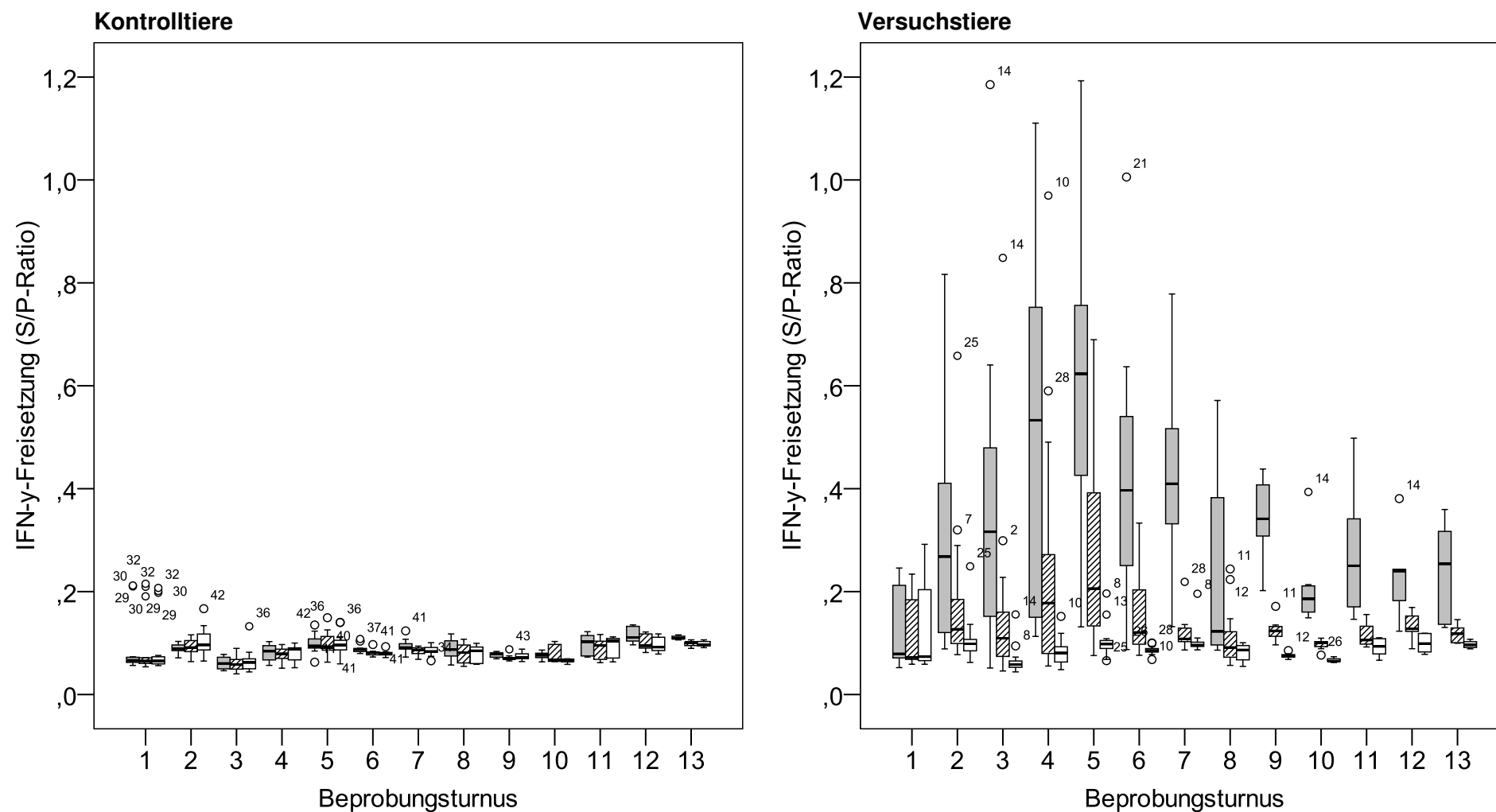


Abb. 8: IFN- γ -Freisetzung von mit JPPD, APPD bzw. MAP 3651c stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Kontrolltiere und Versuchstiere. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h mit JPPD (4 μ g/ml), APPD (125 I.E./ml) bzw. MAP 3651c (5 μ g/ml) stimulierten PBMC in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).

$\blacksquare$ = JPPD; $\square$ = APPD; $\square$ = MAP 3651c.

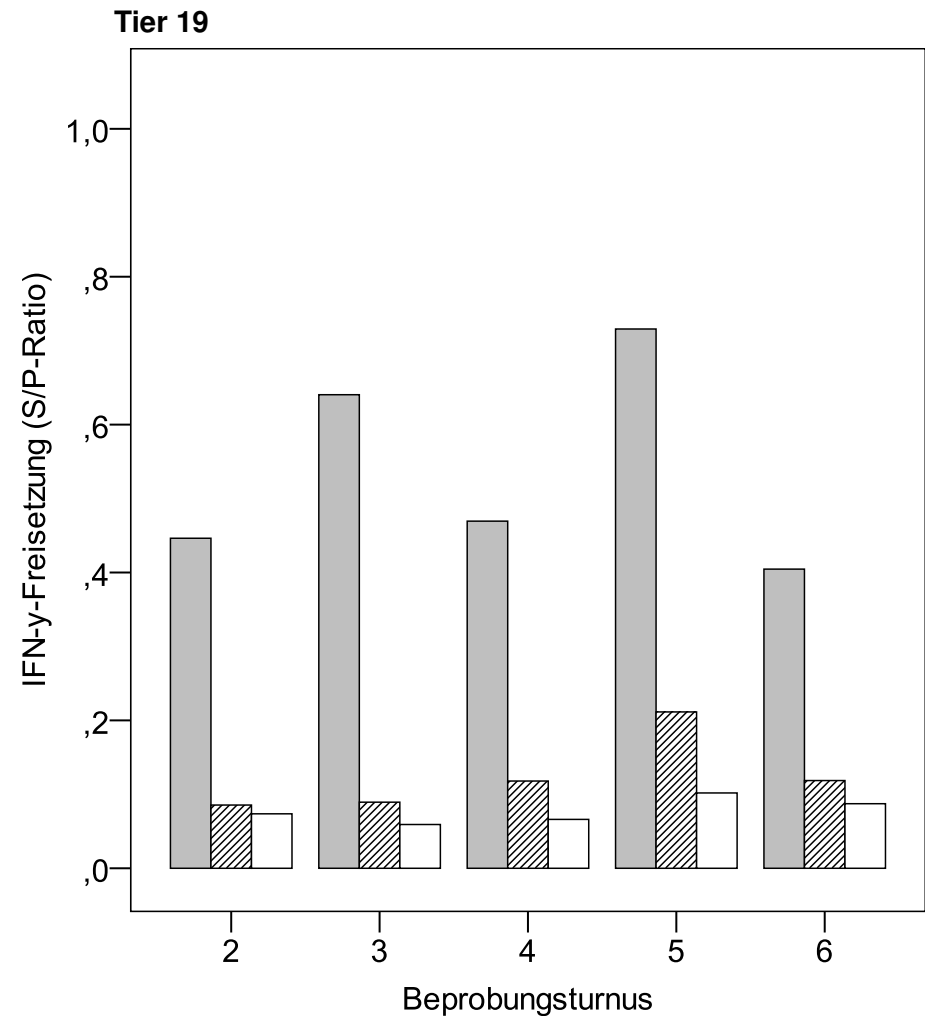
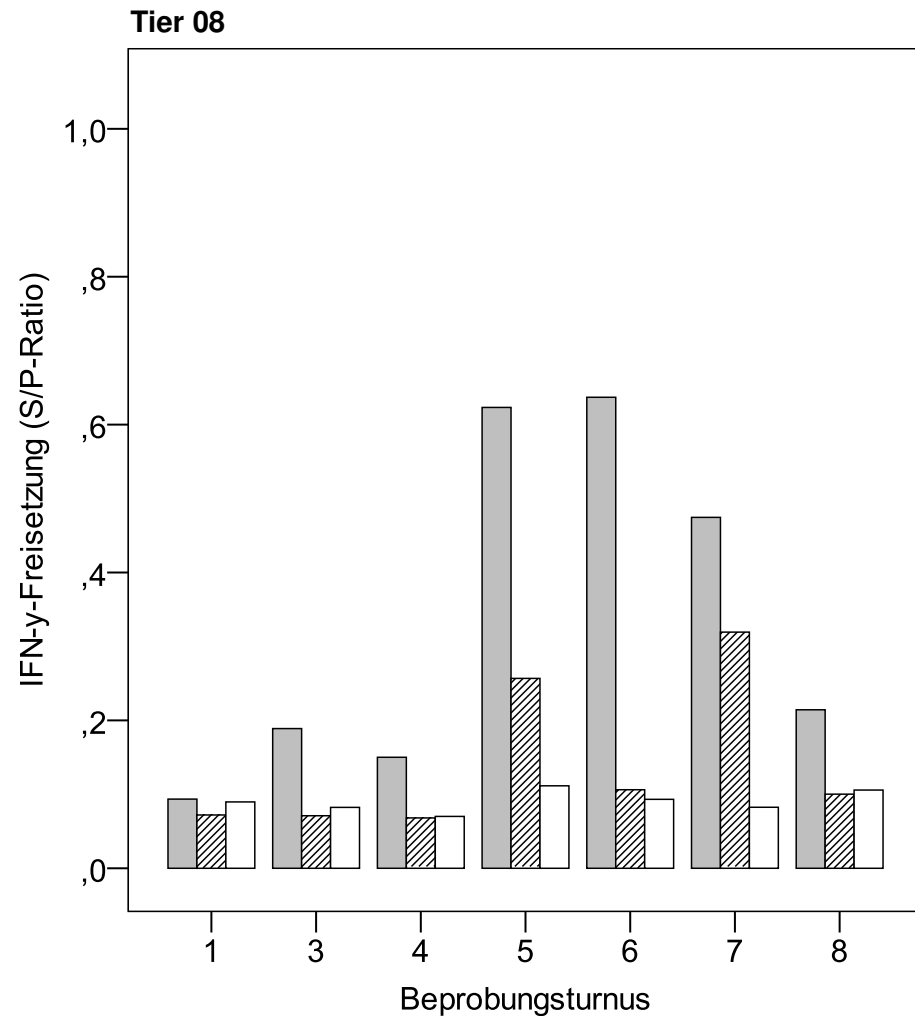


Abb. 9: IFN- γ -Freisetzung von JPPD- bzw. MAP 3651c-stimulierten PBMC und der Mediumkontrolle einzelner Versuchstiere in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h mit JPPD (4 μ g/ml) bzw. MAP 3651c (5 μ g/ml) stimulierten PBMC und der Mediumkontrolle von den Versuchstieren 08, 19, 26 und 28 in Balkendiagrammen.

■ = JPPD; ▨ = MAP 3651c; □ = Mediumkontrolle.

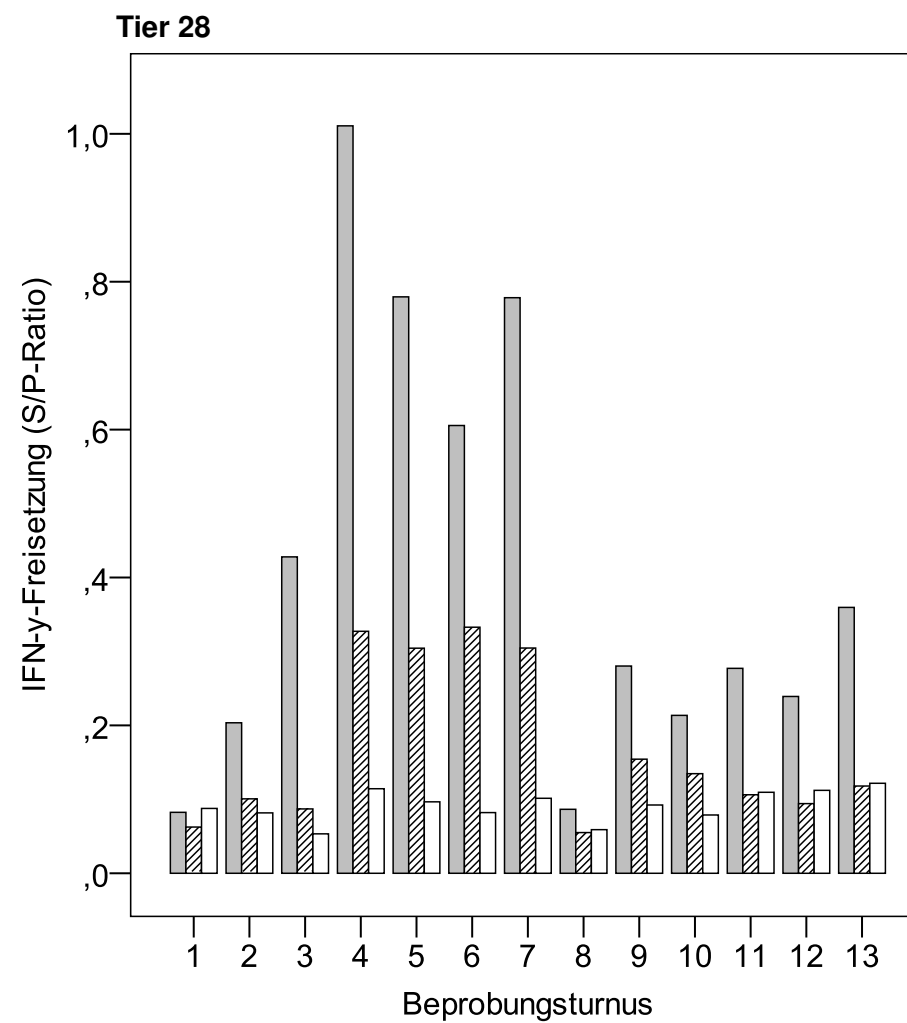
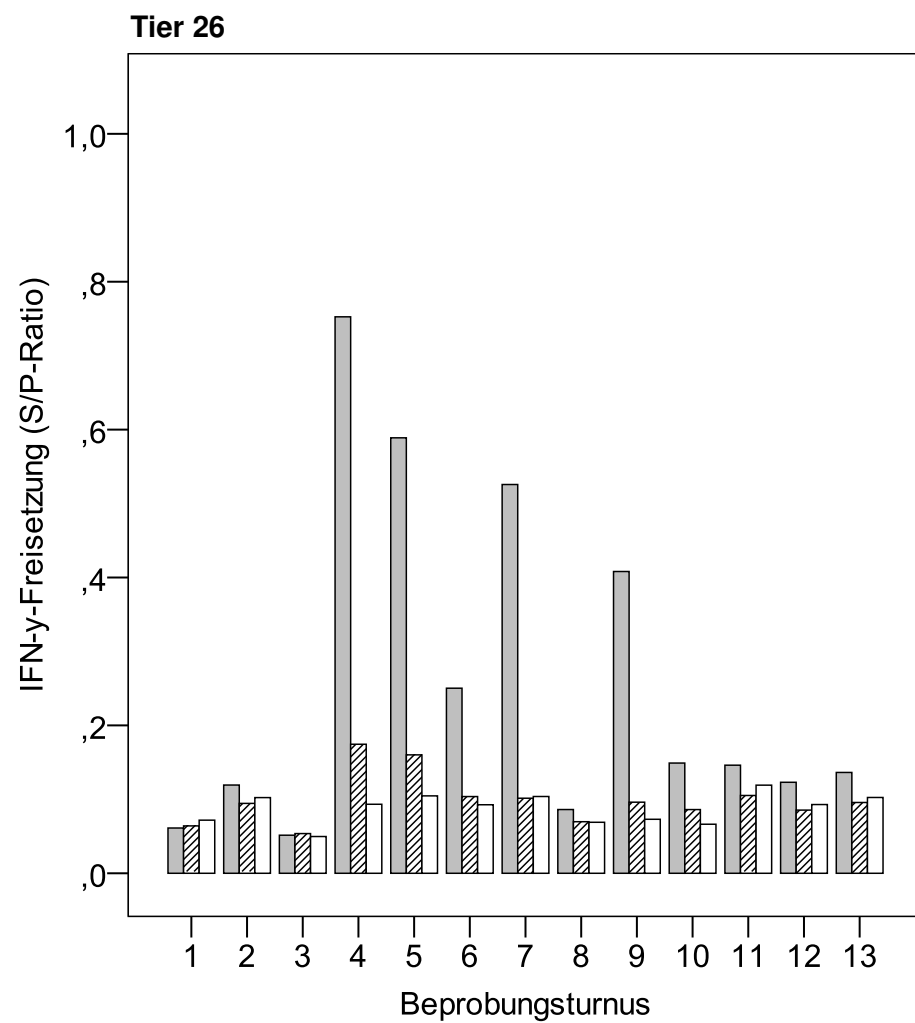


Abb. 9: (Fortsetzung)

■ = JPPD; ▨ = MAP 3651c; □ = Mediumkontrolle.

Die absolute IFN- γ -Freisetzung war bei den Versuchstieren oftmals signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Tab. 24). Dies galt vor allem für die JPPD-Stimulation: Sowohl beim Vergleich von Tieren eines BT als auch beim Vergleich von altersgleichen Tieren war der Unterschied von BT 1 bzw. BT 2 an statistisch signifikant. Für die Stimulation mit APPD konnte dies nicht durchgehend, aber in der Mehrzahl der Fälle dargestellt werden. Nach Stimulation mit den rekombinanten Proteinen unterschieden sich die Tiergruppen bei beiden Tests nur vereinzelt signifikant, beim Vergleich altersgleicher Tiere zeigten teilweise sogar die PBMC der Kontrolltiere die höhere IFN- γ -Freisetzung (Tab. 24).

Tab. 24: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

		rekombinantes MAP-Antigen				
		JPPD	APPD	MAP 1365	MAP 0268c	MAP 3651c
		4 μ g/ml	125 I.E.	5 μ g/ml	5 μ g/ml	5 μ g/ml
		BT				BLAg
				5 μ g/ml	5 μ g/ml	5 μ g/ml
Testung zwischen Tieren eines BT	1	,005	,032	,020	,042	,065
	2	,000	,000	,530	,730	,969
	3	,000	,000	,788	,969	1,000
	4	,000	,003	,987	,497	,595
	5	,000	,000	,677	,880	,426
	6	,000	,000	,004	,099	,001
	7	,000	,000	,000	,016	,002
	8	,004	,335	,637	,693	,446
	9	,000	,000	,606	1,000	,091
	10	,001	,073	,902	,902	,259
	11	,001	,181	,945	1,000	,628
	12	,008	,022	,836	,836	,945
	13	,001	,073	,759	,731	,628
Testung zwischen altersgleichen Tieren	1/2	,416	,084	,112	,079	<u>,000</u>
	2/3	,000	,000	,000	,000	,000
	3/4	,000	,011	<u>,001</u>	<u>,000</u>	<u>,000</u>
	4/5	,000	,108	,084	,254	,092
	5/6	,000	,000	,002	,001	,000
	6/7	,000	,000	,677	,426	,254
	7/8	,000	,002	,006	,186	,010
	8/9	,000	,024	,324	,324	,209
	9/10	,001	,002	,004	,902	,002
	10/11	,001	,535	,053	,318	,710
	11/12	,001	,366	,628	,295	,445
	12/13	,001	,051	1,000	,945	1,000

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Vergleich man statt der durch die S/P-Ratios festgehaltenen, absoluten Werte die durch den SI repräsentierte relative IFN- γ -Freisetzung, die die Relation zur Mediumkontrolle widerspiegelt, so zeigte sich ein sehr ähnliches Bild (Tab. 25).

Tab. 25: p-Werte beim Vergleich der SI-Werte für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

	BT	JPPD 4 μ g/ml	APPD 125 I.E.	rekombinantes MAP-Antigen			
				MAP 1365 5 μ g/ml	MAP 0268c 5 μ g/ml	MAP 3651c 5 μ g/ml	BLAg 5 μ g/ml
Testung zwischen Tieren eines BT	1	,715	,414	,604	,715	,977	
	2	,000	,001	,995	1,000	,501	
	3	,000	,000	,908	,913	,668	
	4	,000	,000	,545	,243	,641	
	5	,000	,000	,144	,238	,042	
	6	,000	,000	,420	,769	,108	
	7	,000	,000	,040	,426	,066	
	8	,000	,151	,976	,796	,104	,968
	9	,000	,001	,299	,135	,977	,179
	10	,001	,301	,805	,902	,535	,805
	11	,001	,138	,976	,386	,558	,628
	12	,001	,001	,423	,421	,366	,469
	13	,001	,020	,181	,051	,628	,219
Testung zwischen altersgleichen Tieren	1/2	,016	,001	,002	,001	,002	
	2/3	,000	,000	,408	,126	,465	
	3/4	,000	,000	,437	,730	,944	
	4/5	,000	,000	,650	,238	,734	
	5/6	,000	,000	,002	,005	,001	
	6/7	,000	,000	,887	,443	,409	
	7/8	,000	,000	,017	,533	,001	
	8/9	,000	,106	,431	,501	,421	,360
	9/10	,001	,051	,902	,008	,456	,024
	10/11	,001	,004	,259	,073	,259	,644
	11/12	,001	,009	,001	,181	,110	,387
	12/13	,001	,001	,101	,046	,295	,867

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die SI-Werte der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.3.5 Einfluss IL-10 blockierender Antikörper auf die IFN- γ -Freisetzung restimulierter PBMC

Um zu prüfen, ob die Anwesenheit von IL-10 blockierenden Antikörpern (IL-10-Block) während der Stimulation mit JPPD Einfluss auf die IFN- γ -Freisetzung hat, wurden die

verschiedenen Stimulationsansätze mit JPPD statistisch gegeneinander getestet. Die Verwendung des IL-10-Block bei JPPD-stimulierten PBMC von Kontrolltieren zeigte im Vergleich zur alleinigen Verwendung von JPPD keinen Effekt (Tab. 26A). Bei PBMC von Versuchstieren ließ sich die IFN- γ -Freisetzung jedoch durch den IL-10-Block fast durchgehend signifikant steigern (Tab. 26B). Der eingesetzte Kontrollantikörper hingegen hatte bei den Versuchstieren keinen Einfluss auf die Höhe der IFN- γ -Freisetzung. Bei den Kontrolltieren war die Freisetzung von IFN- γ unter Zugabe des Kontrollantikörpers in BT 4 und BT 5 signifikant höher (Tab. 26A/B).

Tab. 26A/B: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen mit JPPD. A: Kontrolltiere; B: Versuchstiere. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

Tab. 26A

		BT					
		1	2	3	4	5	6
		(n = 11)	(n = 11)	(n = 16)	(n = 16)	(n = 13)	(n = 3)
Testvariable 1	Testvariable 2						
Kontrolltiere	JPPD	JPPD +	,129	,083	,706	<u>,026</u>	,312
	IL-10-Block						
	JPPD	JPPD +	,064	,175	,274	,004	,250
Kontrolltiere	Kontroll-AK						
	JPPD +	JPPD +	,001	,032	,104	,042	,500
	Kontroll-AK	IL-10-Block					

Tab. 26B

		BT					
		1	2	3	4	5	6
		(n = 20)	(n = 19)	(n = 26)	(n = 17)	(n = 19)	(n = 6)
Testvariable 1	Testvariable 2						
Versuchstiere	JPPD	JPPD +	,123	,000	,000	,000	,036
	IL-10-Block						
	JPPD	JPPD +	,181	,595	,727	,181	1,000
Versuchstiere	Kontroll-AK						
	JPPD +	JPPD +	,002	,000	,000	,000	,016
	Kontroll-AK	IL-10-Block					

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Testvariable 2 signifikant größer als die der Testvariable 1. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Die PBMC der Kontrolltiere zeigten bei keinem der drei Stimulationsansätze eine signifikant höhere IFN- γ -Freisetzung als in der Mediumkontrolle (Tab. 27). Die PBMC der Versuchstiere hingegen setzten in allen drei Stimulationsansätzen ab BT 2 signifikant mehr IFN- γ frei als in der Mediumkontrolle.

Tab. 27: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen mit JPPD und der Mediumkontrolle. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

BT	JPPD (4 μ g/ml)		
	ohne Antikörper	+ IL-10-Block (2,5 μ g/ml)	+ Kontrollantikörper (2,5 μ g/ml)
Kontrolltiere	1	<u>,000</u>	<u>,001</u>
	2	,413	,365
	3	<u>,012</u>	<u>,029</u>
	4	,454	<u>,005</u>
	5	,839	,244
	6	,787	,250
Versuchstiere	1	<u>,001</u>	<u>,000</u>
	2	,000	,000
	3	,000	,000
	4	,000	,000
	5	,000	,000
	6	,000	,031

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Stimulationsansätze signifikant höher als die der Mediumkontrolle. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.3.6 Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren

Die Stimulationsansätze, die gegenüber der Mediumkontrolle eine signifikant erhöhte Freisetzung von IFN- γ zeigten, sollten auch auf Einzeltierebene auf ihre Eignung für diagnostische Zwecke getestet werden. Dafür wurde für die betreffende Größe aus der Gesamtheit der von Kontrolltieren stammenden Ergebnisse ein Grenzwert festgelegt. Dieser entspricht dem Mittelwert der Ergebnisse aller Kontrolltiere, zu dem die dreifache Standardabweichung dieser Ergebnisse addiert wurde. Mit Hilfe des Grenzwertes wurden für die jeweiligen BT separat die Raten der richtig-negativ und richtig-positiv bestimmten Fälle bestimmt. Diese verhielten sich bei den verschiedenen Stimulationsansätzen unterschiedlich (Tab. 28). Beide Raten waren am höchsten, wenn der Testung der SI von Stimulationsansätzen mit JPPD bzw. von JPPD unter Zugabe von IL-10-Block zugrunde gelegt wurde. Damit wurden über den gesamten Versuchsverlauf eine Richtig-Negativ-Rate von 100 % und ab BT 2 Richtig-Positiv-Raten von 68,4 bis 100 % erreicht. Die entsprechenden Stimulationsansätze mit APPD zeigten nicht durchgehend eine Richtig-Negativ-Rate von 100 % und wesentlich geringere Richtig-Positiv-Raten (0,0 bis 73,7 %). Die Stimulation mit MAP 3651c führte ebenfalls in Einzelfällen zu falsch-positiven Ergebnissen. Die

Richtig-Positiv-Raten waren bei Stimulation mit MAP 3651c wiederum wesentlich geringer als die bei APPD-Stimulation und rangierten nur noch von 0,0 bis 26,9 %.

Tab. 28: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten des IFN- γ -Tests bei Auswertung auf Grundlage von S/P-Ratios bzw. SI-Werten verschiedener Stimulationsansätze. Dargestellt sind die berechneten Grenzwerte (GW) sowie die Richtig-Negativ-Rate und die Richtig-Positiv-Rate bei Anwendung des jeweiligen Parameters in der Einzeltiertestung in Abhängigkeit vom BT. Ergebnisse wurden dafür als positiv angesehen, wenn sie den GW überschritten. Dieser entspricht dem Mittelwert der Gesamtergebnisse der Kontrolltiere addiert mit der dreifachen Standardabweichung.

		S/P-Ratio				SI					
		Stimulationsansatz									
		JPPD	JPPD +	APPD	MAP	JPPD	JPPD +	APPD	MAP		
BT		IL-10-Block			3651c		IL-10-Block			3651c	
GW	/	0,168	0,192	0,159	0,147	1,217	1,269	1,318	1,508		
Richtig-Negativ-Rate [%]	1	81,3	72,7	81,3	93,75	100	100	100	93,75		
	2	100	100	100	100	100	100	100	100		
	3	100	100	100	100	100	100	100	100		
	4	100	100	100	100	100	100	100	100		
	5	100	100	100	92,3	100	100	92,3	100		
	6	100	100	100	100	100	100	100	100		
	7	100		100	100	100		100	100		
	8	100		100	100	100		100	100		
	9	100		100	100	100		100	100		
	10	100		100	100	100		57,1	100		
	11	100		100	100	100		100	100		
	12	100		100	100	100		100	100		
	13	100		100	100	100		100	100		
Richtig-Positiv-Rate [%]	1	26,9	35,0	26,9	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0		
	2	68,4	63,2	34,6	0,0	68,4	84,2	61,5	0,0		
	3	73,1	80,8	26,9	0,0	96,2	92,3	65,4	7,7		
	4	72,2	76,5	52,6	10,5	100	100	68,4	15,8		
	5	89,5	89,5	73,7	21,1	100	100	73,7	21,1		
	6	94,7	50,0	31,6	5,3	94,7	83,3	52,6	5,3		
	7	92,3		7,7	23,1	100		23,1	23,1		
	8	46,2		15,4	0,0	76,9		23,1	0,0		
	9	100		14,3	14,3	100		71,4	14,3		
	10	57,1		0,0	0,0	100		28,6	14,3		
	11	83,3		0,0	0,0	100		33,3	0,0		
	12	83,3		16,7	0,0	100		0,0	0,0		
	13	66,7		0,0	0,0	83,3		0,0	0,0		

5.4 Ergebnisse des IL-10-Tests

Mittels IL-10-Test wurde die spontane Freisetzung von IL-10 durch unstimulierte PBMC bzw. die nach Restimulation der PBMC messbare IL-10-Freisetzung untersucht. Die aus den Rohdaten berechneten S/P-Ratios bzw. SI-Werte wurden zur sprachlichen Vereinfachung im Fließtext auch als „absolute IL-10-Freisetzung“ bzw. „relative IL-10-Freisetzung“ bezeichnet.

5.4.1 Untersuchung der Varianz der mit dem IL-10-ELISA ermittelten Daten

Mittels Varianzanalyse wurden die verfahrensbedingten Einflüsse des IL-10-ELISA auf die Varianz der internen Kontrolle berechnet (Tab. 29). Die Gesamtvarianz der S/P-Ratios der internen Kontrolle im IL-10-ELISA betrug 0,006. Den größten Anteil an der Gesamtvarianz machten dabei die Tagesansätze mit einem Anteil von 63,9 % aus. Es entfielen weitere 23,5 % auf die Einzelplatten eines Tagesansatzes und 12,5 % auf die technischen Replikate einer Probe.

Tab. 29: Einflüsse der Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der S/P-Ratios der internen Kontrolle im IL-10-ELISA. In den Test gingen 6 Tagesansätze auf insgesamt 40 Einzelplatten mit je 2 technischen Replikaten ein (80 Einzelwerte).

Einflussgröße	Varianzanteil der Einflussgröße	Anteil an der Gesamtvarianz [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Tagesansätze	,004	63,9	,061	14,68
Einzelplatten eines Tagesansatzes	,001	23,5	,037	8,90
Technische Replikate einer Probe	,001	12,5	,027	6,47
Alle Einflussgrößen zusammengefasst	,006	100	,079	19,07

5.4.2 IL-10-Freisetzung in unstimulierten PBMC

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Versuchstieren war die Freisetzung von IL-10 bei der ersten Durchführung des ELISA im BT 2 am höchsten und zeigte danach eine abfallende Tendenz (Abb. 10). Die Werte des BT 2 waren bei beiden Tiergruppen signifikant höher als die des BT 4, BT 10 und BT 12 (Tab. 30). Insgesamt war die IL-10-Freisetzung weitgehend unbeeinflusst vom Infektionsstatus der Tiere. Lediglich in BT 4 zeigte sie sich bei den Versuchstieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Abb. 10).

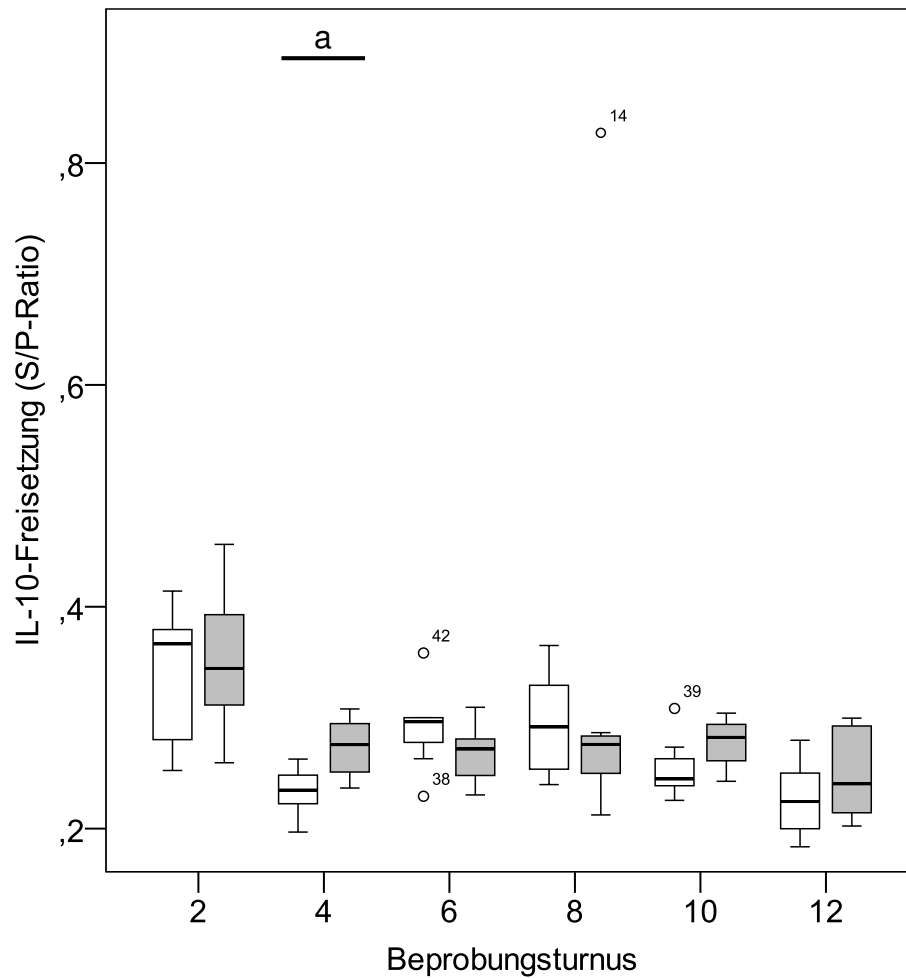


Abb. 10: IL-10-Freisetzung der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der Mediumkontrolle nach 64 h Inkubation in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). □ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den S/P-Ratios der Kontroll- und der Versuchstiere.

Tab. 30: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios der Mediumkontrolle für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen BT. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

IL-10 in Mediumkontrolle		exakte Signifikanz zweiseitig	
Testvariable 1	Testvariable 2	Kontrolltiere	Versuchstiere
BT 2	BT 4	,016	,047
BT 2	BT 6	,156	,078
BT 2	BT 8	,297	,375
BT 2	BT 10	,016	,016
BT 2	BT 12	,031	,031
BT 4	BT 6	,016	,938
BT 4	BT 8	,078	1,000
BT 4	BT 10	,375	,813
BT 4	BT 12	,688	,219
BT 6	BT 8	,938	,469
BT 6	BT 10	,156	,469
BT 6	BT 12	,016	,219
BT 8	BT 10	,156	,688
BT 8	BT 12	,047	,313
BT 10	BT 12	,219	,156

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Es sind jeweils die S/P-Ratios der Testvariable 1 signifikant höher als die der Testvariable 2.

5.4.3 Induzierbarkeit der IL-10-Freisetzung durch LPS

Um zu dokumentieren, dass die für den IL-10-Test kultivierten PBMC in der Lage sind, auf geeignete Stimulation mit einer erhöhten IL-10-Freisetzung zu reagieren, wurde die Positivkontrolle mit der Mediumkontrolle verglichen. Nach Stimulation mit LPS zeigten die PBMC von Kontroll- sowie von Versuchstieren eine höhere IL-10-Freisetzung als in der Mediumkontrolle. Signifikante Unterschiede gegenüber der Mediumkontrolle zeigten sich jedoch nur in einzelnen BT (Abb. 11). Bei Versuchstieren kam es durch LPS zu einer stärkeren Induktion von IL-10 als bei Kontrolltieren. Dieser Unterschied war in BT 4 statistisch signifikant (Tab. 31).

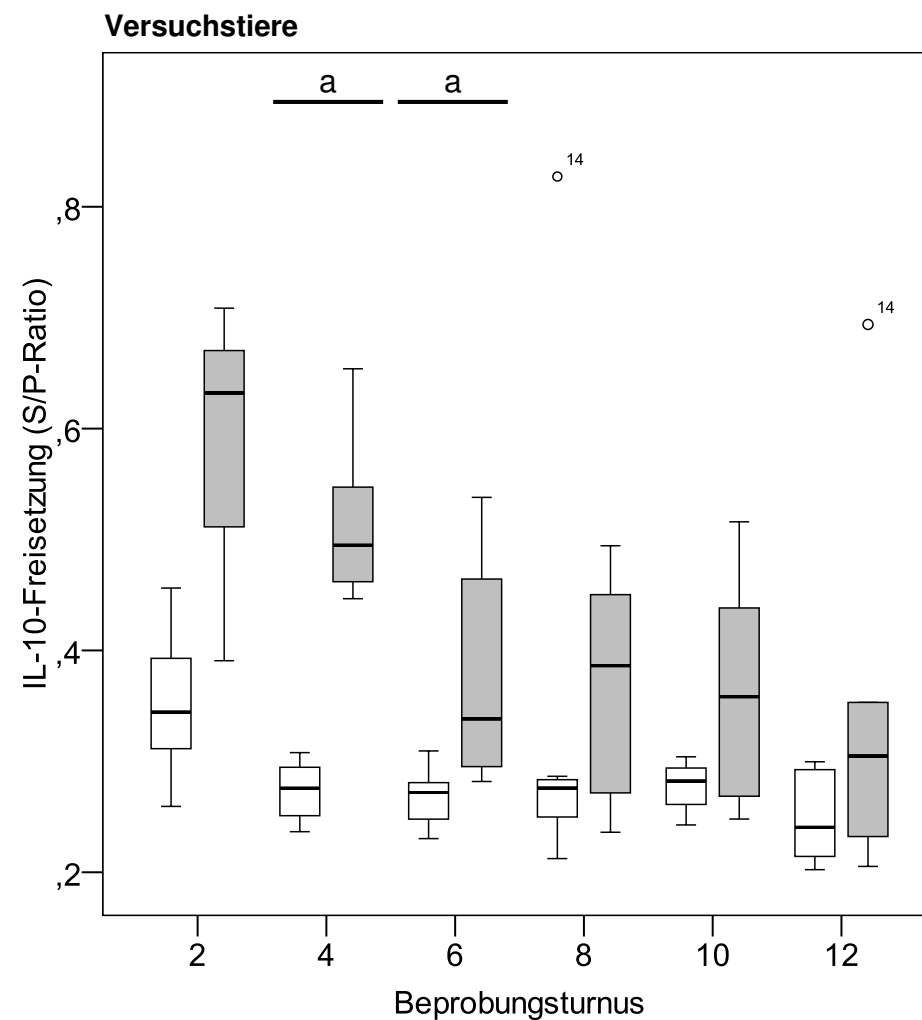
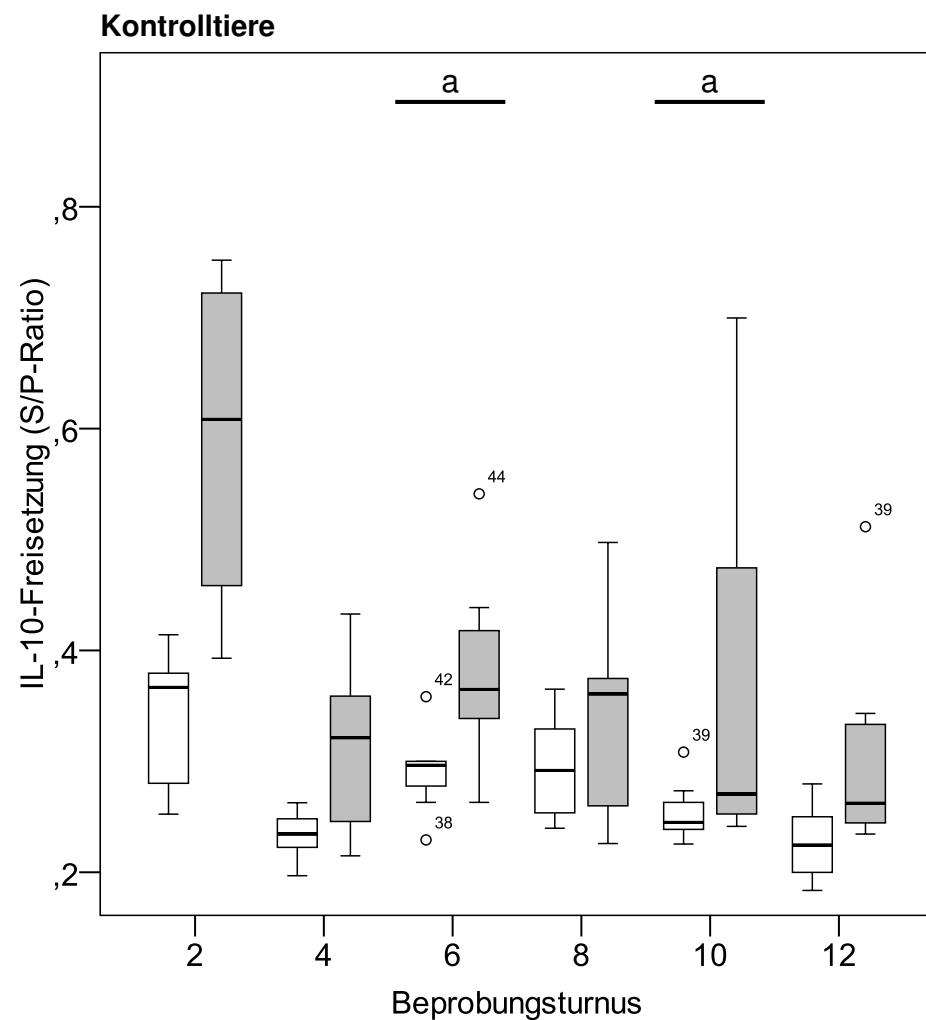


Abb. 11: IL-10-Freisetzung von der Mediumkontrolle und von LPS-stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der Mediumkontrolle und der für 64 h mit LPS (5 µg/ml) stimulierten PBMC von Kontroll- und von Versuchstieren in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). □ = Mediumkontrolle; ■ = LPS-Stimulation; (a) = Signifikanter Unterschied zwischen den dargestellten Stimulationsansätzen.

Tab. 31: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 nach LPS-Stimulation (5 µg/ml) zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

BT 2	BT 4	BT 6	BT 8	BT 10	BT 12
,857	,001	,805	,456	,620	1,000

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die S/P-Ratios der Versuchstiere sind dabei signifikant höher als die der Kontrolltiere.

5.4.4 IL-10-Freisetzung in restimulierten PBMC

Die Freisetzung von IL-10 ließ sich weder bei den Kontroll- noch bei den Versuchstieren durch die eingesetzten Antigene durchgehend steigern (Tab. 32). Im Vergleich mit der Mediumkontrolle erreichte die Stimulation mit APPD in der Hälfte der BT signifikant höhere Werte. Nach Stimulation mit JPPD bzw. den rekombinanten MAP-Antigenen MAP 1365 und MAP 0268c wurde vereinzelt eine gegenüber der Mediumkontrolle signifikant erhöhte IL-10-Freisetzung festgestellt. Nach Stimulation mit den rekombinanten Proteinen MAP 3651c und BLAg war die Freisetzung von IL-10 zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als in der Mediumkontrolle.

Tab. 32: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 zwischen den Stimulationsansätzen und der Mediumkontrolle. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		rekombinantes MAP Antigen ab BT 8					
		JPPD 4 µg/ml	APPD 125 I.E.	MAP 1365 5 µg/ml	MAP 0268c 5 µg/ml	MAP 3651c 5 µg/ml	BLAg 5 µg/ml
Kontrolltiere	BT 2	,844	,016				
	4	,109	,219				
	6	,078	,016				
	8	,469	,938	,469	,031	,688	,016
	10	,031	,250	,016	,109	,813	,016
	12	,156	,016	,016	,078	,219	,375
Versuchstiere	2	,219	,016				
	4	,016	,016				
	6	,016	,031				
	8	,297	,578	,438	,578	,844	,297
	10	,938	,500	,078	,297	,813	,016
	12	,156	,063	,031	,031	,156	,813

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Stimulationsansätze signifikant höher als die der Mediumkontrolle. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Wie in der Mediumkontrolle lag auch nach Stimulation mit JPPD bzw. APPD eine negative Korrelation zwischen fortschreitender Versuchsdauer und Höhe der IL-10-Freisetzung vor (Abb. 12). Die Unterschiede zwischen den S/P-Ratios im BT 2 und den S/P-Ratios in nachfolgenden BT waren bei Kontroll- sowie Versuchstieren teilweise statistisch signifikant (Tab. 33). Während sich die signifikanten Unterschiede bei den Versuchstieren am deutlichsten nach JPPD-Stimulation zeigten, waren sie bei den Kontrolltieren insgesamt geringer ausgeprägt und nach APPD-Stimulation häufiger zu finden als nach JPPD-Stimulation. Die Stimulationsansätze mit den rekombinanten MAP-Proteinen wurden ab BT 8 eingesetzt und zeigten in den drei untersuchten BT keine mit dem Infektionsverlauf in Zusammenhang zu bringenden Entwicklungen.

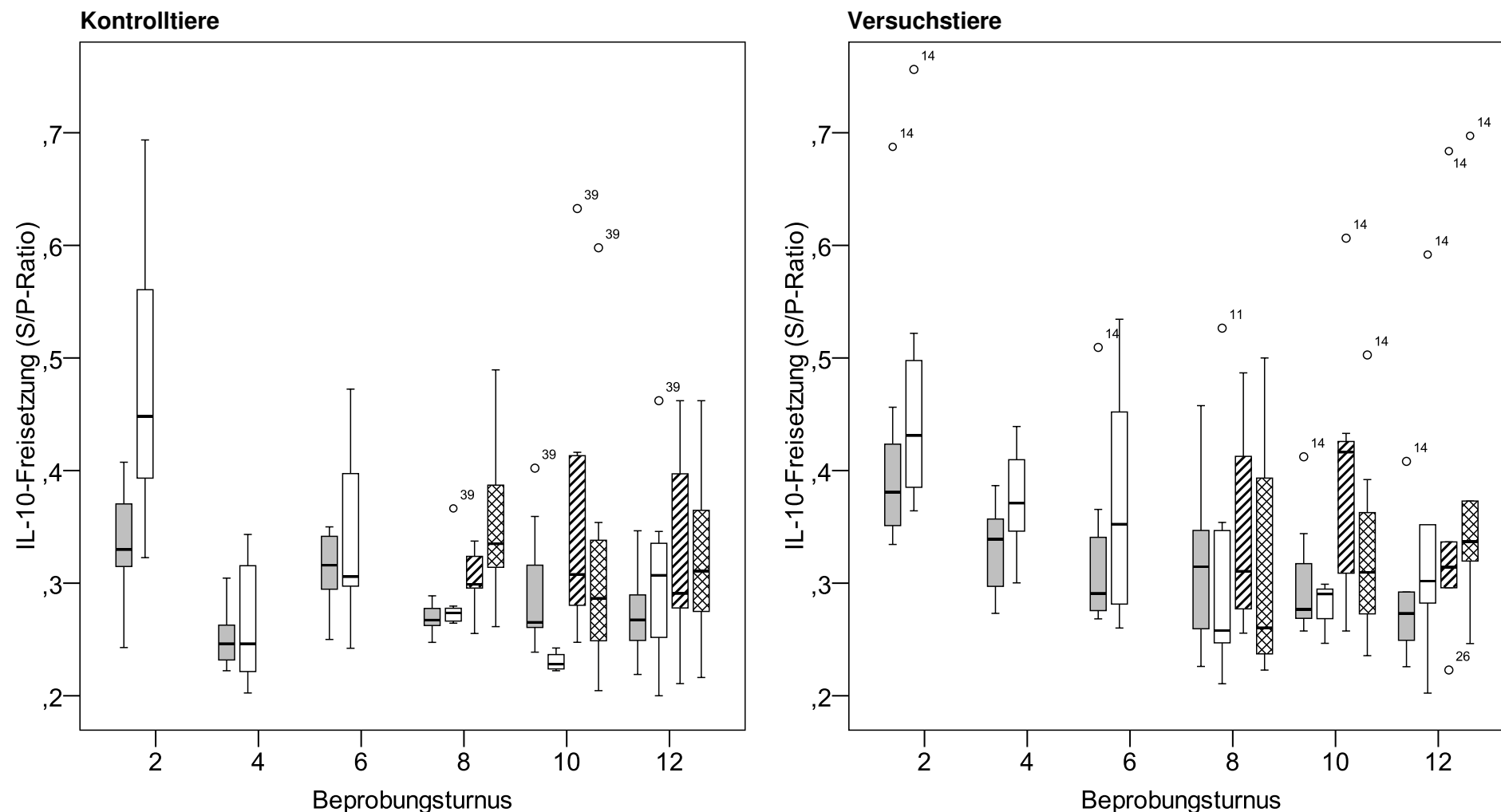


Abb. 12: IL-10-Freisetzung der durch JPPD, APPD, MAP 1365, bzw. MAP 0268c stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 64 h mit JPPD (4 µg/ml), APPD (125 I.E./ml), MAP 1365 (5 µg/ml) bzw. MAP 0268c (5 µg/ml) stimulierten PBMC von Kontroll- und von Versuchstieren in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). MAP 1365 und MAP 0268c wurden lediglich in BT 8 bis BT 12 eingesetzt.

■ = JPPD; □ = APPD; ▨ = MAP 1365; ▩ = MAP 0268c.

Tab. 33: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 von mit JPPD bzw. mit APPD stimulierten PBMC zwischen verschiedenen BT. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

IL-10 in stimulierten PBMC		exakte Signifikanz zweiseitig		
Testvariable 1	Testvariable 2	Kontrolltiere	Versuchstiere	
JPPD (4 µg/ml)	BT 2	BT 4	,031	,016
	BT 2	BT 6	,375	,016
	BT 2	BT 8	,047	,109
	BT 2	BT 10	,375	,016
	BT 2	BT 12	,156	,031
	BT 4	BT 6	,047	1,000
	BT 4	BT 8	,297	,578
	BT 4	BT 10	,219	,109
	BT 4	BT 12	,469	,156
	BT 6	BT 8	,047	,688
	BT 6	BT 10	,938	,375
	BT 6	BT 12	,156	,219
	BT 8	BT 10	,578	1,000
	BT 8	BT 12	,938	,844
	BT 10	BT 12	,297	,156
APPD (125 I.E./ml)	BT 2	BT 4	,016	,109
	BT 2	BT 6	,078	,078
	BT 2	BT 8	,016	,078
	BT 2	BT 10	,125	,250
	BT 2	BT 12	,031	,031
	BT 4	BT 6	,109	,688
	BT 4	BT 8	,375	,219
	BT 4	BT 10	,875	,250
	BT 4	BT 12	,156	,688
	BT 6	BT 8	,078	,375
	BT 6	BT 10	,125	,250
	BT 6	BT 12	,375	,438
	BT 8	BT 10	,125	1,000
	BT 8	BT 12	,469	,563
	BT 10	BT 12	,625	,750

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Es sind jeweils die S/P-Ratios der Testvariable 1 signifikant höher als die der Testvariable 2.

Signifikante Unterschiede in der gemessenen IL-10-Freisetzung konnten zwischen verschiedenen Stimulationsansätze lediglich in einzelnen BT festgestellt werden (Tab. 62 im Anhang).

Wenn man die absolute Freisetzung von IL-10 vergleicht, unterschieden sich die Kontroll- und Versuchstiere lediglich in BT 2 und BT 4 signifikant (Tab. 34). Hier waren die S/P-Ratios der Versuchstiere nach Stimulation mit JPPD bzw. APPD signifikant höher als die der Kontrolltiere. Legte man stattdessen die relative Freisetzung von IL-10 dem Vergleich zugrunde, so zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren (Tab. 34).

Tab. 34: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios bzw. der SI-Werte zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

	BT	JPPD 4 µg/ml	APPD 125 I.E.	rekombinantes MAP Antigen			
				MAP 1365 5 µg/ml	MAP 0268c 5 µg/ml	MAP 3651c 5 µg/ml	BLAg 5 µg/ml
S/P-Ratio	2	,022	,887				
	4	,002	,007				
	6	,805	,710				
	8	,318	,535	,710	,259	,456	,871
	10	,456	,057	,456	,620	,383	,710
	12	,628	,836	,731	,445	,366	,836
SI	2	,259	,245				
	4	,165	,103				
	6	,209	,195				
	8	,128	,456	,383	,646	,515	,555
	10	,259	1,000	,902	,710	,552	,552
	12	,836	,916	,922	,753	,921	,534

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Es sind jeweils die S/P-Ratios der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere.

5.4.5 Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren

Wendete man die in den Stimulationsansätzen mit JPPD, APPD, MAP 1365 und MAP 0268c gemessene IL-10-Antwort zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren auf Einzeltierebene (wie in 4.8 beschrieben) an, ergaben sich Richtig-Negativ-Raten, die nur in einzelnen BT von 100 % abwichen, aber sehr geringe Richtig-Positiv-Raten (Tab. 35). Es wurden in der Mehrzahl der BT überhaupt keine und maximal 30 % der Versuchstiere als positiv erkannt. Die meisten richtig-positiven Ergebnisse gab es bei Verwendung der S/P-Ratios der JPPD-Stimulation als Rechengrundlage. Hier wurden dennoch in der Hälfte der untersuchten BT überhaupt keine Versuchstiere als richtig-positiv erkannt.

Tab. 35: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten des IL-10-Tests bei Auswertung auf Grundlage von S/P-Ratios bzw. SI-Werten verschiedener Stimulationsansätze.

Dargestellt sind die berechneten Grenzwerte (GW) sowie die Richtig-Negativ-Rate und die Richtig-Positiv-Rate bei Anwendung des jeweiligen Parameters in der Einzeltiertestung in Abhängigkeit vom BT. Ergebnisse wurden dafür als positiv angesehen, wenn sie den GW überschritten. Dieser entspricht dem Mittelwert der Gesamtergebnisse der Kontrolltiere addiert mit der dreifachen Standardabweichung.

		S/P-Ratio				SI			
		Stimulationsansatz							
		JPPD	APPD	MAP 1365	MAP 0268c	JPPD	APPD	MAP 1365	MAP 0268c
BT									
GW	/	0,440	0,659	0,615	0,622	1,646	2,042	2,441	2,371
Richtig-Negativ- Rate [%]	2	100	88,9			100	100		
	4	100	100			100	100		
	6	100	100			100	100		
	8	100	100	100	100	100	100	100	100
	10	100	100	85,7	100	100	100	100	100
	12	100	100	100	100	71,4	85,7	100	100
Richtig-Positiv- Rate [%]	2	30	10			10	10		
	4	0	0			0	0		
	6	14,3	0			14,3	0		
	8	14,3	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	16,7	16,7	0	0	0	16,7

5.5 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Mit Hilfe der RT real-time PCR wurden die zytokin-spezifischen Gehalte an mRNA bei unstimulierten und antigen-stimulierten PBMC im Verlaufe des Versuches bestimmt. Zur sprachlichen Vereinfachung werden die erhobenen Δ CT-Werte eines Stimulationsansatzes im Folgenden im Fließtext auch als „absolute Genexpression“ bezeichnet. Davon abgesetzt zu betrachten ist die aus den Δ CT-Werten der Mediumkontrolle und des jeweiligen Stimulationsansatzes berechnete *Ratio*, welches unter dem Begriff „relative Genexpression“ beschrieben wird.

5.5.1 Untersuchung der Varianz der in der real-time PCR ermittelten Daten und der Robustheit der Genexpression von GAPDH

Es wurden die verfahrensbedingten Einflüsse während der Durchführung der real-time PCR auf die CT-Werte der internen Kontrolle analysiert (Tab. 36). Die Gesamtvarianz dieser Werte betrug 0,168. Den größten Anteil an der Gesamtvarianz hatten mit 90,7 % die technischen Replikate einer Probe. Auf die Tagesansätze entfielen 7,5 % der Gesamtvarianz und auf die Platten eines Tagesansatzes die restlichen 1,8 %.

Tab. 36: Einflüsse der Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der CT-Werte der internen Kontrolle in der real-time PCR. In den Test gingen 232 Einzelwerte von 29 Tagesansätzen auf insgesamt 116 Einzelplatten mit je 2 technischen Replikaten ein.

Einflussgröße	Varianzanteil der Einflussgröße	Anteil an der Gesamtvarianz [%]	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Tagesansätze	,013	7,5	,112	,47
Einzelplatten eines Tagesansatzes	,003	1,8	,055	,23
Technische Replikate einer Probe	,152	90,7	,390	1,65
Alle Einflussgrößen zusammengefasst	,168	100	,409	1,74

Um die Robustheit der Genexpression von GAPDH gegenüber den Versuchsbedingungen zu überprüfen, wurden die CT-Werte für GAPDH auf verschiedenen Untersuchungsebenen gegeneinander getestet. Dabei zeigten sich in der Genexpression von GAPDH nach Stimulation mit JPPD bzw. APPD lediglich in Einzelfällen signifikante Unterschiede zur Mediumkontrolle (Tab. 37A). Nach 24-stündiger Stimulation mit ConA hingegen kam es sowohl bei Kontroll- als auch bei

Versuchstieren im Vergleich mit der Mediumkontrolle zu einer fast durchgehend signifikant höheren Genexpression von GAPDH, die sich in niedrigeren CT-Werten zeigte. Die 24-stündige Stimulation mit LPS induzierte nur bei den Kontrolltieren fast durchgehend eine signifikant erhöhte Expression von GAPDH; bei den Versuchstieren war dies nie der Fall.

Nach einstündiger Stimulation wurden ungeachtet der Art des Stimulationsansatzes durchweg höhere CT-Werte für GAPDH gemessen als nach der Stimulation für 24 Stunden (nicht dargestellt). Die Genexpression von GAPDH war nach einstündiger Stimulation allerdings nicht in jedem BT statistisch signifikant niedriger (Tab. 37B). Dies traf sowohl auf Kontroll- als auch auf Versuchstiere zu, die sich untereinander in den CT-Werten für GAPDH nur in BT 5 signifikant unterschieden (Tab. 38).

Tab. 37A/B: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen Mediumkontrollen und Stimulationsansätzen (A) und zwischen der Stimulation für 1 h und der für 24 h (B). Stimuliert wurde mit JPPD (4 µg/ml), APPD (125 I.E./ml), ConA (10 µg/ml) bzw. LPS (1 µg/ml). Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

Tab. 37A

	BT	1 h Stimulation				24 h Stimulation			
		JPPD	APPD	ConA	LPS	JPPD	APPD	ConA	LPS
Kontrolltiere	3	,047	,813	,109	,031	,813	,375	,016	,047
	5	,375	,016	,813	,297	,469	,109	,016	,031
	7	,469	,688	,938	,031	1,000	,219	,016	,031
	9	,469	,156	,563	,156	,563	,438	,031	,844
	11	,047	1,000	,219	,688	,469	,578	,016	,031
	13	,313	1,000	,313	,844	,156	,047	,031	,016
Versuchstiere	3	,688	,578	,438	,844	,031	,156	,016	,109
	5	,375	,688	,688	,688	,219	,016	,016	,156
	7	,375	,813	,219	,813	,578	,578	,016	,156
	9	,469	,813	,078	1,000	,813	1,000	,219	,219
	11	,438	,563	1,000	,563	,438	,438	,031	,438
	13	1,000	,813	,625	1,000	,438	1,000	,063	,188

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die CT-Werte der Stimulationsansätze signifikant höher als die der Mediumkontrolle. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 37B

		Stimulationsansatz				
	BT	Mediumkontrolle	JPPD	APPD	ConA	LPS
Kontrolltiere	3	,469	,047	,078	,016	,016
	5	,109	,031	,109	,016	,016
	7	,297	,688	,938	,016	,016
	9	,031	,063	,063	,063	,125
	11	,375	,016	,688	,031	,094
	13	,156	,031	,031	,063	,031
Versuchstiere	3	,016	,016	,016	,031	,031
	5	,016	,016	,016	,016	,016
	7	,078	,031	,078	,016	,031
	9	,047	,047	,031	,063	,109
	11	,094	,094	,156	,031	,031
	13	,125	,063	,125	,063	,063

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die CT-Werte sind jeweils nach einstündiger Stimulation signifikant höher als nach 24-stündiger Stimulation.

Tab. 38: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

		Stimulationsansatz				
Stimulation	BT	Medium-kontrolle	JPPD (4 µg/ml)	APPD (125 I.E./ml)	ConA (10 µg/ml)	LPS (1 µg/ml)
1 h	3	,805	,620	,805	,234	,295
	5	,902	,710	,456	1,000	1,000
	7	,710	,097	,383	,209	,383
	9	,383	,710	,366	,534	,731
	11	,731	,138	,818	,937	,699
	13	,429	,429	,662	,662	,931
24 h	3	,477	,220	,476	,104	,336
	5	,383	,038	,026	1,000	,902
	7	,902	,805	,535	1,000	1,000
	9	,628	1,000	1,000	1,000	,534
	11	,731	,051	,138	,731	,628
	13	,731	,628	1,000	,931	,639

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die CT-Werte sind jeweils bei den Kontrolltieren signifikant höher als bei den Versuchstieren.

Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen BT kamen bei Kontroll- wie Versuchstieren vereinzelt vor (Tab. 39). Bei Kontrolltieren zeigten sich vor allem die CT-Werte bei BT zu Beginn des Infektionsversuches signifikant höher als bei späteren BT. Bei

den Versuchstieren folgten die vereinzelt auftretenden signifikanten Unterschiede keinem bestimmten Muster.

Tab. 39: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen verschiedenen BT. Stimuliert wurde mit JPPD (4 µg/ml), APPD (125 I.E./ml), ConA (10 µg/ml) bzw. LPS (1 µg/ml). Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

	getestete BT	1 h Inkubation					24 h Inkubation				
		MK	JPPD	APPD	ConA	LPS	MK	JPPD	APPD	ConA	LPS
Kontrolltiere	3 vs 5	,578	,813	,156	,219	,297	,156	,469	,578	,156	,156
	3 vs 7	,469	,078	,469	,297	,938	,813	,469	,297	,938	,375
	3 vs 9	,469	,688	,313	,219	<u>,031</u>	,563	,844	,844	1,000	,438
	3 vs 11	<u>,016</u>	,078	<u>,031</u>	,094	,156	<u>,047</u>	,688	,156	<u>,031</u>	,078
	3 vs 13	,063	,094	<u>,031</u>	,156	<u>,031</u>	,156	<u>,016</u>	<u>,047</u>	,094	<u>,016</u>
	5 vs 7	,688	,219	,813	,938	,813	,688	,469	,297	,219	,813
	5 vs 9	,219	,938	,563	,844	,563	,844	,844	,313	,438	,313
	5 vs 11	,078	,297	,438	,688	,438	,375	1,000	,578	,813	,469
	5 vs 13	,094	,219	,438	,688	,219	,469	<u>,016</u>	<u>,031</u>	,219	<u>,016</u>
	7 vs 9	,219	<u>,016</u>	,844	,688	,219	,844	1,000	,438	,688	,438
	7 vs 11	,109	,297	,219	,219	,156	,297	,813	,078	,297	,578
	7 vs 13	,094	1,000	,094	,156	<u>,031</u>	,375	,078	<u>,031</u>	,094	<u>,031</u>
	9 vs 11	<u>,047</u>	,156	,188	,063	,313	,844	,563	,438	,219	,156
	9 vs 13	<u>,031</u>	,156	,063	,063	,625	,688	,094	,063	,188	<u>,031</u>
	11 vs 13	,688	,438	1,000	,563	1,000	,938	<u>,016</u>	<u>,031</u>	,438	,078
Versuchstiere	3 vs 5	,813	,578	,156	1,000	,438	,156	,688	,578	,219	1,000
	3 vs 7	,813	,688	,688	,156	1,000	,578	,078	,375	<u>,016</u>	,688
	3 vs 9	,938	,813	,938	,063	,438	,375	,156	,688	<u>,031</u>	,297
	3 vs 11	,438	,063	,063	,438	,438	,313	,844	1,000	1,000	,563
	3 vs 13	1,000	,625	,313	,625	,313	,219	,688	1,000	,813	,313
	5 vs 7	,938	,297	,156	<u>,047</u>	1,000	,078	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,047</u>	,844
	5 vs 9	,813	,813	,297	,219	,219	<u>,047</u>	<u>,016</u>	,063	,094	,109
	5 vs 11	,563	,156	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,438	,688	,844	,688	,844	,156
	5 vs 13	1,000	,438	,625	,313	,625	,563	,688	1,000	,313	,063
	7 vs 9	,938	,688	,813	,688	,938	,688	,469	,844	,563	,156
	7 vs 11	,563	,156	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,438	,438	,094	,156	<u>,031</u>	,313
	7 vs 13	,625	,813	,438	,063	,813	<u>,031</u>	,156	,313	,125	,063
	9 vs 11	,063	,063	,063	,063	,844	<u>,031</u>	,063	,188	,125	<u>,031</u>
	9 vs 13	,625	,438	,313	,188	,625	,219	<u>,031</u>	,125	,250	,063
	11 vs 13	1,000	,625	1,000	1,000	,813	,844	,563	,313	,438	,125

MK = Mediumkontrolle

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die CT-Werte des später liegenden BT signifikant höher als die des früher liegenden BT. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.5.2 Genexpression der untersuchten Zytokine in unstimulierten PBMC

Die spontane Genexpression der Zytokine, gemessen am Δ CT-Wert der Mediumkontrolle, unterschied sich nur in Einzelfällen signifikant zwischen den Kontrolltieren und den Versuchstieren (Tab. 40, Abb. 13).

Die nach einstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation gemessene Genexpression der Zytokine war über den Versuchsverlauf hinweg jeweils relativ stabil (Abb. 13). Nur für IL-10 zeigte sich - bei gleichbleibendem Niveau der Δ CT-Werte, die nach einstündiger Inkubation ermittelt wurden - eine abnehmende Tendenz der nach 24 Stunden in den Mediumkontrollen ermittelten Werte über den Versuchszeitraum. Diese Veränderung ist teilweise statistisch signifikant (Tab. 41).

Tab. 40: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

	BT	1 h Inkubation					24 h Inkubation				
		IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
Mediumkontrolle	3	,710	,209	,176	1,000	,902	,781	,559	,333	,600	,246
	5	,383	<u>,017</u>	1,000	,119	,209	,902	,097	,874	,333	,456
	7	,456	,128	,097	,710	1,000	,383	<u>,007</u>	,383	,710	,209
	9	<u>,011</u>	,710	<u>,002</u>	,805	,929	,295	,110	,073	,313	,628
	11	,234	,101	,628	,234	,759	1,000	,101	,807	,138	,234
	13	,052	,792	,792	,329	,268	,429	,662	,429	,052	,792
JPPD (4 μ g/ml)	3	,476	,646	,300	,383	,737	,559	<u>,001</u>	,091	,648	<u>,003</u>
	5	,259	<u>,026</u>	,929	,318	,073	,097	<u>,001</u>	,383	,535	<u>,001</u>
	7	,620	,097	,209	,318	,068	,535	<u>,001</u>	,620	1,000	<u>,026</u>
	9	,073	,902	,053	,456	,209	,234	<u>,002</u>	,101	,080	<u>,001</u>
	11	,836	,628	,073	,295	,945	,101	,014	<u>,022</u>	,806	,181
	13	,082	,247	,247	,662	,247	,429	<u>,009</u>	,537	1,000	<u>,004</u>
APPD (125 I.E./ml)	3	1,000	,165	,318	,318	,318	,332	,077	,274	,402	<u>,003</u>
	5	,165	,053	1,000	,620	<u>,011</u>	,383	<u>,004</u>	,128	,642	<u>,001</u>
	7	,259	,154	<u>,001</u>	,710	,902	,383	<u>,002</u>	,165	,122	<u>,001</u>
	9	,181	,836	<u>,014</u>	,366	,295	,065	<u>,009</u>	<u>,026</u>	,818	,240
	11	,970	,180	<u>,009</u>	,589	,818	,073	<u>,008</u>	<u>,022</u>	<u>,014</u>	,234
	13	,792	,177	<u>,030</u>	1,000	,052	,429	<u>,009</u>	,082	1,000	<u>,004</u>

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

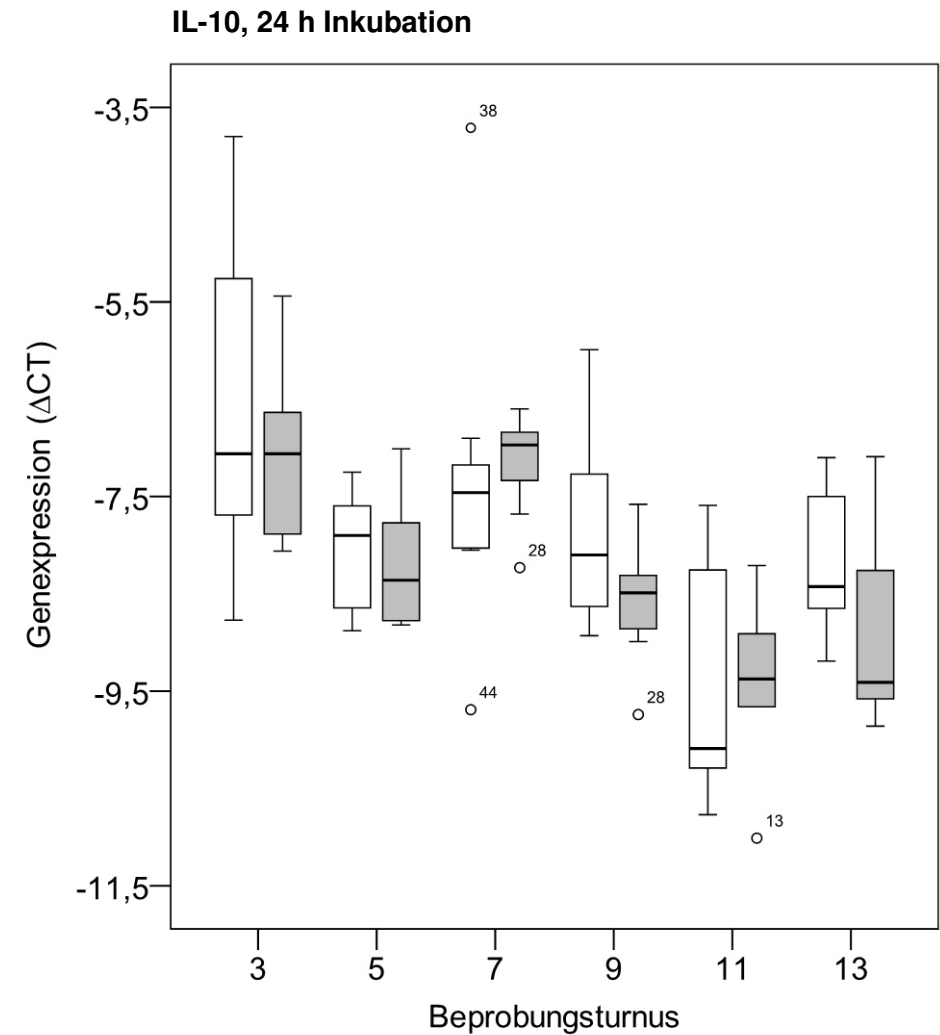
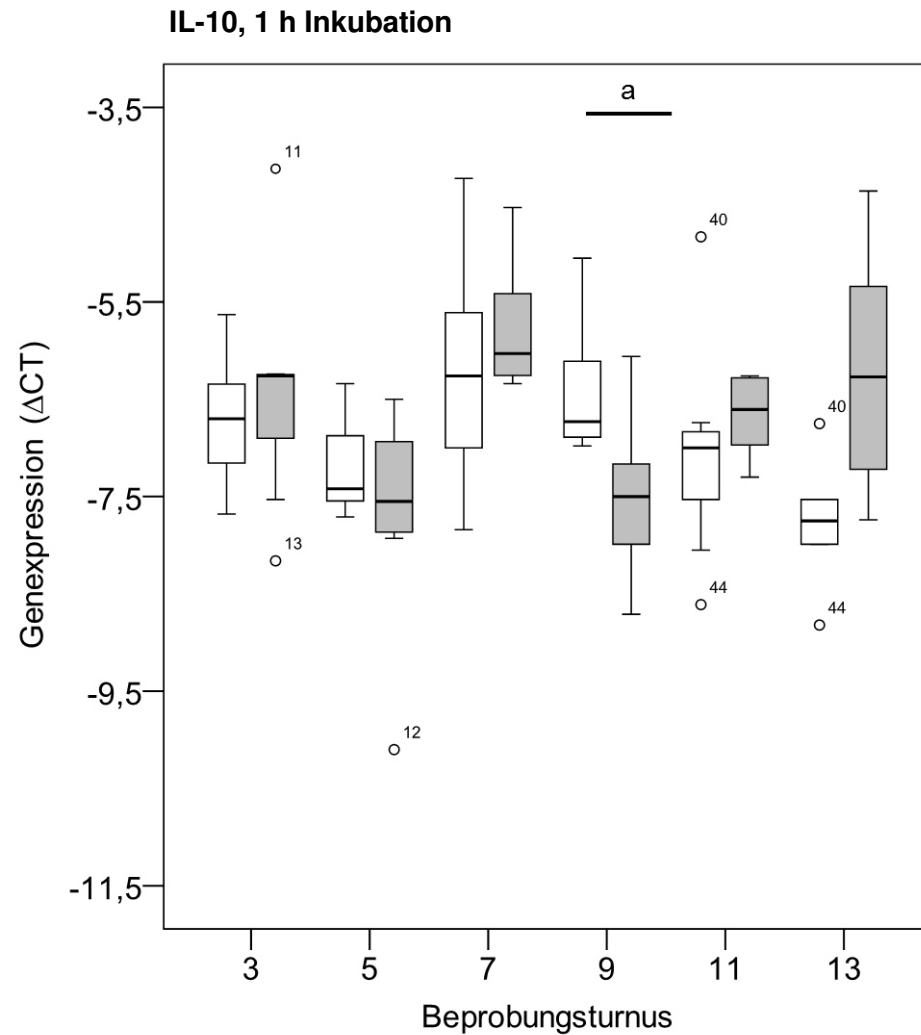


Abb. 13: Genexpression von IL-10, IL-12p40, IL-18, TGF- β und TNF- α in der Mediumkontrolle (jeweils Inkubation für 1 h bzw. 24 h) in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der ΔCT der Mediumkontrollen in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den ΔCT -Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

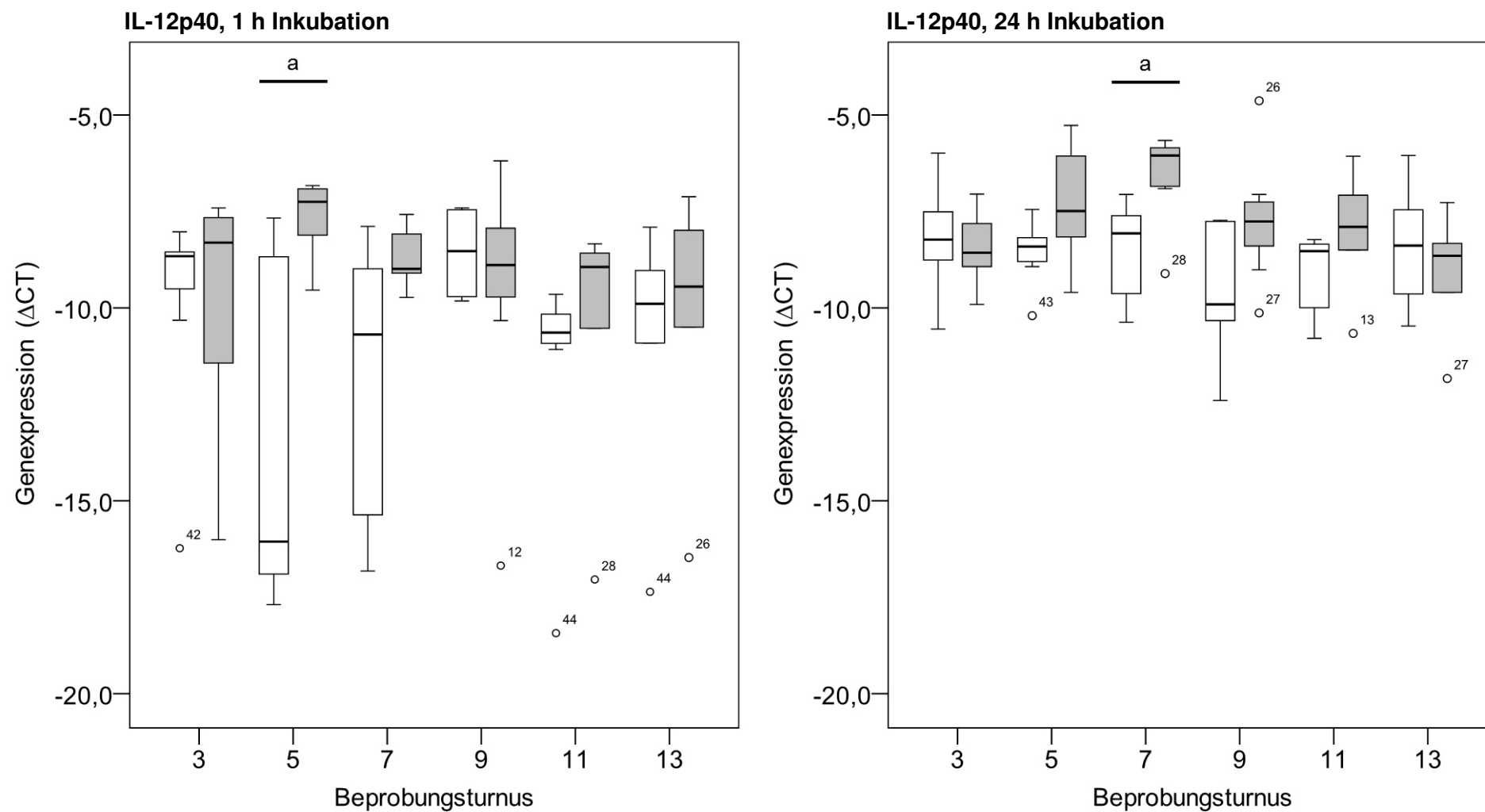


Abb. 13: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den ΔCT -Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

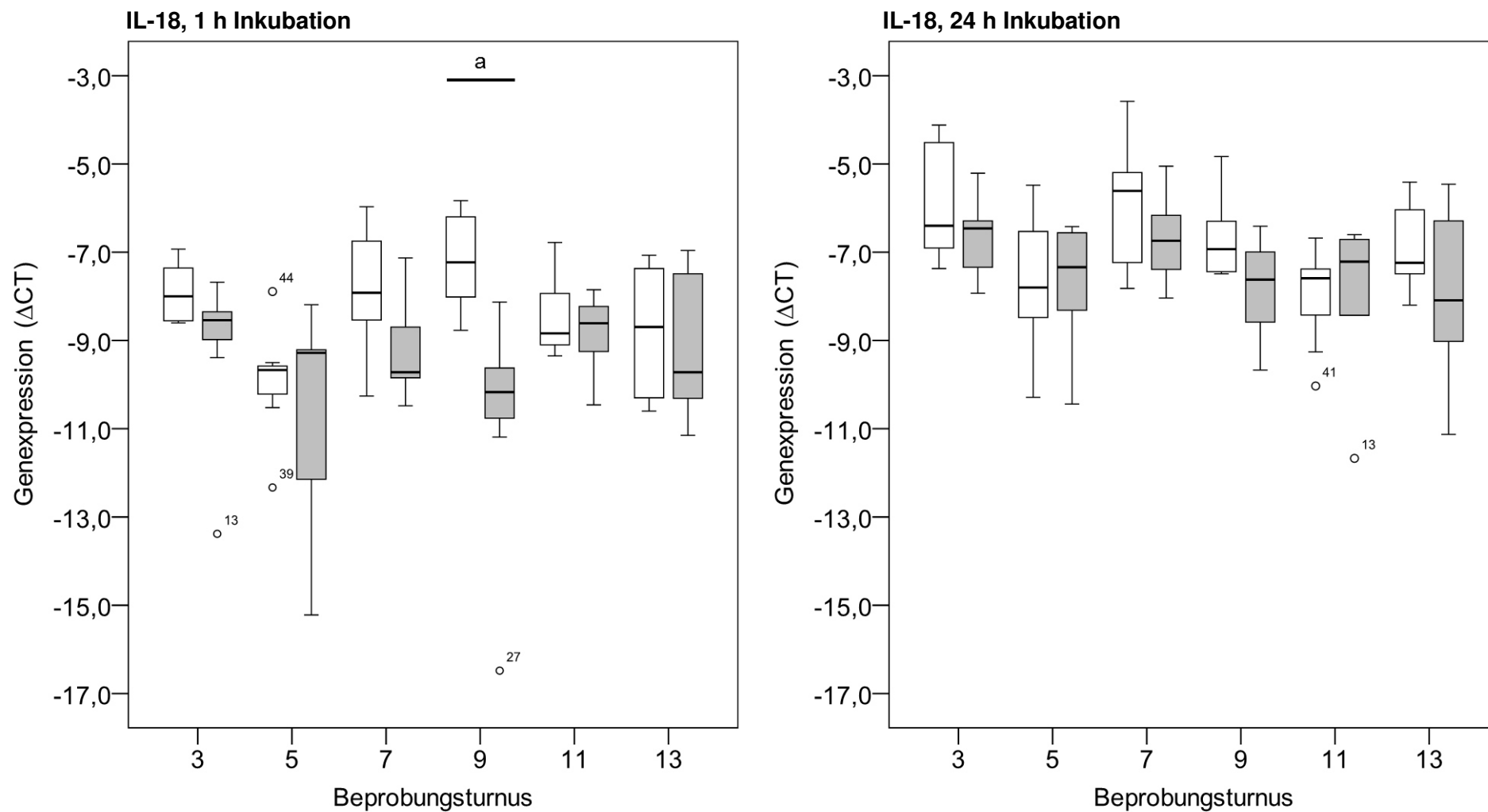


Abb. 13: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den Δ CT-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

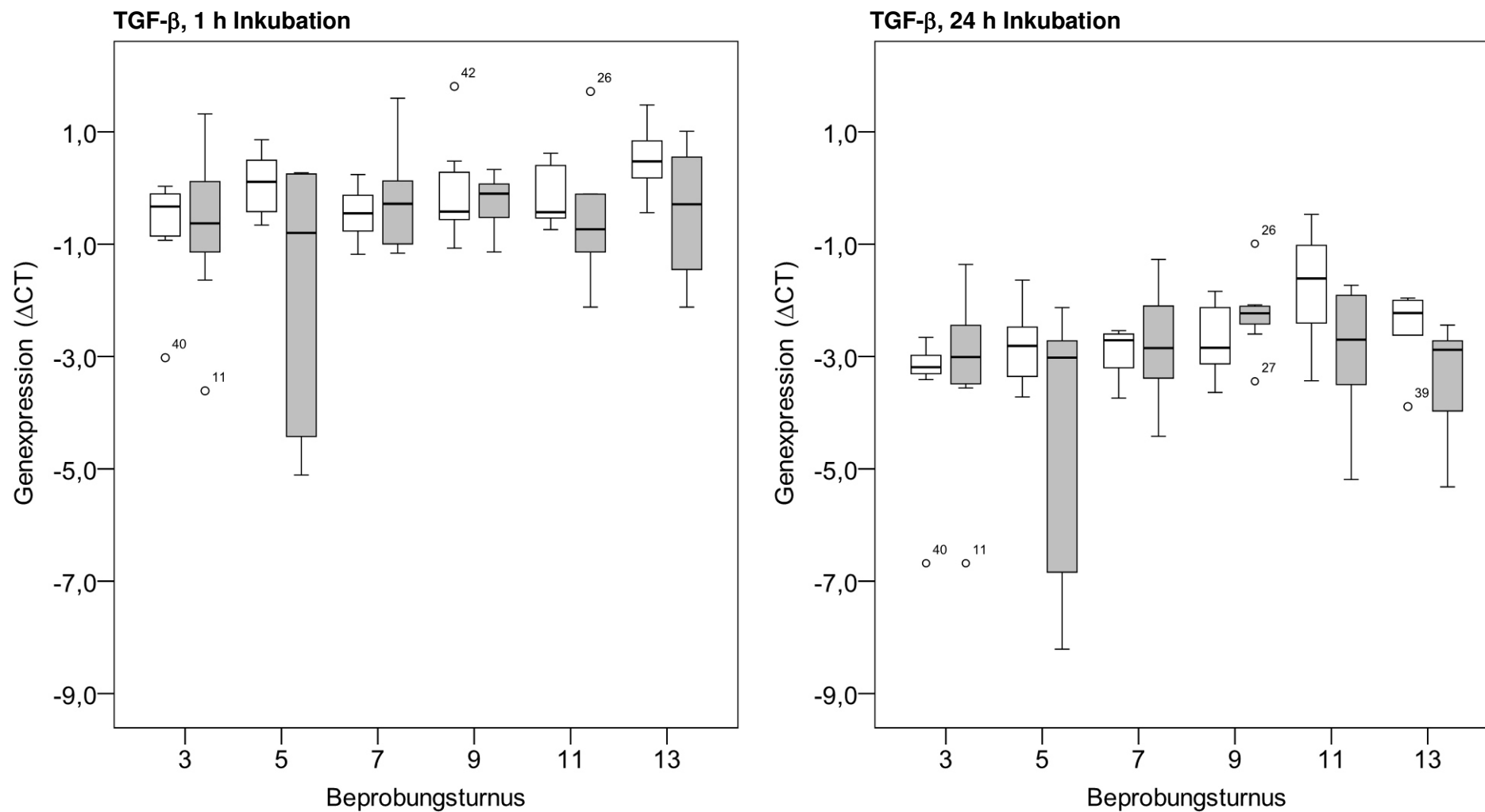


Abb. 13: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den Δ CT-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

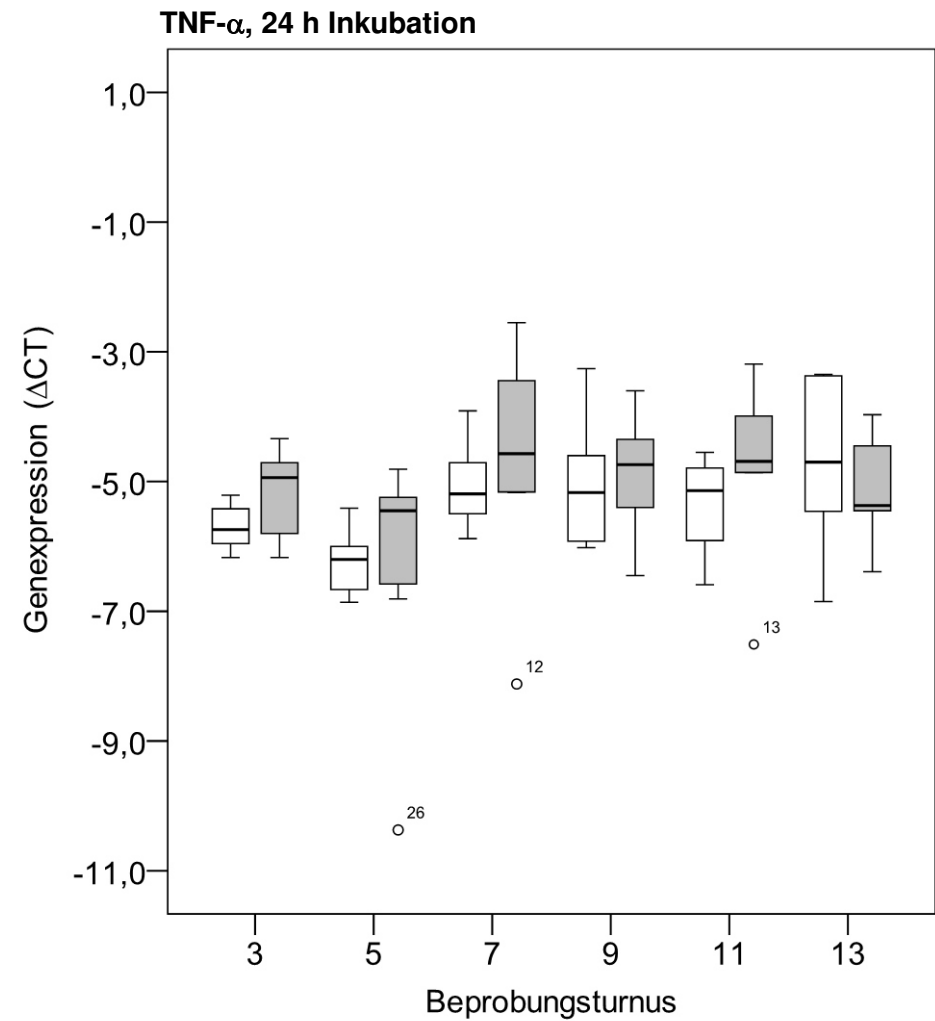
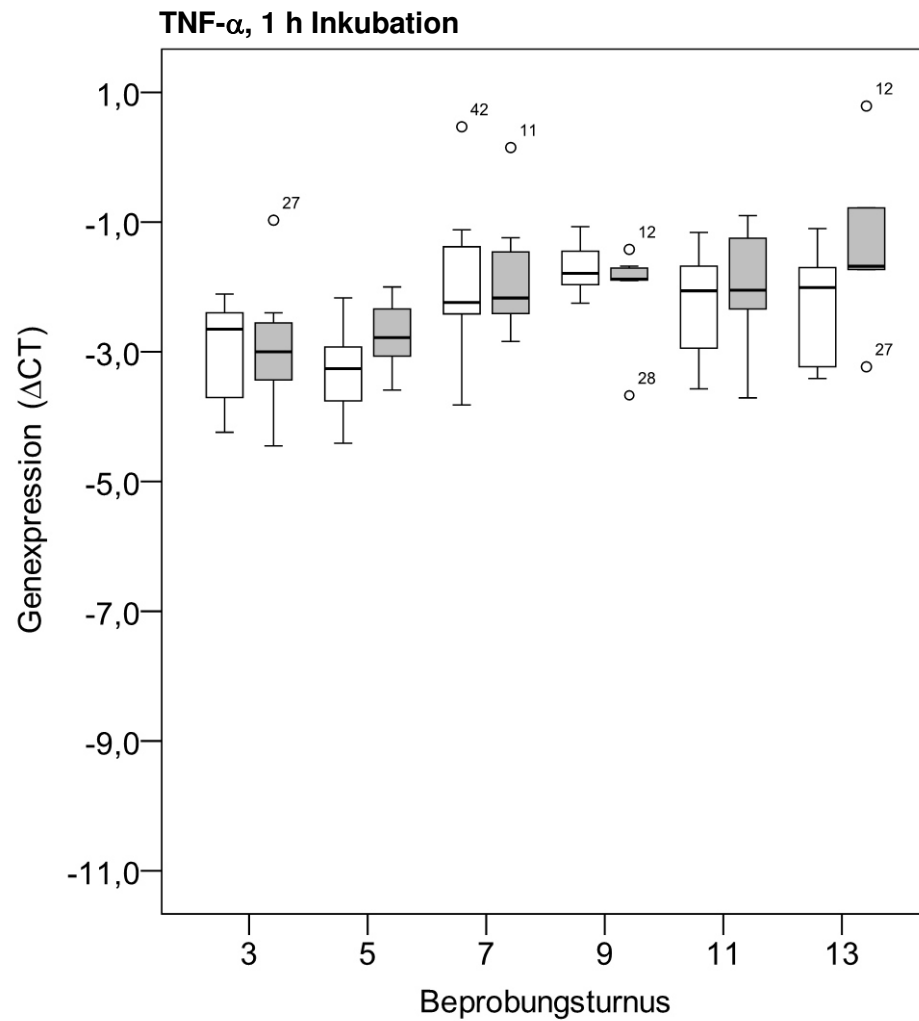


Abb. 13: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den Δ CT-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

Tab. 41: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte der Mediumkontrolle für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen Zeitpunkten. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

IL-10 in Mediumkontrolle nach 24 h		exakte Signifikanz zweiseitig	
Testvariable 1	Testvariable 2	Kontrolltiere	Versuchstiere
BT 3	BT 5	,016	,016
BT 3	BT 7	,219	,813
BT 3	BT 9	,563	,016
BT 3	BT 11	,016	,031
BT 3	BT 13	,031	,156
BT 5	BT 7	,297	<u>,047</u>
BT 5	BT 9	,563	,578
BT 5	BT 11	,031	,031
BT 5	BT 13	,578	,844
BT 7	BT 9	,844	,016
BT 7	BT 11	,031	,031
BT 7	BT 13	,047	,063
BT 9	BT 11	,156	,094
BT 9	BT 13	,688	,938
BT 11	BT 13	,078	,688

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der Testvariable 1 signifikant höher als die der Testvariable 2. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Die Inkubationszeit der *ex vivo* Restimulation der PBMC hatte sowohl bei Kontroll- als auch bei Versuchstieren einen Einfluss auf die Δ CT-Werte der Mediumkontrollen (Abb. 13, signifikante Unterschiede in Tab. 42). Die Genexpression von IL-10 war nach einstündiger Inkubation zeitweise signifikant höher als nach Inkubation für 24 Stunden. Für IL-12p40 und weniger ausgeprägt für IL-18 kam es nach einstündiger Inkubation zu größeren Streuungen der Δ CT-Werte. Die Genexpression von IL-12p40 war nach 24-stündiger Inkubation vereinzelt signifikant höher als nach einstündiger Inkubation. Auch das Genexpressionsniveau von IL-18 war nach 24-stündiger Inkubation höher als nach einstündiger Inkubation, oftmals lagen signifikante Unterschiede vor. Umgekehrtes galt für die Δ CT-Werte von TGF- β und TNF- α : Diese waren nach einstündiger Inkubation fast durchgehend signifikant höher als nach 24-stündiger Inkubation.

Tab. 42: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den für 1 h inkubierten und den für 24 h inkubierten PBMC.
Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

Stimulans	BT	Kontrolltiere					Versuchstiere				
		IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
Mediumkontrolle	3	1,000	,219	<u>,016</u>	,016	,016	,219	,375	<u>,016</u>	,016	,016
	5	<u>,031</u>	,078	<u>,031</u>	,016	,016	,219	,578	<u>,016</u>	,016	,016
	7	,109	<u>,047</u>	<u>,016</u>	,016	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016
	9	<u>,031</u>	,313	,438	,031	,031	<u>,016</u>	,297	<u>,016</u>	,031	,016
	11	<u>,016</u>	<u>,031</u>	,297	,031	,016	<u>,031</u>	,156	,438	,063	<u>,031</u>
	13	,313	,094	,063	,031	,031	,125	1,000	,063	,063	,063
JPPD (4 μ g/ml)	3	,156	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016	<u>,047</u>	<u>,016</u>	,156	,016	,016
	5	<u>,031</u>	,109	<u>,016</u>	,016	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,078	,016	,016
	7	,078	<u>,016</u>	<u>,031</u>	,016	,031	,109	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,078
	9	,063	<u>,031</u>	,219	,031	,031	<u>,016</u>	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,844
	11	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,078	,016	,016	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,156	,031	<u>,031</u>
	13	<u>,031</u>	,094	1,000	,063	,031	,063	,063	,313	,063	,063
APPD (125 I.E./ml)	3	,578	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016	,578	,078	,078	,016	,016
	5	,578	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,016</u>	,016	,016
	7	,938	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016	,297	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,016
	9	,625	,063	,063	,063	,063	,094	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,031	,031
	11	,688	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,031	,063	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,438	,031	,031
	13	,438	,063	<u>,031</u>	,031	,031	,438	,063	,125	,063	,063
ConA (10 μ g/ml)	3	,156	<u>,016</u>	,813	,016	,016	<u>,031</u>	,313	,094	<u>,031</u>	<u>,031</u>
	5	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,297	,016	,016	<u>,016</u>	,375	,156	,016	,016
	7	<u>,047</u>	<u>,016</u>	,016	,016	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,219	,016	,016
	9	,063	,063	,188	,063	,063	<u>,031</u>	,094	,219	,031	,031
	11	<u>,031</u>	,156	,156	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,156	,031	,031
	13	,063	,063	,063	,063	,063	,063	,063	,063	,063	,063
LPS (1 μ g/ml)	3	,938	,156	<u>,016</u>	,016	,016	,313	1,000	,094	<u>,031</u>	<u>,031</u>
	5	,078	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,016	,016	,938	,734	,156	,016	,016
	7	,219	<u>,016</u>	,938	,016	,016	,438	<u>,031</u>	,313	,031	,031
	9	,063	,063	,250	,063	,063	,578	,375	,375	,219	,016
	11	,313	<u>,031</u>	1,000	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,313	<u>,031</u>	,438	<u>,031</u>	<u>,031</u>
	13	,844	,156	,844	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,625	,063	,313	,063	,063

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der für 1 h inkubierten Proben signifikant höher als die der für 24 h inkubierten PBMC. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.5.3 Induzierbarkeit von Änderungen in der Genexpression der untersuchten Zytokine durch ConA bzw. LPS

Zur Kontrolle der Methodik sollten auf dem angewandten Testsystem bzw. dem Probenhandling beruhende Verluste in der Genregulation bzw. -expression der PBMC ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Δ CT-Werte von Mediumkontrollen und Positivkontrollen (ConA, LPS) statistisch gegeneinander getestet (Tab. 43).

Tab. 43: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen der Mediumkontrolle und den mit ConA bzw. LPS stimulierten PBMC. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

Inkubation	Stimulans	BT	Kontrolltiere					Versuchstiere				
			IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
1 h	ConA (10 μ g/ml)	3	,016	,813	,813	<u>,016</u>	,016	,844	,438	,438	<u>,031</u>	,313
		5	,016	,156	,297	<u>,016</u>	,016	,031	,016	,469	<u>,047</u>	,016
		7	,109	,016	,922	<u>,016</u>	,375	,031	,469	,219	,219	,031
		9	1,000	,688	,438	,063	,156	<u>,047</u>	,203	<u>,031</u>	,203	,219
		11	,313	,563	,844	1,000	,094	,219	,844	,156	,563	<u>,031</u>
		13	,063	<u>,031</u>	,313	,156	<u>,031</u>	,625	,438	1,000	,125	,313
	LPS (1 μ g/ml)	3	,297	,297	<u>,016</u>	,156	,016	1,000	,313	<u>,031</u>	,438	<u>,031</u>
		5	<u>,031</u>	,016	,500	,219	,016	<u>,016</u>	,016	,297	,469	<u>,016</u>
		7	,688	,016	,688	<u>,016</u>	,813	,469	,016	,813	,094	,375
		9	,219	<u>,031</u>	,219	,094	<u>,031</u>	,813	<u>,031</u>	1,000	,578	<u>,031</u>
		11	,563	<u>,031</u>	,313	,563	,063	,688	,438	,844	1,000	<u>,031</u>
		13	,688	,156	,688	,219	,313	,813	,063	,188	,438	,063
24 h	ConA (10 μ g/ml)	3	1,000	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,219	<u>,031</u>	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,938
		5	,938	,016	<u>,031</u>	<u>,016</u>	,078	,297	,031	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,469
		7	,297	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,016	,156	,016	<u>,016</u>	<u>,016</u>	,469
		9	,844	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,094	,156	,438	<u>,031</u>	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,688
		11	,578	,078	,219	<u>,016</u>	,688	,438	,063	,063	,156	,688
		13	1,000	,125	,063	,063	,375	,688	,063	,125	,063	,063
	LPS (1 μ g/ml)	3	,375	,016	<u>,016</u>	<u>,031</u>	,109	<u>,031</u>	,016	,219	<u>,031</u>	<u>,016</u>
		5	<u>,047</u>	,016	1,000	<u>,016</u>	,270	<u>,047</u>	<u>,031</u>	,078	,078	,813
		7	<u>,031</u>	,016	<u>,016</u>	<u>,031</u>	<u>,016</u>	1,000	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,063	,688
		9	,063	<u>,031</u>	,844	,313	,563	,109	,016	,078	,578	,219
		11	<u>,016</u>	,016	,578	<u>,031</u>	,578	,063	<u>,031</u>	,438	,313	1,000
		13	,313	<u>,031</u>	,094	,063	,219	,063	,063	,313	1,000	1,000

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der stimulierten PBMC signifikant höher als die der Mediumkontrollen. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Dabei zeigten sich die Zytokine in Abhängigkeit von der verwendeten Positivkontrolle und der Stimulationsdauer verschieden exprimiert. Zu jedem Beprobungszeitpunkt aber waren die PBMC in der Lage, auf entsprechende Stimuli mit einer Anpassung der Genexpression zu reagieren.

Die meisten signifikanten Unterschiede gegenüber der Mediumkontrolle zeigten sich für IL-18 und TGF- β bei Kontroll- sowie Versuchstieren nach 24-stündiger Stimulation mit ConA. Eine erhöhte Genexpression von IL-12p40 ließ sich noch sicherer als durch ConA durch 24-stündige Stimulation mit LPS induzieren. Die Genexpression von IL-10 wurde durch Stimulation nur zeitweise signifikant erhöht; dabei war die 24-stündige LPS-Stimulation so effektiv wie die einstündige ConA-Stimulation. Die Genexpression von TNF- α wurde am deutlichsten nach einstündiger Stimulation mit ConA oder LPS verändert.

Im Vergleich zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren ergaben sich nach Stimulation mit ConA bzw. LPS in einzelnen BT, bzw. für IL-10 nach 24-stündiger ConA-Stimulation gehäuft, signifikante Unterschiede (Tab. 44).

Tab. 44: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

	BT	1 h Inkubation					24 h Inkubation				
		IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
ConA	3	,148	,534	,101	,945	,836	,029	,221	,029	,104	1,000
	5	,003	,011	,383	,535	,010	,053	,259	,456	,805	,073
	7	,165	,686	,097	,245	,053	,007	,053	,259	,535	,456
	9	,101	,534	,014	,628	,836	,028	,699	,180	,584	1,000
	11	1,000	,699	,065	,699	,937	,836	,366	,366	,836	,534
	13	,177	,537	,398	,082	,177	,841	,730	,056	,548	,690
LPS	3	,731	,534	,181	,760	,138	,927	,934	,176	,402	,558
	5	,128	,097	,318	,209	,128	,456	,245	,259	1,000	,038
	7	,383	,830	,073	,334	,902	,295	,138	,234	,945	,945
	9	,976	,534	,366	,534	,945	,051	,101	,007	,559	,138
	11	1,000	,818	,065	,818	,699	,628	,974	,073	,181	,148
	13	,113	,329	,429	,662	,247	,931	,052	,931	,429	,126

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Die Δ CT-Werte der Kontrolltiere sind jeweils signifikant höher als die der Versuchstiere.

5.5.4 Expression der untersuchten Zytokine in restimulierten PBMC

Das Ausmaß und die Richtung der Genexpressionsänderung nach Stimulation hingen vom Zytokin, vom Inokulationsstatus des Tieres, vom verwendeten Stimulans und von der Stimulationszeit ab. Die Unterschiede, die sich zwischen der einstündigen Stimulation und der 24-stündigen Stimulation ergaben, waren dabei oftmals statistisch signifikant (Tab. 42). Unterschiede gegenüber der Mediumkontrolle waren nach 24-stündiger Stimulation am deutlichsten zu erkennen, weshalb sich im Folgenden die Beschreibung der Ergebnisse auf diese Stimulationszeit beschränkt.

Durch Vergleich der Δ CT-Werte von unstimulierten PBMC mit denen von stimulierten PBMC wurden antigen-induzierte Änderungen der Genexpression statistisch belegt (Tab. 63 im Anhang, Tab. 45). Zur übersichtlichen Darstellung der Art des Einflusses der einzelnen Stimulationsansätze ist hier jedoch zunächst die jeweilige *Ratio*, welches die Änderung in Relation zur Mediumkontrolle widerspiegelt, in Tab. 45 in Symbolen kodiert angegeben.

Die Genexpression von IL-12p40, IL-18, TGF- β und TNF- α zeigte sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Versuchstieren jeweils nach Stimulation mit JPPD die gleiche Tendenz wie nach Stimulation mit APPD. Die durch JPPD bzw. APPD induzierten Änderungen der Δ CT-Werte gegenüber der Mediumkontrolle waren dabei bei den Versuchstieren für IL-12p40 und TNF- α größtenteils signifikant; bei den Kontrolltieren zeigten sich mit Ausnahme der Genexpression von IL-12p40 nach Stimulation mit APPD seltener signifikante Unterschiede (Tab. 63 im Anhang, Tab. 45). Die Genexpression von TGF- β hingegen wurde bei allen Tieren durch die Stimulation mit JPPD bzw. APPD tendenziell gesenkt. Für IL-18 galt dies ebenso bei den Versuchstieren, bei den Kontrolltieren jedoch kam es tendenziell zu einer Erhöhung der Genexpression. Die Genexpression von IL-10 verhielt sich bei Stimulation mit JPPD anders als bei Stimulation mit APPD. Während APPD bei Kontroll- und Versuchstieren eine Steigerung der Genexpression von IL-10 induzierte, war dies nach JPPD-Stimulation nicht der Fall.

Tab. 45: Medianwerte der *Ratios* untersuchter Zytokine für die Stimulationsansätze mit JPPD und APPD, in Symbolen kodiert dargestellt. Die *Ratio* gibt die relative Genexpression der Zielsequenz in Relation zur Mediumkontrolle an. Dargestellt sind die Mediane der *Ratios*, jeweils für die Kontroll- bzw. die Versuchstiere pro BT berechnet und ihrer Höhe nach mit Symbolen kodiert.

Inkubation	Stimulans	BT	Kontrolltiere					Versuchstiere				
			IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
1 h	JPPD (4 μ g/ml)	3	+++	+	+/-	+/-	+	+	++	++	+/-	+/-
		5	++	+	++	+/-	+/-	++	++	+++	-	+/-
		7	+/-	++	-	+/-	-	+/-	++	+	+/-	+/-
		9	+/-	+/-	+	+/-	+	-	++	++	+/-	+/-
		11	+	+++	++	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
		13	++	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-
	APPD (125 I.E./ml)	3	+/-	++	-	+/-	++	+/-	+++	-	+/-	+++
		5	+/-	+++	+/-	-	++	+	+++	+/-	+/-	+++
		7	+/-	+++	+/-	--	+	+	++	+	+/-	+/-
		9	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	++	++	+/-	+/-
		11	+/-	++	++	-	+	-	+/-	---	+/-	+/-
		13	++	+++	+	---	++	++	+++	+/-	+/-	+++
24 h	JPPD (4 μ g/ml)	3	+/-	++	++	+/-	+/-	+/-	+++	+/-	-	+++
		5	+	+++	+	+/-	+	+/-	+++	+/-	+/-	+++
		7	-	+++	+/-	+/-	+	+/-	+++	-	+/-	+++
		9	+/-	+++	++	+/-	+	+/-	+++	+/-	-	+++
		11	++	+++	+++	+/-	+	--	+++	---	+/-	+++
		13	--	++	-	---	+/-	++	+++	-	+/-	+++
	APPD (125 I.E./ml)	3	+	+++	+	-	+/-	++	+++	+	--	++
		5	++	+++	+	+/-	+/-	++	+++	-	-	+++
		7	+++	+++	+/-	+/-	+	++	+++	+/-	-	+++
		9	++	+++	+	+/-	+++	++	+++	-	-	+++
		11	+++	+++	++	-	++	++	+++	--	+/-	++
		13	+	+++	+/-	--	--	+++	+++	--	+	+++

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Fälle, in denen sich die Δ CT-Werte des Stimulationsansatzes von denen der Mediumkontrolle signifikant unterscheiden ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Test), vgl. Tab. 63 im Anhang.

- = *Ratio* $\leq 0,5$
- = *Ratio* $> 0,5$ und $\leq 0,66$
- = *Ratio* $> 0,66$ und $\leq 0,8$
- +/- = *Ratio* $> 0,8$ und $\leq 1,2$
- +
- ++ = *Ratio* $> 1,5$ und ≤ 2
- +++ = *Ratio* > 2

Die durch Stimulation mit JPPD bzw. APPD induzierten Genexpressionsänderungen ähnelten sich zwar in der generellen Tendenz, unterschieden sich aber dennoch deutlich in ihrem Ausmaß (Tab. 64 im Anhang). Die Genexpressionsniveaus von IL-12p40 und TNF- α , die am deutlichsten durch die Stimulation beeinflusst wurden, waren bei Versuchstieren nach JPPD-Stimulation höher als nach APPD-Stimulation. Für TNF- α waren die Unterschiede größtenteils statistisch signifikant. Kontrolltiere zeigten in den meisten Fällen höhere Genexpressionsänderungen nach Stimulation mit APPD.

Die Kontrolltiere unterschieden sich oftmals im Ausmaß der Genexpressionsänderung von den Versuchstieren. Diese Effekte sind allerdings statistisch eher zu erfassen, wenn Δ CT-Werte verglichen werden, als wenn man auf die Ratios zurückgreift (vgl. Tab. 40, Tab. 65 im Anhang). Die Genexpression von IL-12p40 sowie von TNF- α wurde bei Versuchstieren sowohl nach JPPD- als auch nach APPD-Stimulation signifikant stärker hochreguliert als bei Kontrolltieren. IL-18 ist bei den Versuchstieren stärker herabreguliert als bei den Kontrolltieren.

Unabhängig davon, ob JPPD oder APPD zur Stimulation verwendet wurde, veränderte sich bei Kontroll- sowie bei Versuchstieren die Höhe der Genexpression von IL-10, IL-18 und TGF- β über den Versuchszeitraum hinweg wenig (Abb. 14). Im Gegensatz dazu zeigte die Genexpression von IL-12p40 und TNF- α bei den Versuchstieren (anders als bei den Kontrolltieren) zunächst einen Anstieg, erreichte in BT 7 bzw. BT 9 die höchsten Δ CT-Werte und kehrte dann bis zum Versuchsende auf das Ausgangsniveau zurück.

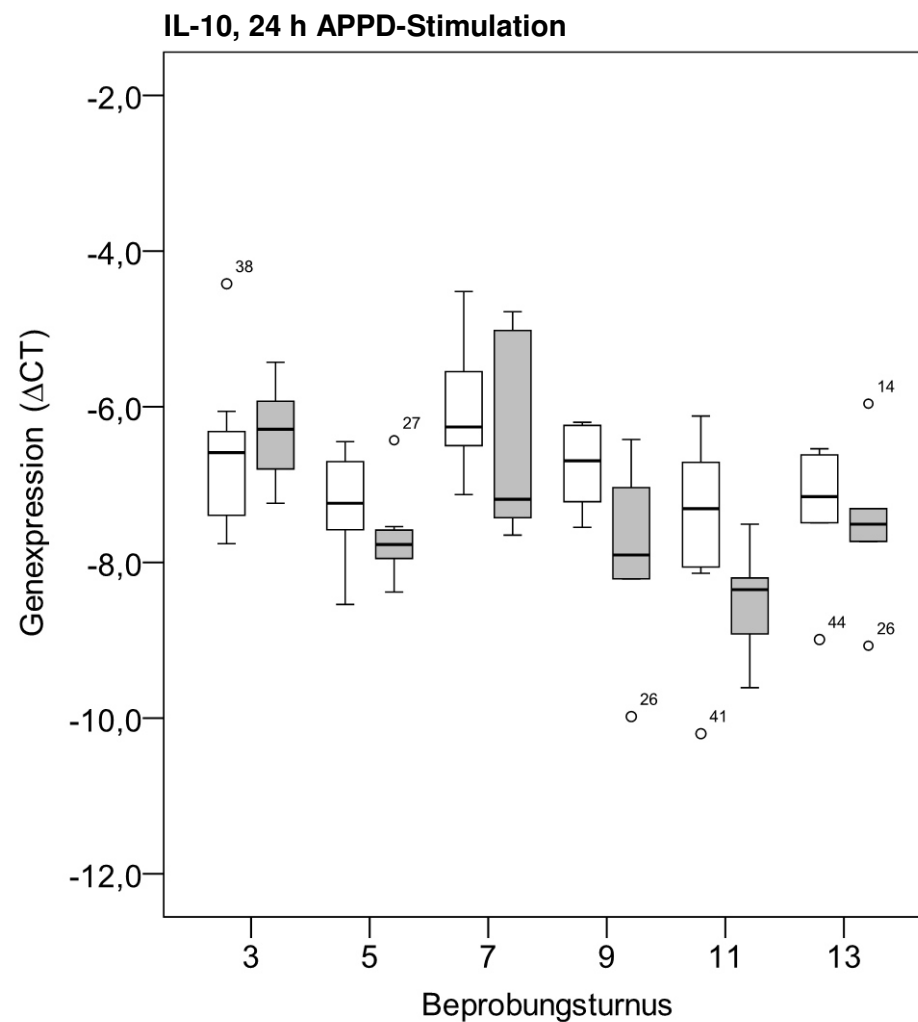
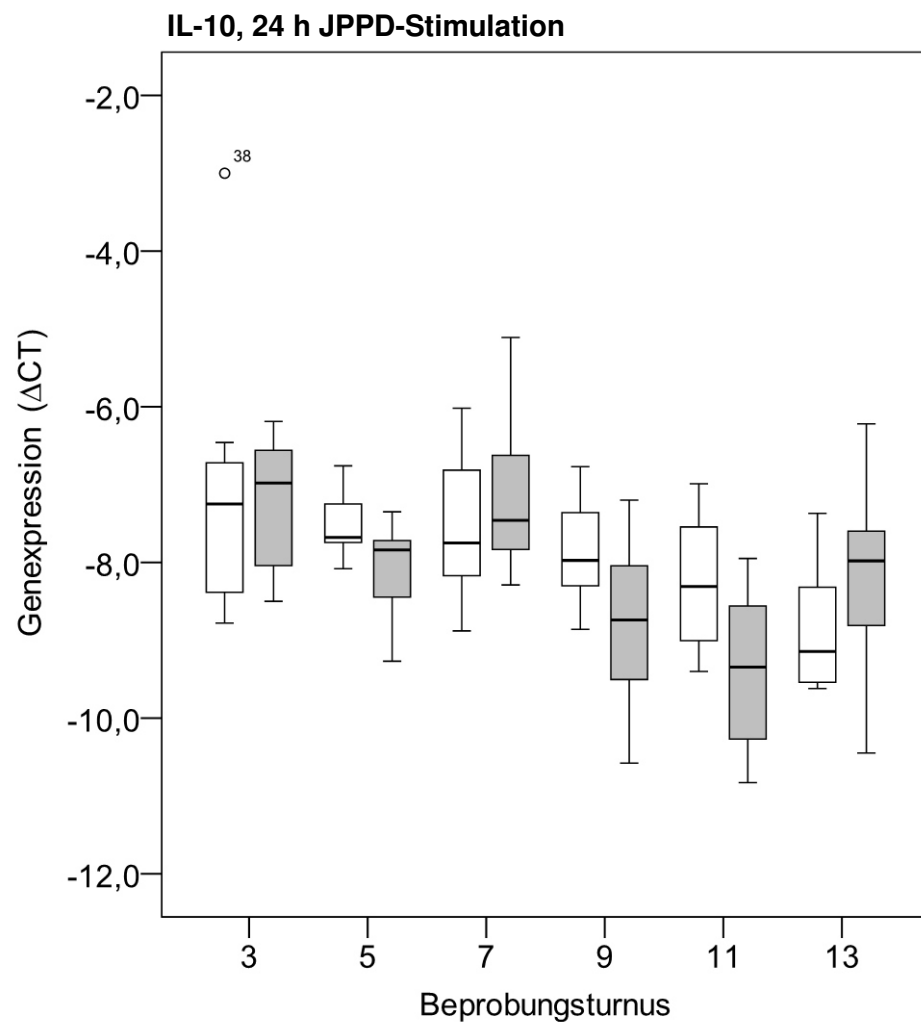


Abb. 14: Genexpression von IL-10, IL-12p40, IL-18, TGF- β und TNF- α der für 24 h mit JPPD bzw. APPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der ΔCT der für 24 h mit JPPD (4 $\mu g/ml$) bzw. APPD (125 I.E./ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den ΔCT -Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

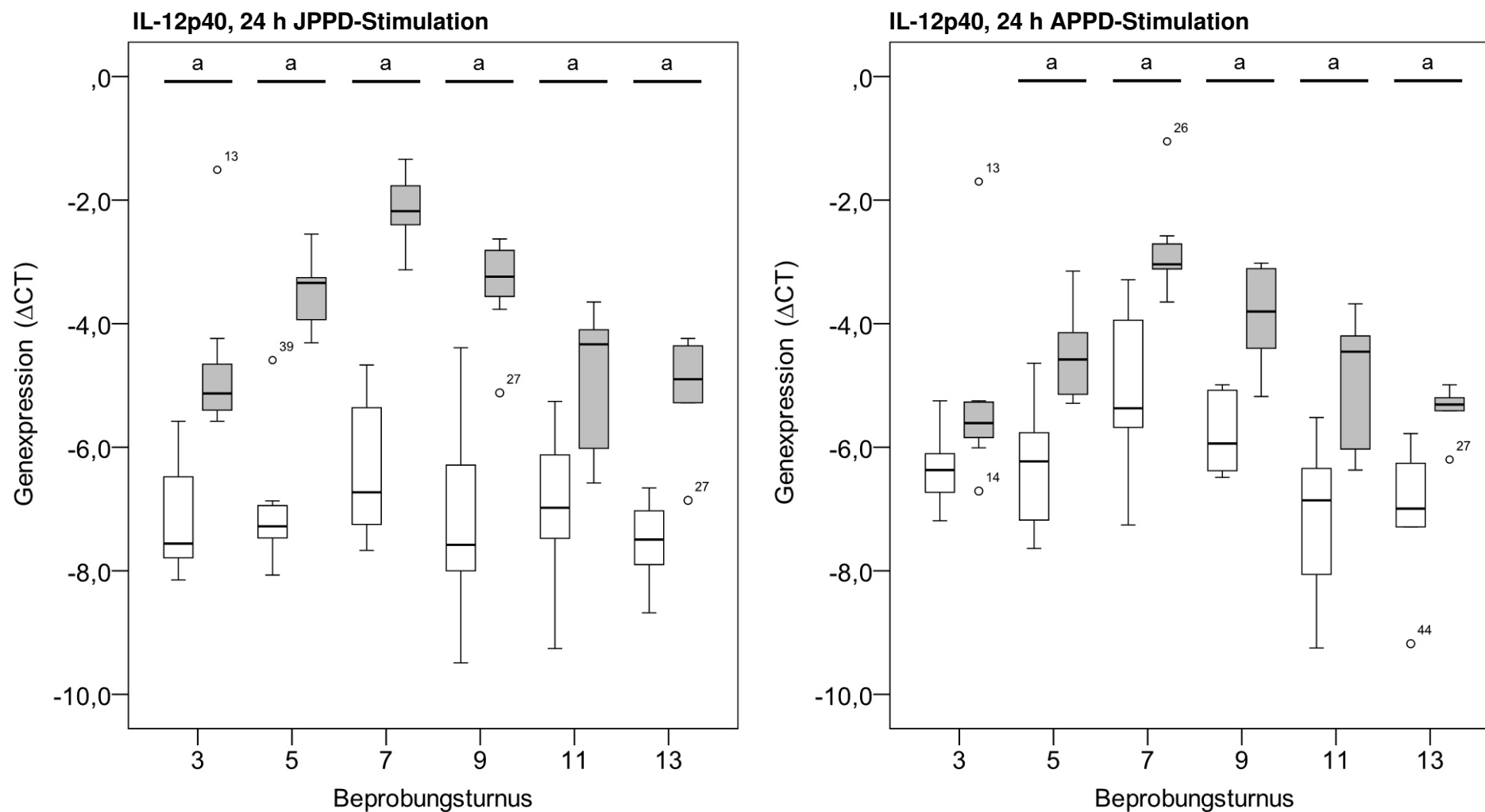


Abb. 14: (Fortsetzung)

$\square$ = Kontrolltiere; $\blacksquare$ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den ΔCT -Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

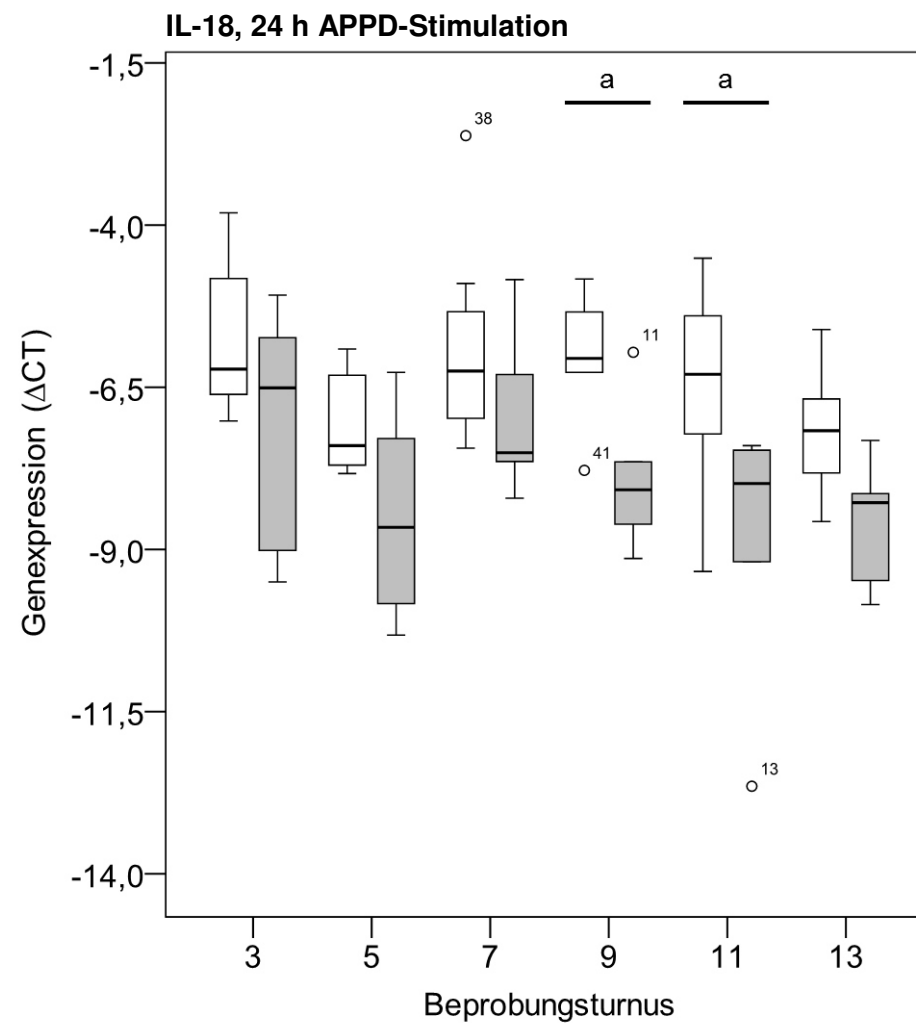
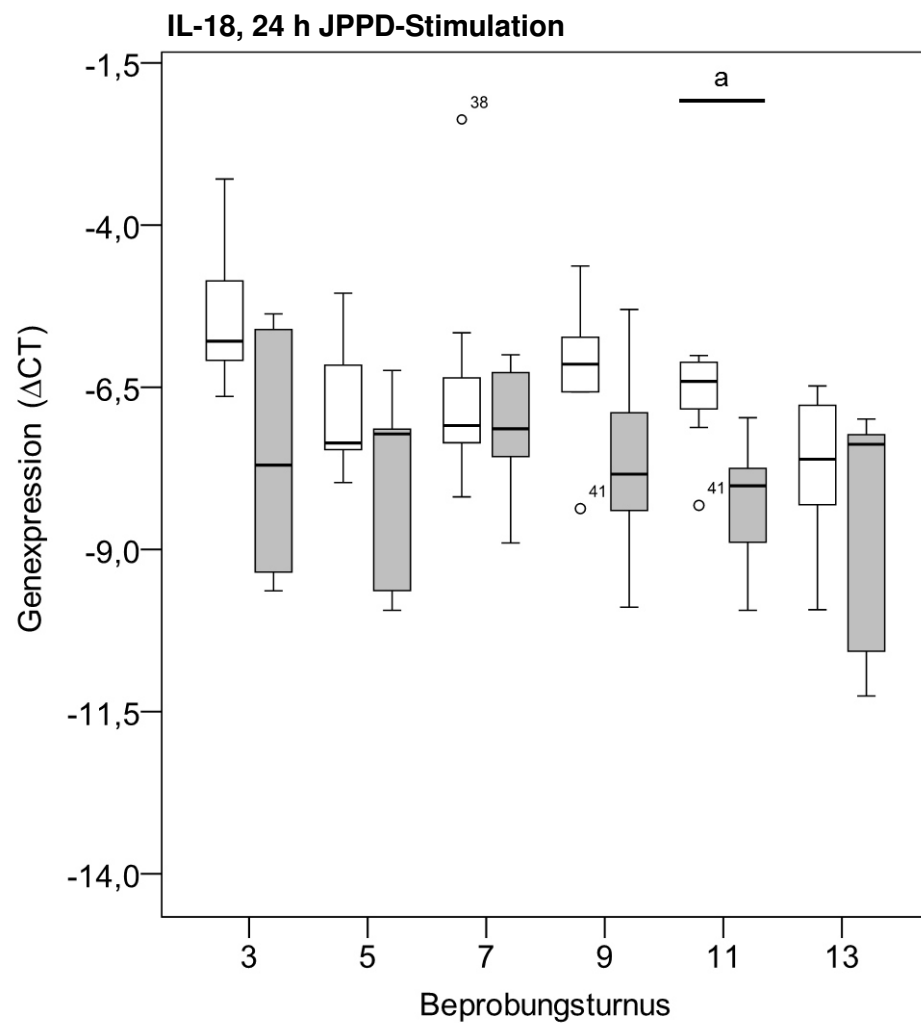


Abb. 14: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den ΔCT -Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

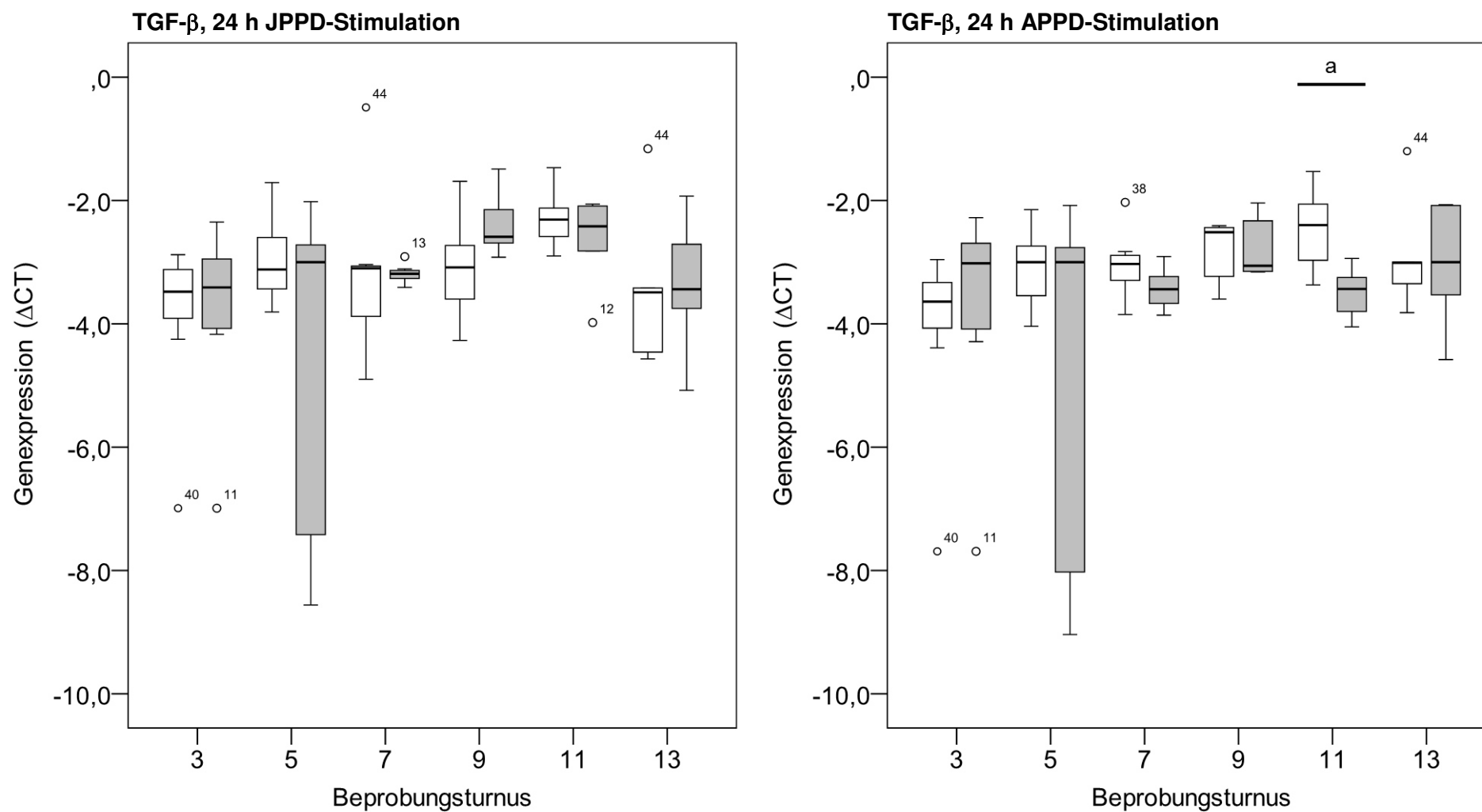


Abb. 14: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den Δ CT-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

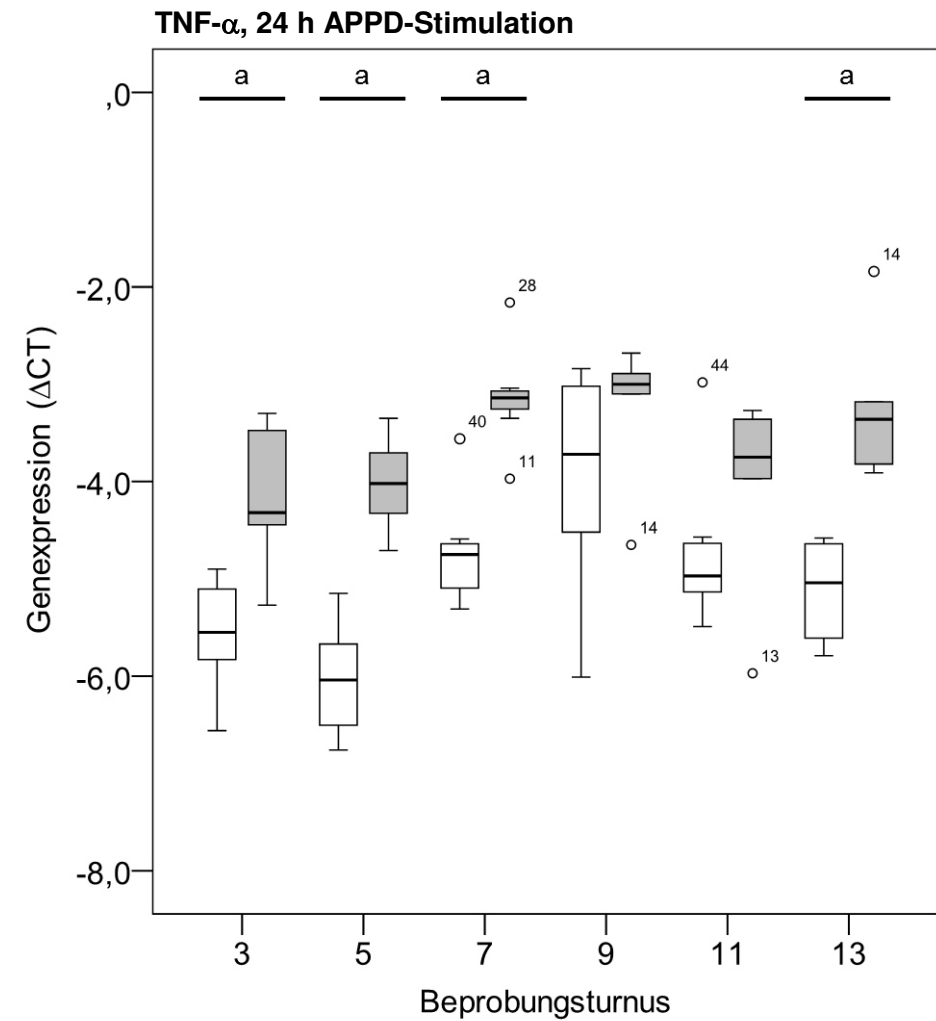
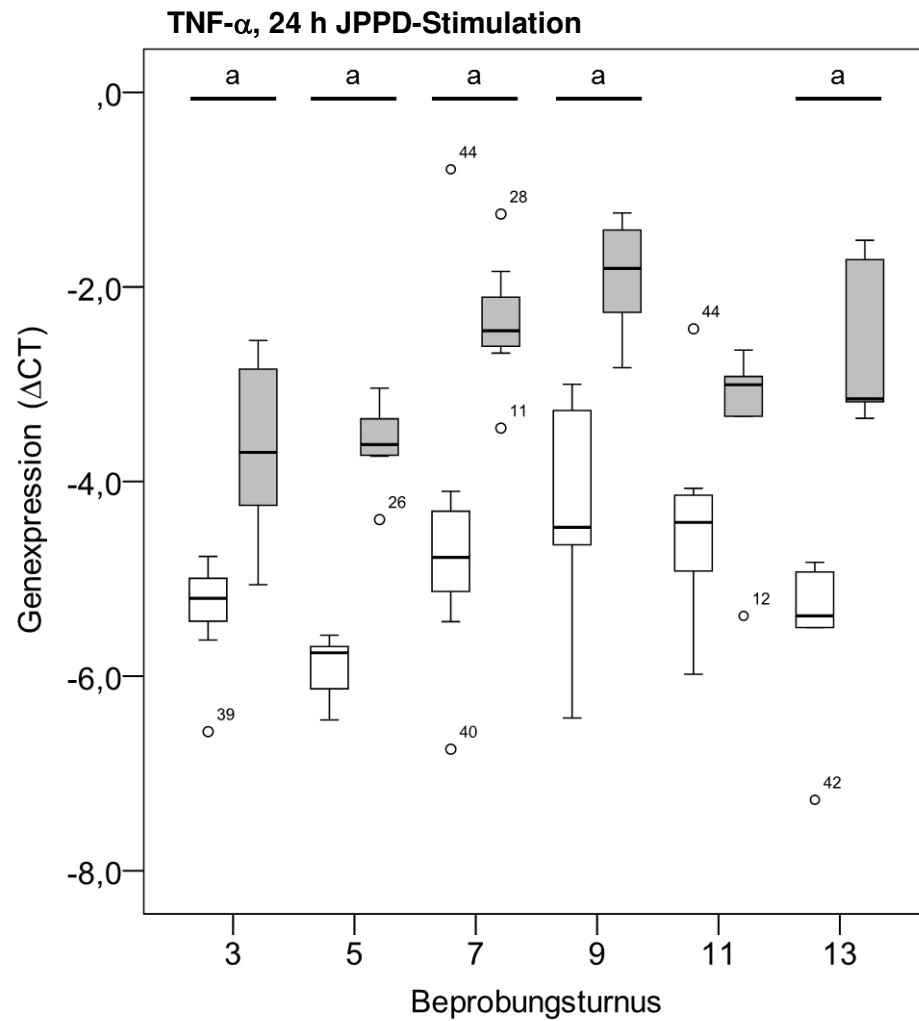


Abb. 14: (Fortsetzung)

□ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den Δ CT-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

5.5.5 Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren

Die Änderungen gegenüber der Mediumkontrolle, die bei den Versuchstieren in der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α in weitaus höherem Ausmaß zu finden waren als bei den Kontrolltieren, wurden auf Einzeltierebene auf ihre Eignung für diagnostische Zwecke getestet (wie in 4.8 beschrieben).

Sowohl die Richtig-Negativ- als auch die Richtig-Positiv-Rate waren am höchsten, wenn der Testung der Nachweis von IL-12p40 mittels Δ CT zugrunde gelegt wurde (Tab. 46). Damit wurden über den gesamten Versuchsverlauf eine Richtig-Negativ-Rate von 100 % und von BT 5 bis BT 9 Richtig-Positiv-Raten von 57,14 bis 100 % erreicht. Deutlich geringer (0 bis 14,29 %) waren die Richtig-Positiv-Raten zu Beginn (BT 3) und zum Ende der Untersuchung (BT 11 und BT 13). Bei der Einzeltiertestung anhand von *Ratios* für den Nachweis von IL-12p40 bzw. anhand von Δ CT-Werten oder *Ratios* für den Nachweis von TNF- α zeigten sich keine durchgehende Richtig-Negativ-Rate von 100 % und wesentlich geringere Richtig-Positiv-Raten (0,0 bis 28,57 %).

Tab. 46: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten bei Auswertung auf Grundlage von Δ CT-Werten und *Ratios* für den Nachweis von IL-12p40 bzw. TNF- α nach JPPD-Stimulation (4 μ g/ml). Dargestellt sind die berechneten Grenzwerte (GW) sowie die Richtig-Negativ-Rate und die Richtig-Positiv-Rate bei Anwendung des jeweiligen Parameters in der Einzeltiertestung in Abhängigkeit vom BT. Ergebnisse wurden dafür als positiv angesehen, wenn sie den GW überschritten. Dieser entspricht dem Mittelwert der Gesamtergebnisse der Kontrolltiere addiert mit der dreifachen Standardabweichung.

	BT	Nachweis von IL-12p40		Nachweis von TNF- α	
		Δ CT	<i>Ratio</i>	Δ CT	<i>Ratio</i>
GW	/	-3,401	29,212	-1,447	7,216
Richtig-Negativ-Rate [%]	3	100	100	100	100
	5	100	100	100	100
	7	100	100	85,7	85,7
	9	100	83,3	100	100
	11	100	100	100	100
	13	100	100	100	100
Richtig-Positiv-Rate [%]	3	14,3	28,6	0	0
	5	57,1	14,3	28,6	0
	7	100	14,3	28,6	14,3
	9	71,4	14,3	28,6	28,6
	11	0	16,7	16,7	0
	13	0	16,7	16,7	0

5.6 Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression auf unstimulierten und restimulierten T-Gedächtniszellen

Bei den mittels Durchflusszytometer durchgeführten Analysen wurden die spontane sowie die antigen-induzierte Expression von CD25 und CD26 untersucht. Analysiert wurde dafür die Fluoreszenzintensität für den Nachweis dieser Antigene bei den CD4⁺CD45RO⁺ bzw. CD8⁺CD45RO⁺ Lymphozyten, die zur besseren Lesbarkeit auch als CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen bezeichnet werden. Der auf dem Kanal, auf dem die Fluoreszenz von PE gemessen wird, ermittelte MdFI wurde dabei als Maß für die absolute Expression der Aktivierungsmoleküle CD25 bzw. CD26 gewertet. Um die stimulationsbedingte Änderung gegenüber der Mediumkontrolle zu fassen, wurde der MdFI_Q eingeführt. Das ist der Quotient aus dem MdFI des Stimulationsansatzes und dem der Mediumkontrolle. Zur sprachlichen Vereinfachung werden die erhobenen Werte für MdFI bzw. MdFI_Q im Folgenden im Fließtext als „absolute Expression“ bzw. „relative Expression“ bezeichnet.

5.6.1 Kontrolle der angewandten Methodik

Im Laufe der Studie wurden für diese Analysen unterschiedliche Anzahlen von Tieren aus verschiedenen Versuchsgruppen untersucht (vgl. Tab. 47 bzw. Abb. 15). Signifikante Unterschiede zeigten sich dabei nur zwischen den Versuchsgruppen der Versuchstiere. Hier unterschieden sich in einzelnen BT die Versuchsgruppen V2 und V3 signifikant voneinander (Tab. 66 A/B im Anhang). Während in der Mediumkontrolle bei festgestellten signifikanten Unterschieden immer V2 höhere Werte als V3 aufwies, war dies nach ConA-Stimulation nicht immer der Fall. Für JPPD-stimulierte PBMC gab es hier keine signifikanten Unterschiede.

5.6.2 Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten PBMC

Anhand der Mediumkontrollen wurde die spontane Expression von CD25 und CD26 auf unstimulierten PBMC nach 6-tägiger Kultivierung bestimmt. Unabhängig von der betrachteten Lymphozytensubpopulation zeigte sich weder bei Kontroll- noch bei Versuchstieren eine charakteristische Veränderung der spontanen Expression von CD26 über den Versuchsverlauf (Abb. 15). Der in Abb. 15 dargestellte Verlauf spiegelt im Wesentlichen auch die Verhältnisse bei CD8⁺ Gedächtniszellen sowie die für CD25 bei beiden Gedächtniszellsubpopulationen wider. Die Ausreißer nahmen bei letztgenannten Messungen allerdings mitunter weitaus höhere Werte an (max. MdFI = 13.833). Allgemein war in den BT 3-6 die Streuung der MdFI größer als in den darauf folgenden BT.

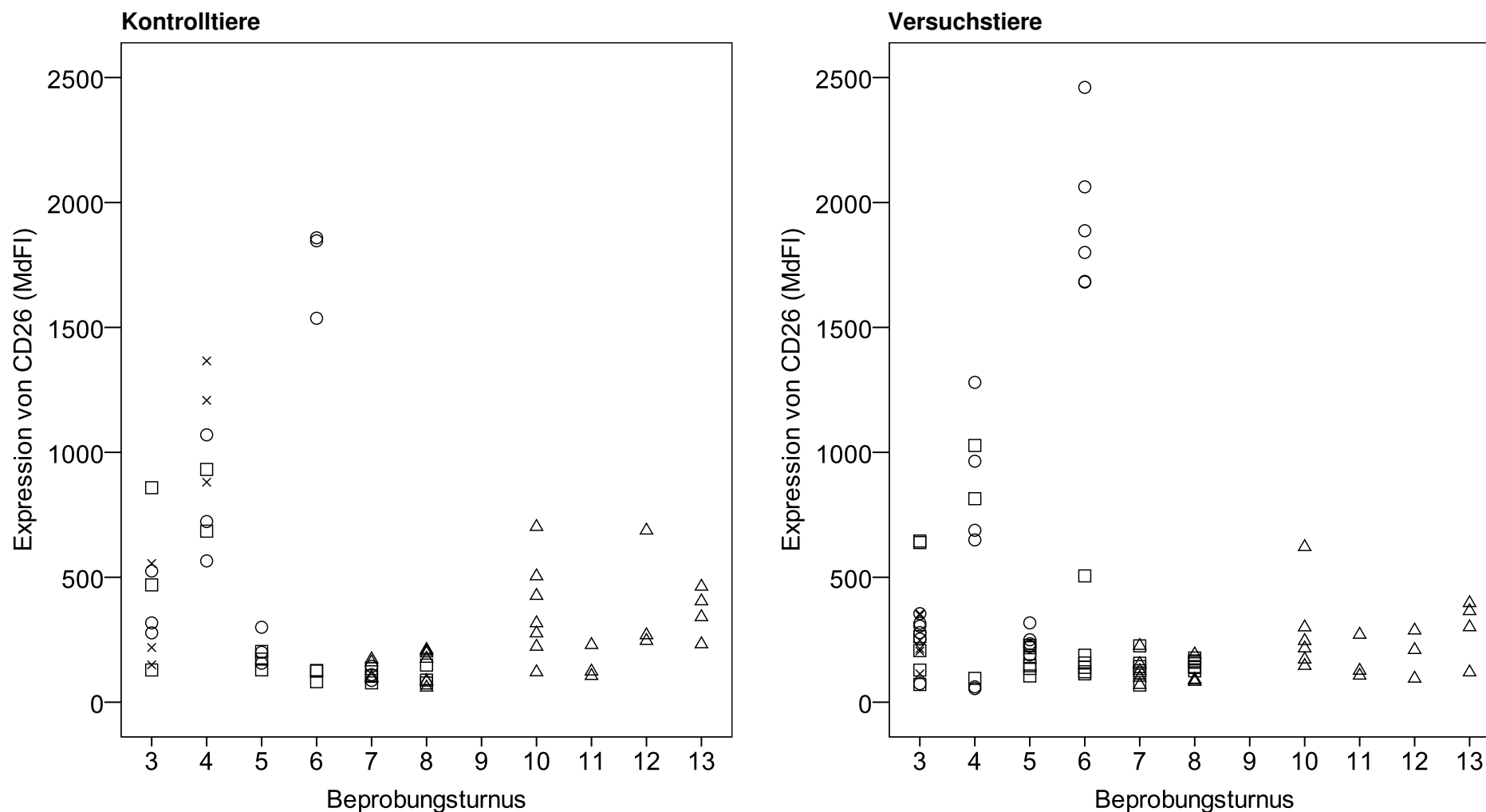


Abb. 15: Expression von CD26 auf unstimulierten CD4⁺ Gedächtniszellen von Kontroll- und Versuchstieren in einem Streudiagramm. Dargestellt sind die MdFI-Werte für den PE-Kanal. Jedes Symbol repräsentiert einen Messwert und bezeichnet die Versuchsgruppe des Tieres. x = K1 bzw. V1; o = K2 bzw. V2; □ = K3 bzw. V3; △ = K4 bzw. V4.

Das Verhältnis von CD25 zu CD26 war auf den untersuchten Zellen nicht immer gleich (Tab. 67 im Anhang). CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen zeigten in einzelnen BT eine signifikant höhere Expression von CD25 als von CD26; bei den CD8⁺ Gedächtniszellen kamen jedoch auch vereinzelt signifikant höhere Werte für den Nachweis von CD26 vor.

Gegenüber den Versuchstieren zeigten die Kontrolltiere vereinzelt eine signifikant höhere spontane Expression von CD25 auf den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen (Tab. 47). Die Versuchstiere wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikant höhere spontane Expressionen von CD25 oder CD26 auf als die Kontrolltiere.

Tab. 47: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den Mediumkontrollen der Kontroll- und der Versuchstiere. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

BT	Anzahl untersuchter Tiere (n)		Untersuchte VGr	p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen Kontroll- und Versuchstieren			
	KT	VT		CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺	
				CD25	CD26	CD25	CD26
3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3	,253	,253	,561	,106
4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3	,370	,236	,606	,321
5	6	12	K2, K3, V2, V3	,964	,494	,892	,125
6	6	12	K2, K3, V2, V3	,892	,494	,892	,750
7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4	,877	,523	,152	,479
8	10	10	K3, K4, V3, V4	<u>,004</u>	,912	<u>,019</u>	,699
10	7	6	K4, V4	<u>,001</u>	,366	,051	,181
11	3	3	K4, V4	,100	,700	1,000	,400
12	3	3	K4, V4	,300	,400	,100	,400
13	4	4	K4, V4	,200	,486	,057	,686

KT = Kontrolltiere; VT = Versuchstiere; VGr = Versuchsgruppe.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die MdFI-Werte bei Versuchstieren signifikant höher als bei Kontrolltieren. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

5.6.3 Induzierbarkeit von Änderungen in der Expression von CD25 und CD26 auf PBMC durch ConA

Anhand der Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass die untersuchten PBMC in der Lage waren, auf geeignete Stimulation hin die Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine zu variieren. Die Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen wurde bei Kontroll- sowie Versuchstieren durch ConA-Stimulation im Vergleich zur Mediumkontrolle durchgehend erhöht (Abb. 16, Abb. 17). Von BT 3

bis BT10 waren jeweils die Unterschiede zur Mediumkontrolle statistisch signifikant (Tab. 48). Die Expression von CD26 wurde durch die ConA-Stimulation weniger deutlich beeinflusst (Abb. 18, Abb. 19). Hier war die Expression von CD26 nur zeitweise statistisch signifikant erhöht; vereinzelt wurde nach Stimulation auch eine signifikant geringere Expression als in der Mediumkontrolle festgestellt (Tab. 48).

Tab. 48: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen stimulierten Proben und den Mediumkontrollen. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen stimulierten Proben und den Mediumkontrollen							
		JPPD (4 µg/ml)				ConA (1,5 µg/ml)			
		CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺	
BT		CD25	CD26	CD25	CD26	CD25	CD26	CD25	CD26
Kontrolltiere	3	,004	,039	,008	,250	,004	,652	,004	,250
	4	,148	<u>,008</u>	,547	,078	,008	<u>,008</u>	,008	<u>,008</u>
	5	,031	,156	,031	,563	,031	,094	,031	,844
	6	,563	,156	,313	,094	,031	1,000	,031	,688
	7	,002	,002	,002	,010	,002	,002	,002	,002
	8	,084	,002	,006	,004	,002	,004	,002	,002
	10	,016	,109	,016	,078	,016	,078	,016	,031
	11	,250	,250	,250	,250	,250	,250	,250	,250
	12	,750	,500	1,000	,500	,250	,250	,250	,250
	13	,125	,125	,125	,375	,125	,250	,125	1,000
Versuchstiere	3	,000	,000	,000	,000	,000	,083	,000	,393
	4	,004	,496	,004	,570	,004	<u>,039</u>	,004	<u>,039</u>
	5	,000	,000	,001	,001	,000	,009	,000	,016
	6	,012	,000	,042	,027	,005	,519	,012	,622
	7	,001	,001	,001	,001	,001	,001	,001	,001
	8	,002	,002	,002	,002	,002	,002	,002	,002
	10	,031	,031	,031	,031	,031	,688	,031	,219
	11	,250	,250	,250	,250	,250	,500	,250	,250
	12	,250	,250	,250	,250	,250	,750	,250	1,000
	13	,125	,125	,125	,125	,125	,125	,125	,625

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die MdFI-Werte der stimulierten Probe signifikant höher als die der Mediumkontrolle. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

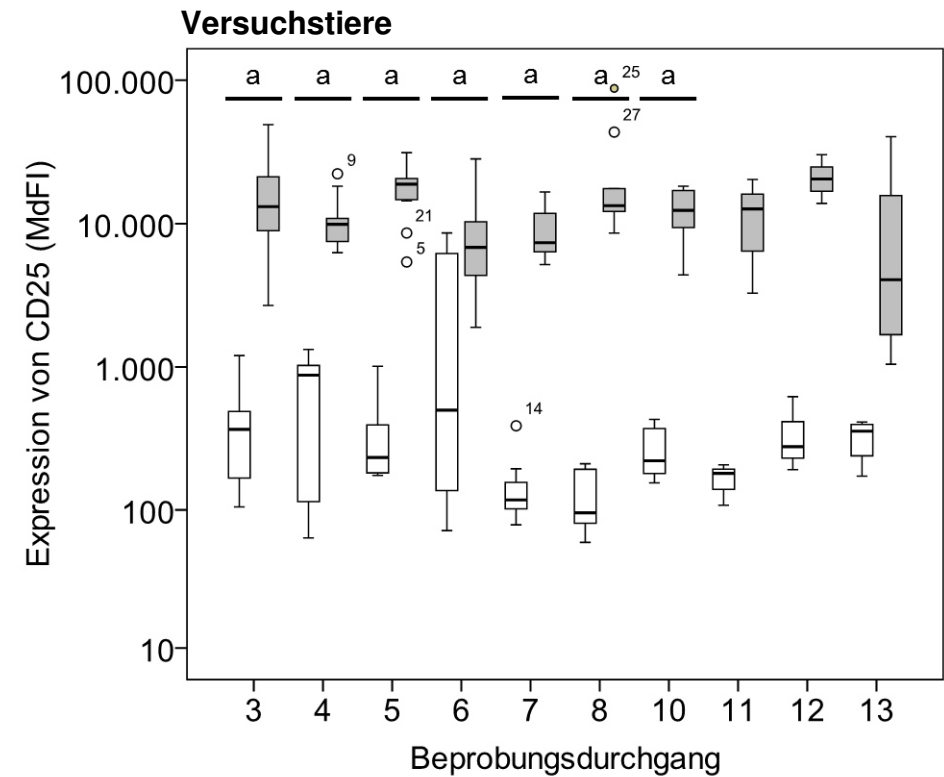
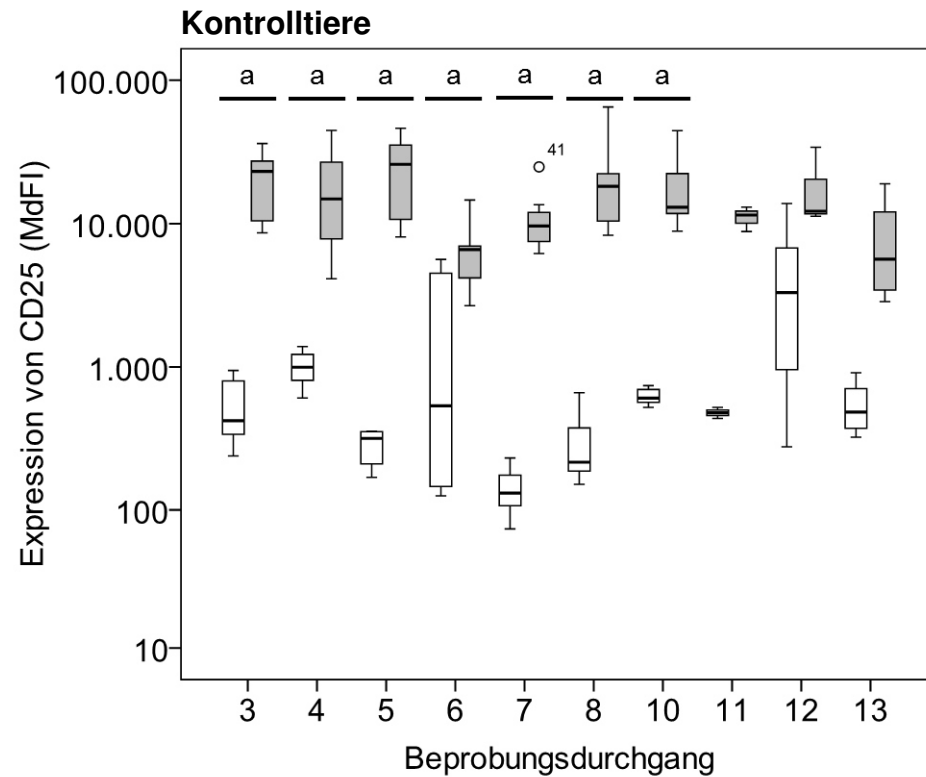


Abb. 16: Expression von CD25 auf CD4⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).

□ = Mediumkontrolle ; ■ = ConA-Stimulation; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI der Mediumkontrolle und der ConA-Stimulation.

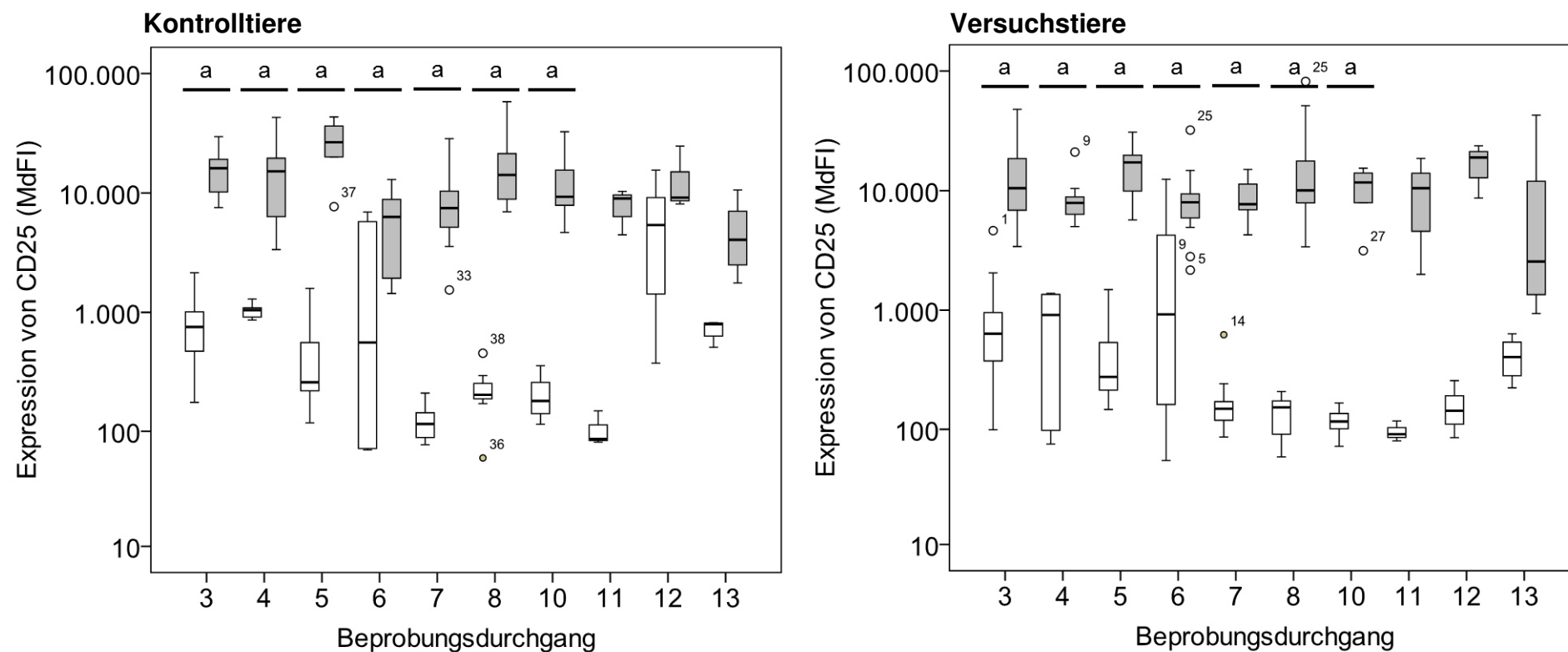


Abb. 17: Expression von CD25 auf CD8⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).

□ = Mediumkontrolle ; ■ = ConA-Stimulation; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI der Mediumkontrolle und der ConA-Stimulation.

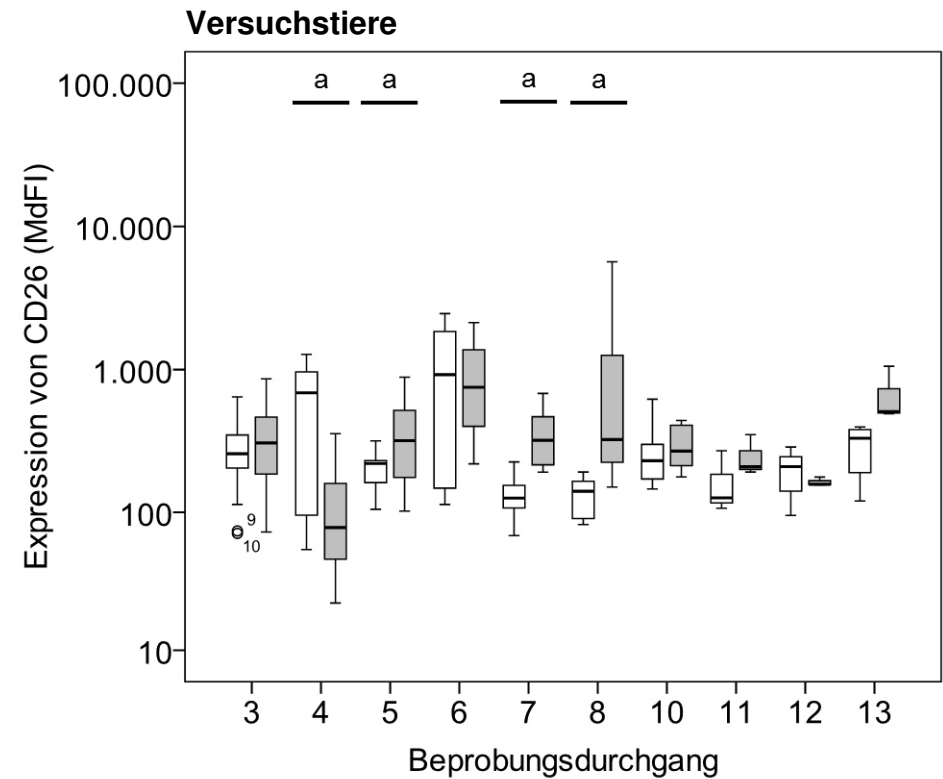
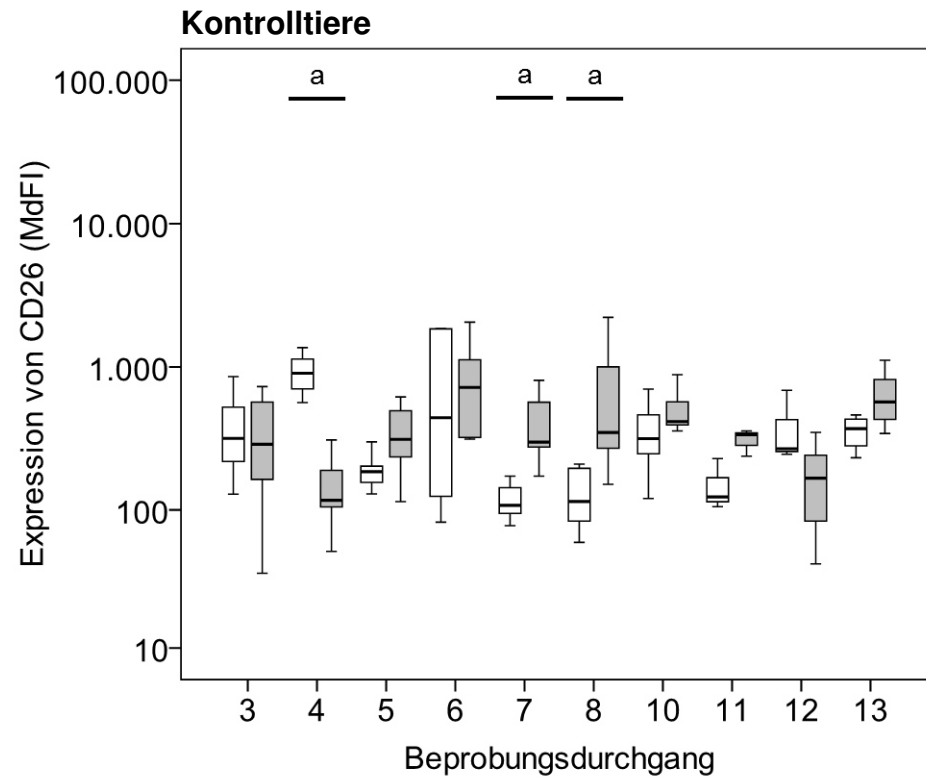


Abb. 18: Expression von CD26 auf CD4⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).

□ = Mediumkontrolle ; ■ = ConA-Stimulation; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI der Mediumkontrolle und der ConA-Stimulation.

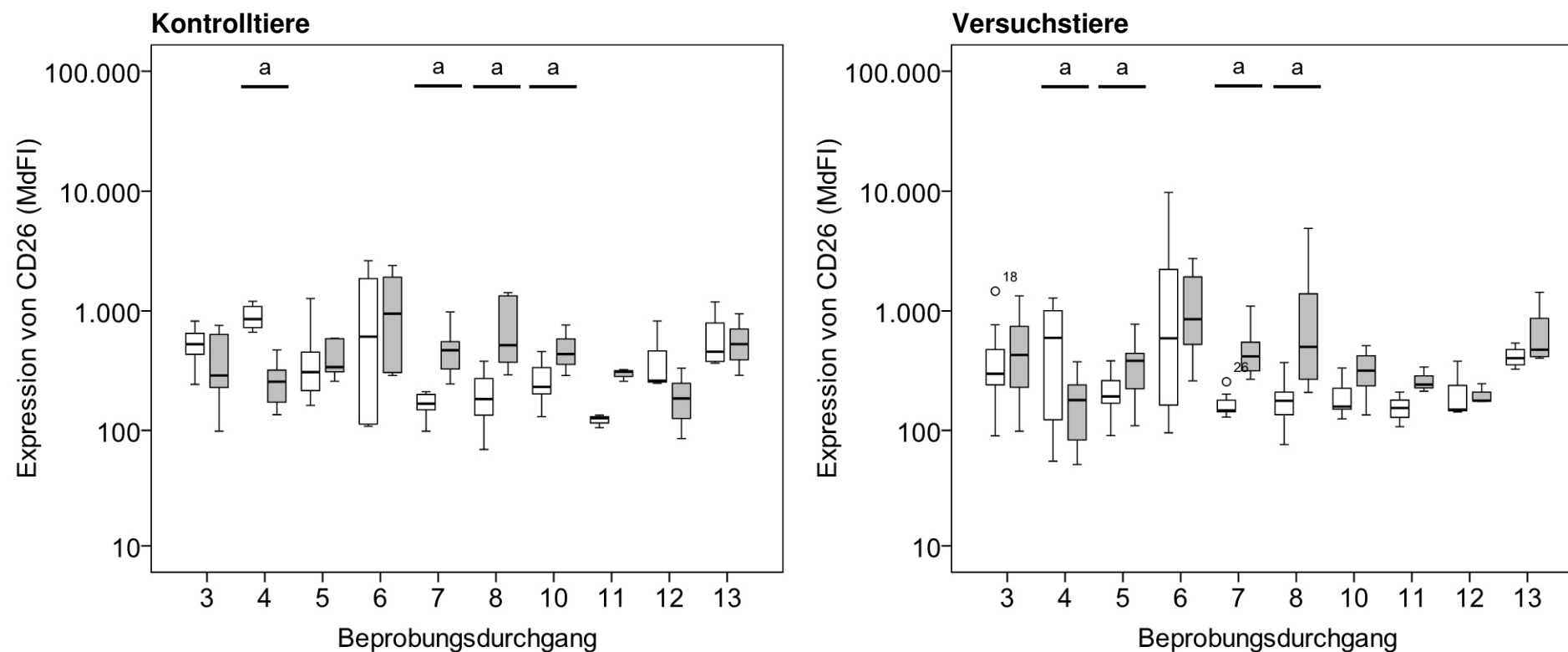


Abb. 19: Expression von CD26 auf CD8⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).

□ = Mediumkontrolle ; ■ = ConA-Stimulation; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI der Mediumkontrolle und der ConA-Stimulation.

Zwischen den Kontroll- und Versuchstieren unterschieden sich die Expressionsniveaus von CD25 und CD26 nach ConA-Stimulation zu keinem Zeitpunkt signifikant (Tab. 49).

Tab. 49: p-Werte beim Vergleich der MdFI- bzw. MdFI_Q-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den mit ConA stimulierten PBMC der Kontroll- und der Versuchstiere. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

Anzahl untersuchter Tiere (n)				p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen Kontroll- und Versuchstieren				
BT	KT	VT	Untersuchte VGr	CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		
				CD25	CD26	CD25	CD26	
MdFI	3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3	,348	,900	,232	,382
	4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3	,423	,236	,277	,139
	5	6	12	K2, K3, V2, V3	,291	1,000	,083	,682
	6	6	12	K2, K3, V2, V3	,820	,892	,291	,820
	7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4	,557	,592	,512	,795
	8	10	10	K3, K4, V3, V4	,579	1,000	,579	,796
	10	7	6	K4, V4	,534	,051	1,000	,138
	11	3	3	K4, V4	1,000	,400	,700	,700
	12	3	3	K4, V4	,700	1,000	1,000	1,000
	13	4	4	K4, V4	,686	,686	,686	,886
MdFI _Q	3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3	,596	,298	,433	,067
	4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3	,815	,606	,963	,606
	5	6	12	K2, K3, V2, V3	,437	,682	,180	,616
	6	6	12	K2, K3, V2, V3	,964	,494	,750	,892
	7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4	,918	,468	,863	,863
	8	10	10	K3, K4, V3, V4	,063	,912	,481	,912
	10	7	6	K4, V4	,051	,731	,234	,945
	11	3	3	K4, V4	,100	1,000	,700	,400
	12	3	3	K4, V4	,200	,200	,100	,200
	13	4	4	K4, V4	,886	1,000	,886	,886

KT = Kontrolltiere; VT = Versuchstiere; VGr = Versuchsgruppe.

5.6.4 Expression von CD25 bzw. CD26 auf restimulierten PBMC

Um die Änderung der Expressionsstärken von CD25 und CD26 als Reaktion der PBMC auf die Stimulation mit JPPD statistisch abzusichern, wurden die Expressionsstärken bei stimulierten Proben statistisch gegen die in den Mediumkontrollen getestet. Die Versuchstiere setzten sich in diesem Vergleich deutlich von den Kontrolltieren ab (Tab. 48). Bei den Versuchstieren induzierte JPPD fast durchgehend die Expression von CD25 und CD26 in den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-

zellen. Von BT 3 bis BT 10 (mit Ausnahme von BT 4 für CD26) war die Expression von CD25 und CD26 nach JPPD-Stimulation statistisch signifikant höher als in der Mediumkontrolle. Bei den Kontrolltieren hingegen war die Expressionssteigerung durch JPPD insgesamt deutlich geringer. Hier wurden in zwei bis fünf BT signifikante Unterschiede gegenüber der Mediumkontrolle gefunden. Die Expression von CD25 zeigte sich dabei häufiger gegenüber der Mediumkontrolle signifikant erhöht als die Expression von CD26. Für keines der Aktivierungsmoleküle kam es bei den Kontrolltieren in mehr als drei aufeinander folgenden BT zu einem signifikanten Unterschied.

Die Kontrolltiere zeigten, im Gegensatz zu den Versuchstieren für CD26, keine erkennbare Entwicklung der Aktivierungsmolekül-Expression über die Zeit (Abb. 20, Abb. 21). Der zeitliche Verlauf der Expression bei den Versuchstieren unterschied sich zwischen CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen wenig, weshalb die folgenden Beschreibungen für beide Subpopulationen der Versuchstiere gelten: Die absolute Expression von CD25 war über den Versuchsverlauf hinweg Schwankungen unterlegen, ein spezifischer Verlauf war dabei aber nicht erkennbar. Die Expression von CD26 hingegen zeigte einen Anstieg bis BT 6 bzw. BT 7 und eine Rückkehr zum Ausgangsniveau in BT 12 und BT 13. Auf den CD4⁺ Gedächtniszellen war die Expression von CD26 ab BT 6 über fünf untersuchte BT hinweg stark erhöht, auf den CD8⁺ Gedächtniszellen jedoch sank die Expression nach Erreichen des Gipfels in BT 7 wieder ab.

Die Expression von CD25 nach JPPD-Stimulation war unabhängig von der untersuchten Lymphozytensubpopulation oftmals signifikant höher als die von CD26 (Tab. 67 im Anhang). Dies galt v.a. für die Versuchstiere.

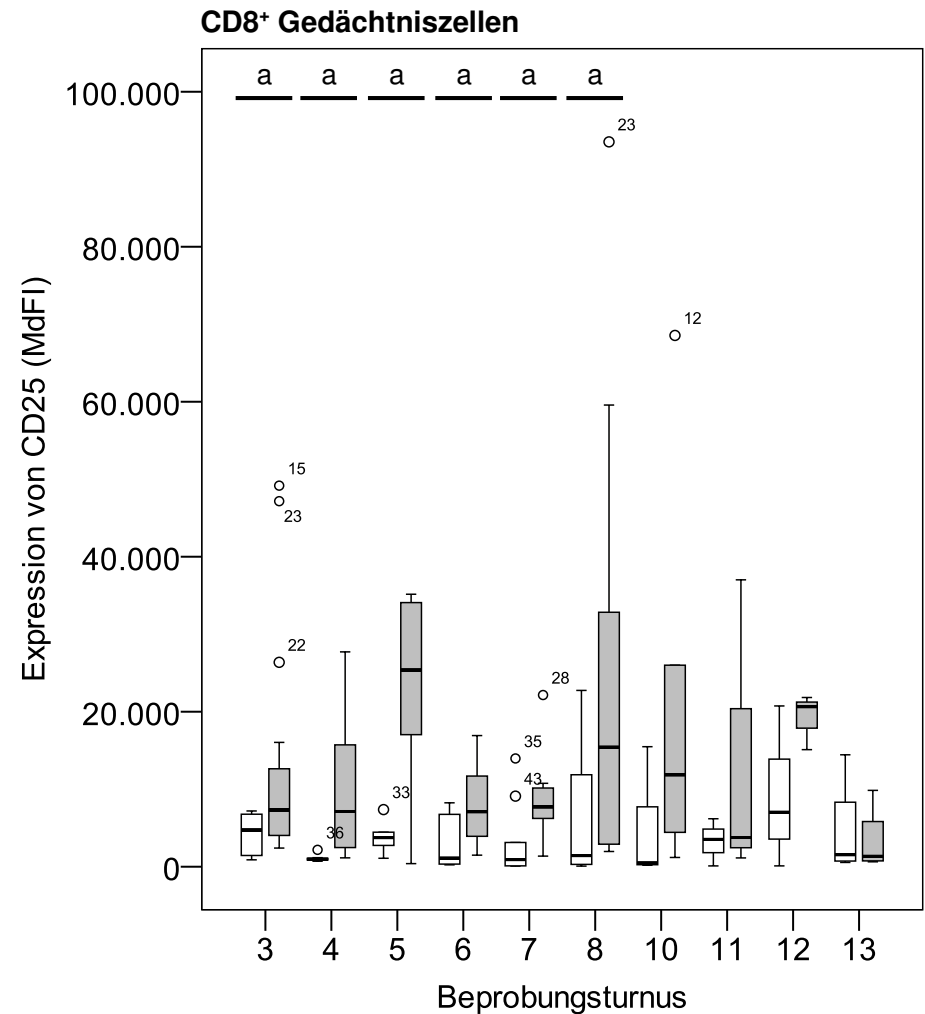
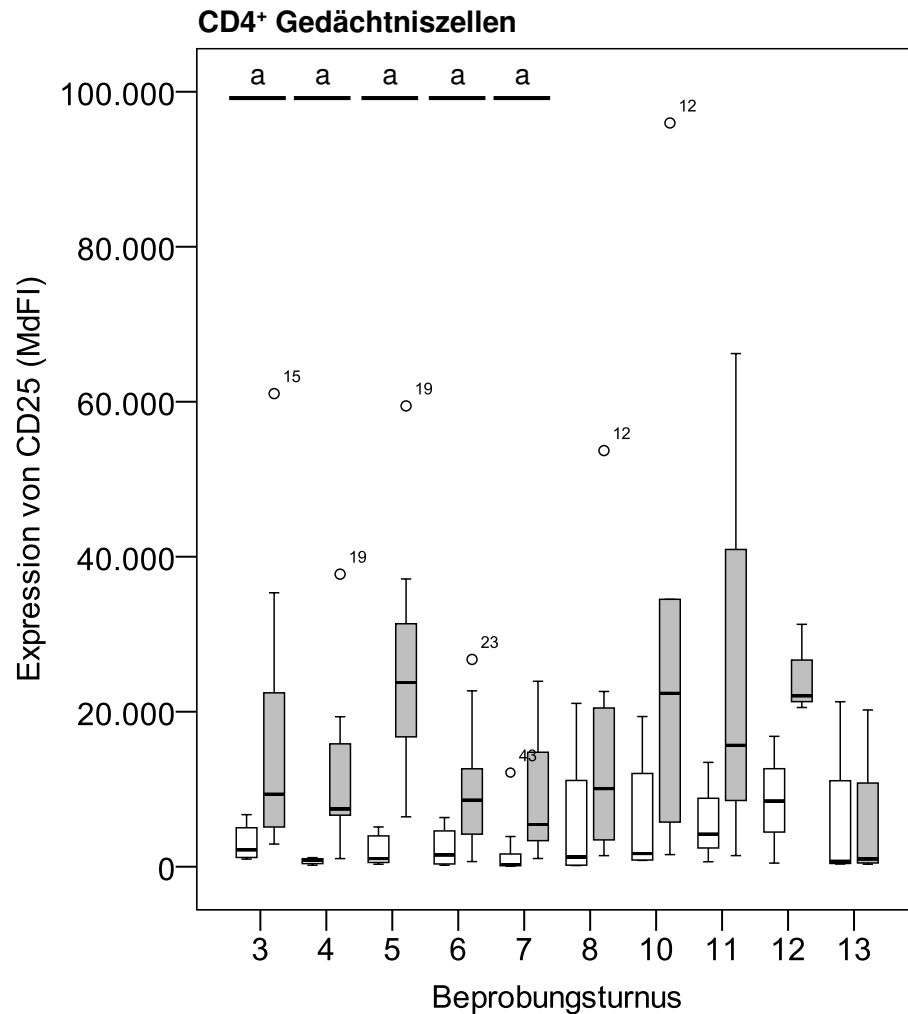


Abb. 20: Expression von CD25 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen nach Stimulation mit JPPD in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI-Werte der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2).
 □ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

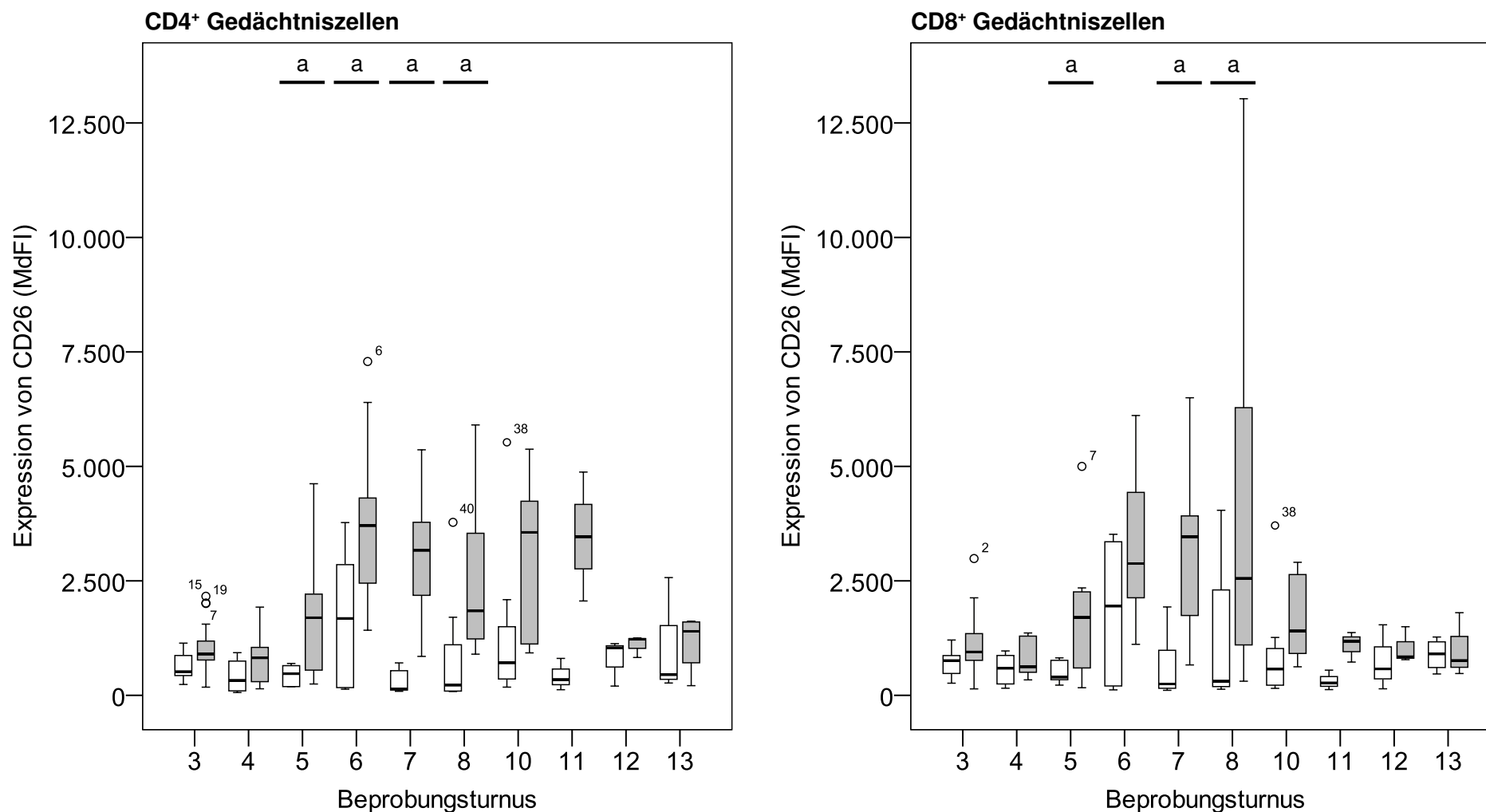


Abb. 21: Expression von CD26 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen nach Stimulation mit JPPD in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt sind die MdFI-Werte der Kontroll- bzw. Versuchstiere für den PE-Kanal in Box-Whisker-Plots (siehe 4.9.2). □ = Kontrolltiere; ■ = Versuchstiere; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den MdFI-Werten der Kontroll- und der Versuchstiere.

Die absolute Expression von CD25 und CD26 nach JPPD-Stimulation, gemessen am MdFI, war bei den Versuchstieren in mehreren BT signifikant höher als die der Kontrolltiere (Tab. 50, Abb. 20, Abb. 21). Die mittleren Ränge im Mann-Whitney-U-Test waren mit Ausnahme des BT 13 immer bei den Versuchstieren höher als bei den Kontrolltieren. Für die Expression von CD25 der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen konnten von BT 3 bis BT 7 bzw. BT 8 signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren festgestellt werden. Bei der Expression von CD26 zeigten sich diese erst ab BT 5 und auf CD8⁺ Gedächtniszellen nicht durchgängig bis BT 8.

Tab. 50: p-Werte beim Vergleich der MdFI- bzw. MdFI_Q-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den mit JPPD stimulierten PBMC der Kontroll- und der Versuchstiere. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

Anzahl untersuchter Tiere (n)				p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen Kontroll- und Versuchstieren				
				CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		
BT	KT	VT	Untersuchte VGr	CD25	CD26	CD25	CD26	
MdFI	3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3	,000	,067	,023	,085
	4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3	,000	,093	,000	,370
	5	6	12	K2, K3, V2, V3	,000	,018	,010	,024
	6	6	12	K2, K3, V2, V3	,013	,041	,024	,102
	7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4	,002	,000	,013	,000
	8	10	10	K3, K4, V3, V4	,063	,004	,023	,023
	10	7	6	K4, V4	,073	,073	,101	,138
	11	3	3	K4, V4	,400	,100	,700	,100
	12	3	3	K4, V4	,100	,400	,400	,700
	13	4	4	K4, V4	1,000	,886	,886	,886
MdFI _Q	3	9	18	K1, K2, K3, V1, V2, V3	,002	,012	,076	,027
	4	8	9	K1, K2, K3, V2, V3	,000	,027	,000	,074
	5	6	12	K2, K3, V2, V3	,000	,024	,053	,018
	6	6	12	K2, K3, V2, V3	,180	,083	,180	,335
	7	10	11	K2, K3, K4, V3, V4	,001	,000	,020	,000
	8	10	10	K3, K4, V3, V4	,009	,001	,009	,007
	10	7	6	K4, V4	,035	,022	,035	,035
	11	3	3	K4, V4	,200	,100	,700	,100
	12	3	3	K4, V4	,100	,200	,100	,100
	13	4	4	K4, V4	,200	,343	,343	,886

KT = Kontrolltiere; VT = Versuchstiere; VGr = Versuchsgruppe.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Es sind jeweils die MdFI- bzw. MdFI_Q-Werte bei den Versuchstieren signifikant höher als bei Kontrolltieren.

Die relative Expression von CD25 und CD26 nach JPPD-Stimulation, quantifiziert mittels MdFI_Q, zeigte unabhängig von der betrachteten Lymphozytensubpopulation im Mann-Whitney-U-Test zu jedem Zeitpunkt für die Versuchstiere einen höheren mittleren Rang als für die Kontrolltiere. Statistisch signifikant waren die Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren allerdings nicht zu jedem Zeitpunkt (Tab. 50). Die meisten signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren konnten für die Expression von CD25 und CD26 bei den CD4⁺ Gedächtniszellen ermittelt werden (BT 3 bis BT 10, mit Ausnahme von BT 6). Auf den CD8⁺ Gedächtniszellen gab es für die Unterschiede zwischen entsprechenden Expressionen in den BT 3-5 teilweise keine statistische Signifikanz.

5.6.5 Diagnostische Präzision bei der Anwendung des Tests zur Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren

Die hier untersuchten, durch JPPD induzierten Veränderungen der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen wurden auf Einzeltierebene auf ihre Eignung für diagnostische Zwecke getestet (wie in 4.8 beschrieben). Dabei wurden für die Bestimmung des Grenzwertes zum einen die MdFI-Werte und zum anderen die MdFI_Q-Werte für den Nachweis der Aktivierungsmoleküle verwendet.

Betrachtete man den Nachweis von CD25 auf CD4⁺ Gedächtniszellen nach JPPD-Stimulation, ergaben sich nur bei der Testung auf Grundlage der MdFI_Q-Werte konsistent Richtig-Negativ-Raten zwischen 90 und 100 % (Tab. 51). Bei dieser Testung waren auch die Richtig-Positiv-Raten über den Versuchsverlauf gesehen am höchsten. Mit einer Ausnahme (16,7 % in BT 6) rangierten diese von BT 4 bis BT 12 von 33,33 bis 66,67 %. Alle anderen Messparameter, die hier getestet wurden, zeigten vermehrt falsch-positive Ergebnisse (in einzelnen BT Richtig-Negativ-Rate nur 66,67 oder 85,7 %) und erreichten geringere Richtig-Positiv-Raten. Die Beurteilung anhand des Nachweises von CD26 nach JPPD-Stimulation war dabei allgemein weniger geeignet als die anhand des Nachweises von CD25.

Tab. 51: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten bei Differenzierung auf Grundlage von MdFI- bzw. MdFI_Q-Werten für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen nach JPPD-Stimulation (4 µg/ml). Dargestellt sind die berechneten Grenzwerte (GW) sowie die Richtig-Negativ-Rate und die Richtig-Positiv-Rate bei Anwendung des jeweiligen Parameters in der Einzeltiertestung in Abhängigkeit vom BT. Ergebnisse wurden dafür als positiv angesehen, wenn sie den GW überschritten. Dieser entspricht dem Mittelwert der Gesamtergebnisse der Kontrolltiere addiert mit der dreifachen Standardabweichung.

	BT	MdFI				MdFI _Q			
		CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺	
		CD25	CD26	CD25	CD26	CD25	CD26	CD25	CD26
GW	/	20.997	3.765	19.983	3.639	69,977	14,225	98,588	12,231
Richtig-Negativ-Rate [%]	3	100	100	100	100	100	100	100	100
	4	100	100	100	100	100	100	100	100
	5	100	100	100	100	100	100	100	100
	6	100	83,3	100	100	100	83,3	100	100
	7	100	100	100	100	100	100	100	100
	8	90	90	90	90	90	90	90	90
	10	100	85,7	100	85,7	100	85,7	85,7	85,7
	11	100	100	100	100	100	100	100	100
	12	100	100	66,7	100	100	100	100	100
	13	66,7	100	100	100	100	100	100	100
Richtig-Positiv-Rate [%]	3	33,3	0	16,7	0	27,8	5,6	16,7	0
	4	11,1	0	11,1	0	33,3	11,1	22,2	0
	5	66,7	16,7	58,3	8,3	58,3	16,7	58,3	33,3
	6	16,7	33,3	0	41,7	16,7	33,3	0	25
	7	18,2	27,3	9,1	45,5	36,4	81,8	9,1	72,7
	8	20	20	40	40	50	60	40	70
	10	50	33,3	33,3	0	66,7	33,3	66,7	33,3
	11	33,3	33,3	33,3	0	66,7	100	33,3	0
	12	66,7	0	66,7	0	66,7	0	66,7	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0

5.7 Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern der zellvermittelten Immunität und dem Infektionsverlauf

Anhand der bisher untersuchten Parameter wurden Zusammenhänge zwischen dem Infektionsstatus der einzelnen Tiere und ihrer zellulären Immunantwort hergestellt. Dafür wurden anhand der Ergebnisse aus 5.1 Teilgruppen von Tieren definiert (Tab. 52). Diese Teilgruppen wurden nachfolgend hinsichtlich der Parameter, die die zelluläre Immunantwort widerspiegeln, verglichen.

5.7.1 Definition der Teilgruppen für den kulturellen MAP-Nachweis in Kot- und Organproben und die MAP-spezifische Antikörperreaktion

Für die Ergebnisse des kulturellen MAP-Nachweises in Kotproben wurden drei Teilgruppen definiert: Kurzausscheider, Dauerausscheider und Unbestimmt. Die erste Gruppe umfasste Tiere, die nur vorübergehend (max. bis BT 3) MAP ausschieden ($n = 8$). Die zweite Gruppe enthielt Tiere, die anhaltend oder intermittierend MAP ausschieden (kein Ende der Ausscheidung erkennbar; $n = 13$). In eine dritte Gruppe wurden Tiere einsortiert, die nicht eindeutig in die erste oder zweite Gruppe eingeordnet werden konnten ($n = 7$). Dies war meistens dann der Fall, wenn sie für diese Zuordnung zu früh aus dem Versuch genommen wurden.

Hinsichtlich der MAP-spezifischen Antikörperreaktion wurde unterschieden zwischen Tieren, die keinen positiven Antikörpertiter entwickeln (AK negativ; $n = 4$), solchen, die dauerhaft einen positiven Titer erreichen (AK positiv; $n = 16$) und solchen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können (Unbestimmt; $n = 8$). Die Tiere, die nicht eindeutig zugeordnet wurden, hatten bis auf einen Fall (Tier 7 in BT 2) nie ein positives Ergebnis im ELISA (*ID Screen® Paratuberculosis Indirect*), hätten aber bei längerer Verweildauer im Versuch möglicherweise noch eine positive Antikörperreaktion entwickeln können.

Die Ergebnisse des kulturellen MAP-Nachweises in Organproben zum Sektionszeitpunkt waren für V1, V2 und V3 innerhalb der Versuchsgruppe jeweils relativ homogen (WI vorwiegend 25 bis über 75 für V1 und 0 bis 75 für V2 und V3). Nur in V4 zeigten die Tiere untereinander deutliche Unterschiede, denen folgend drei Teilgruppen festgelegt wurden. Dabei wurde unterschieden zwischen Tieren, die in den Organproben keinen Nachweis von MAP ($n = 1$), eine moderate Bakterienlast

(WI vorwiegend 0 bis 25; n = 3), oder eine hohe Bakterienlast (WI vorwiegend über 75; n = 3) aufwiesen. Diese werden zur Vereinfachung im Weiteren „Kultur negativ“ (Kn), paucibazillär (PB) und multibazillär (MB) genannt. PB und MB deshalb, weil bei immunhistochemischen Untersuchungen von Organproben derselben Tiere bei den Tieren mit einer moderaten Bakterienlast paucibazilläre Läsionen und bei den Tieren mit einer hohen Bakterienlast multibazilläre Läsionen gefunden wurden (Krüger, Köhler *et al.* 2014).

Während die Dauerausscheider ausnahmslos auch zur Teilgruppe AK positiv gehörten, waren unter den Kurzausscheidern vier Tiere in der Teilgruppe AK negativ, ein Tier gehörte zu AK positiv und drei Tiere waren nicht eindeutig zuzuordnen.

Die Versuchstiere, die im IL-10-Test und mittels Genexpressionsanalyse untersucht wurden (V4), waren überwiegend Dauerausscheider und gleichzeitig AK positiv. Nur bei zwei Tieren verhielt es sich anders: Tier 28 war der Ausscheidung nach nicht eindeutig zuzuordnen, zeigte aber eine positive Antikörperreaktion und Tier 13 zeigte weder eine andauernde Ausscheidung von MAP noch eine positive Antikörperreaktion. Bei Tier 13 konnte darüber hinaus auch in den untersuchten Organproben kein Nachweis von MAP bzw. MAP-spezifischen Veränderungen erbracht werden. Die anderen Tiere aus V4 hingegen zeigten eine moderate oder hohe Bakterienlast in den Organproben.

Tab. 52: Einteilung der Versuchstiere in Teilgruppen, basierend auf ihren Befunden hinsichtlich ihrer Ausscheidung von, ihrer Immunantwort auf bzw. ihrer Besiedelung mit MAP. Dargestellt sind die Zuordnungen zu den definierten Teilgruppen für jedes Versuchstier. Darüber hinaus ist die jeweilige Tiernummer aus der Veröffentlichung von Krüger, Köhler, Liebler-Tenorio (2014) angegeben, da diese eine andere Zuordnung verwendet haben (Tier 20 und Tier 24 wurden dort nicht immunhistochemisch untersucht).

VGr	Tiernr.	Kultureller MAP-Nachweis in Kotproben	MAP-spezifische Antikörperreaktion	Kultureller MAP- Nachweis in Organproben	Tiernummer bei Krüger, Köhler, Liebler-Tenorio (2014)
		1 = Kurz- ausscheider 2 = Dauer- ausscheider 3 = Unbestimmt	0 = AK negativ 1 = AK positiv 2 = Unbestimmt	0 = Kultur negativ 1 = Paucibazillär 2 = Multibazillär	
V1	1	2	1		1
V1	2	2	1		3
V1	3	3	2		5
V1	15	1	2		6
V1	16	1	2		4
V1	17	3	2		2
V1	18	2	2		7
V2	4	3	1		8
V2	6	1	0		12
V2	7	1	2		13
V2	10	1	0		10
V2	19	1	1		9
V2	20	3	2		-
V2	21	2	1		11
V3	5	2	1		14
V3	8	2	1		16
V3	9	2	1		18
V3	22	2	1		15
V3	23	3	1		17
V3	24	3	2		-
V3	25	1	0		19
V4	11	2	1	2	20
V4	12	2	1	1	21
V4	13	1	0	0	23
V4	14	2	1	1	25
V4	26	2	1	2	22
V4	27	2	1	2	24
V4	28	3	1	1	26

5.7.2 Die zelluläre Immunantwort bei Kurzausscheidern bzw. Dauerausscheidern

Während sich in der spontanen IFN- γ -Freisetzung beim Vergleich zwischen Kurz- und Dauerausscheidern keine deutlichen Unterschiede zeigten (nicht dargestellt), waren nach Stimulation mit JPPD, APPD und ConA Unterschiede in der Freisetzung von IFN- γ auszumachen. Am deutlichsten waren diese anhand der S/P-Ratios nach JPPD-Stimulation festzustellen (Abb. 22). Signifikante Unterschiede zwischen den Kurz- und Dauerausscheidern ergaben sich jedoch unabhängig vom Stimulationsansatz nur für wenige BT (Tab. 68 A im Anhang, Abb. 22, Abb. 23).

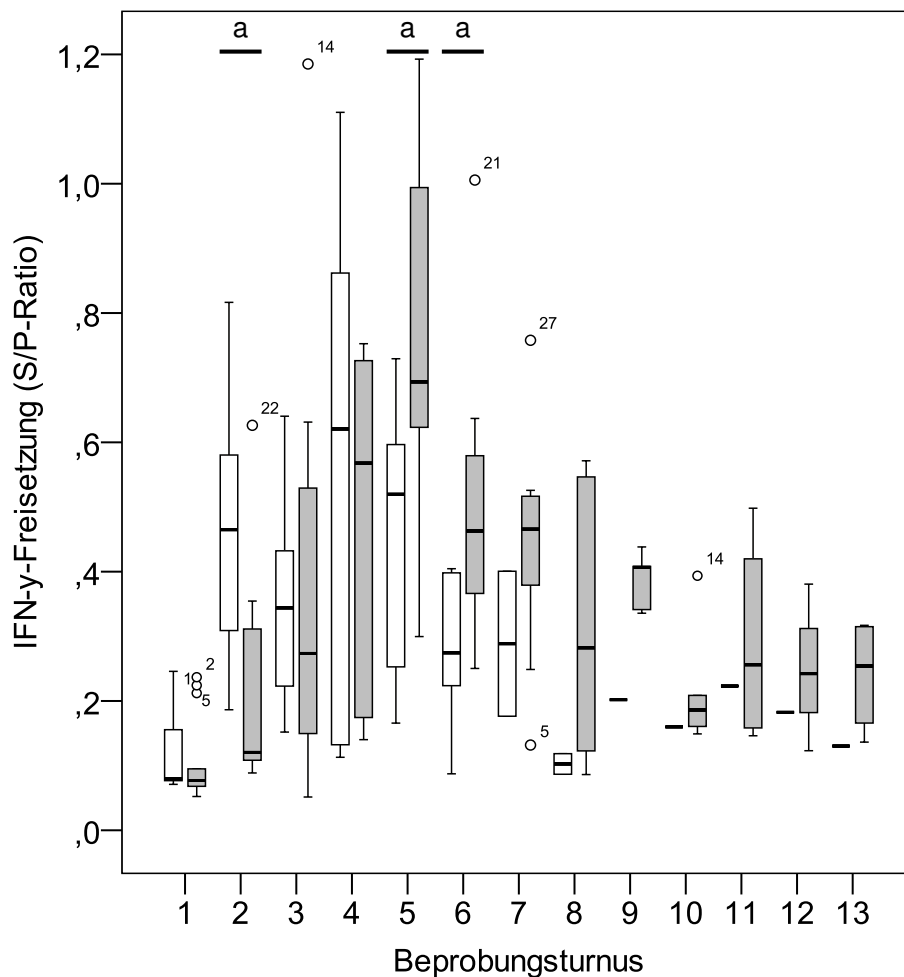


Abb. 22: IFN- γ -Freisetzung der mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h mit JPPD (4 μ g/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).

□ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den S/P-Ratios der Kurz- und der Dauerausscheider.

Es ließen sich nach JPPD-Stimulation bei den PBMC der Kurzausscheider in den ersten vier BT höhere Mediane festhalten als bei den Dauerausscheidern. Von BT 5 an sank das Niveau der IFN- γ -Freisetzung bei den Kurzausscheidern, während es bei den Dauerausscheidern erst ab BT 6 sank. Daher fiel die Freisetzung von IFN- γ bei den Kurzausscheidern von BT 5 bis BT 9 unter das Niveau der Dauerausscheider ab.

Diese Unterschiede spiegelten sich in Ansätzen auch in den Reaktionen auf die Stimulation mit APPD bzw. ConA wider (Abb. 23). Hier zeigten PBMC einzelner Tiere der Kurzausscheider in BT 1, BT 2 und BT 4 teilweise deutlich höhere S/P-Ratios als die der Dauerausscheider. Der Median lag allerdings über den gesamten Versuchsverlauf gesehen zumeist unter dem der Dauerausscheider.

Bei der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen traten hingegen vor allem in der Mediumkontrolle deutliche Unterschiede zwischen Kurz- und Dauerausscheidern auf (Abb. 24, Abb. 25). Beide Aktivierungsmoleküle wurden unabhängig von der betrachteten Lymphozytensubpopulation auf Zellen von Kurzausscheidern von BT 3 bis BT 6 höher exprimiert als bei solchen von Dauerausscheidern. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kurz- und den Dauerausscheidern waren jedoch weder in den unstimulierten noch in den mit JPPD stimulierten PBMC auszumachen (Tab. 68 B im Anhang).

In den Stimulationsansätzen mit JPPD wiederum konnte kein Unterschied zwischen den Kurzausscheidern und den Dauerausscheidern bei Betrachtung des MdFI festgestellt werden (Abb. 26, Abb. 27).

Ergebnisse der Genexpressionsanalysen bzw. des IL-10-Tests lagen bei den Versuchstieren lediglich für V4 vor. Da in V4 mit Ausnahme eines Tieres alle Tiere Dauerausscheider waren, wurde der Vergleich zwischen den Teilgruppen für diese Parameter nicht durchgeführt.

5.7.3 Die zelluläre Immunantwort bei den Teilgruppen AK negativ bzw. AK positiv

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Teilgruppen Kurzausscheider und AK negativ bzw. der Teilgruppen Dauerausscheider und AK positiv wird hier auf eine Beschreibung der im letzten Kapitel behandelten Parameter verzichtet. Der Vergleich der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurde ebenfalls unterlassen, da die auf Genexpressionsebene untersuchten Tiere mit Ausnahme eines Tieres der Teilgruppe AK positiv zugeordnet waren.

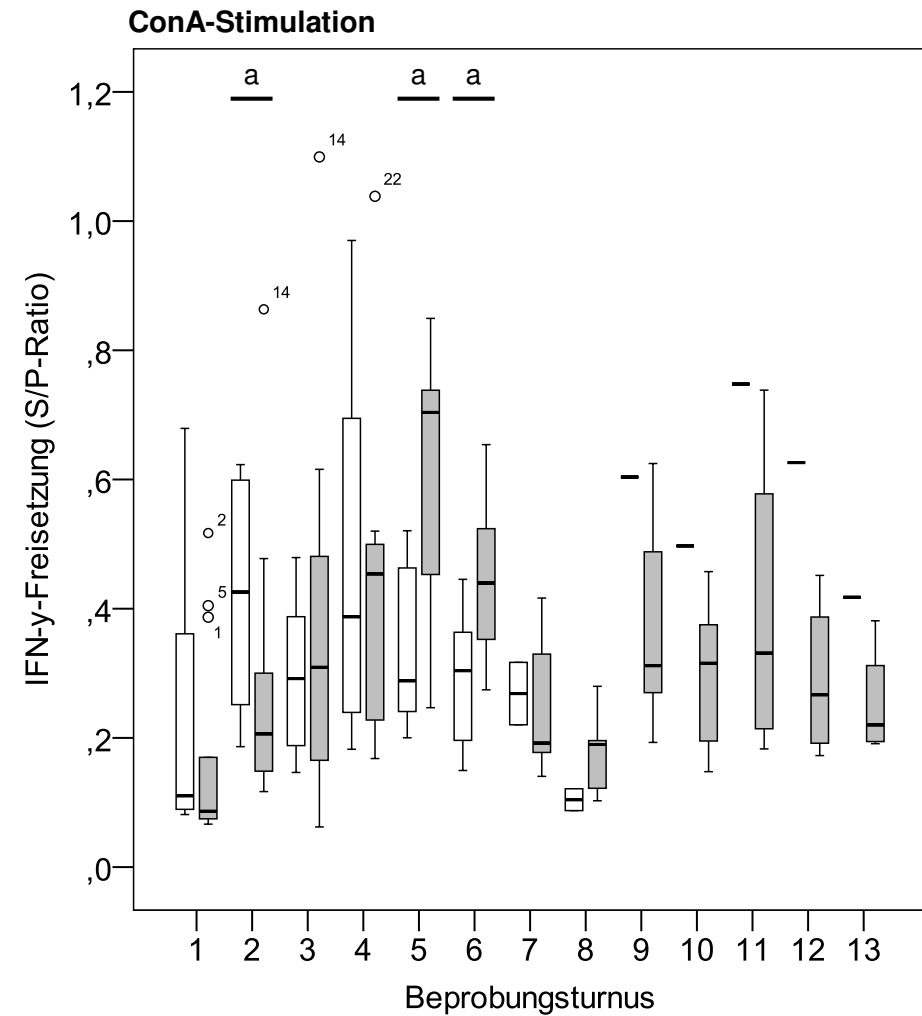
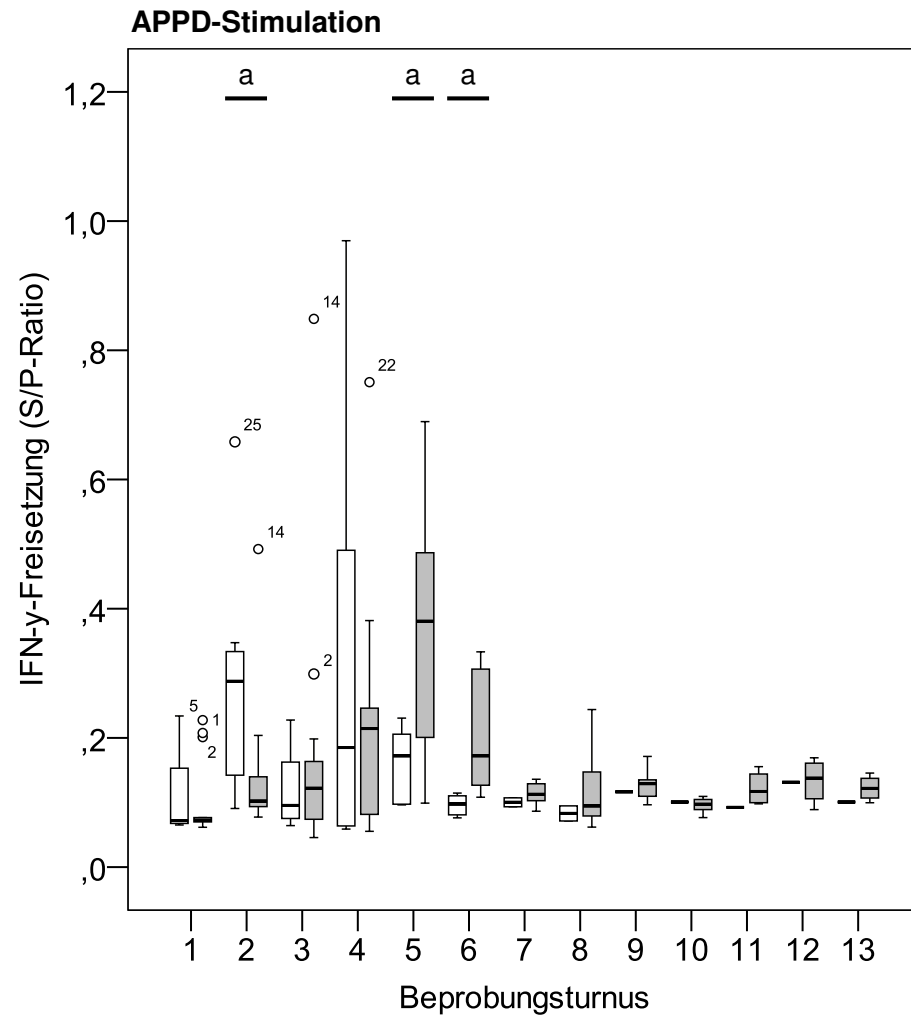


Abb. 23: IFN- γ -Freisetzung der mit APPD bzw. ConA stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h mit APPD (125 I.E./ml) bzw. mit ConA (20 μ g/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider; (a) = signifikante Unterschiede zwischen den S/P-Ratios der Kurz- und der Dauerausscheider.

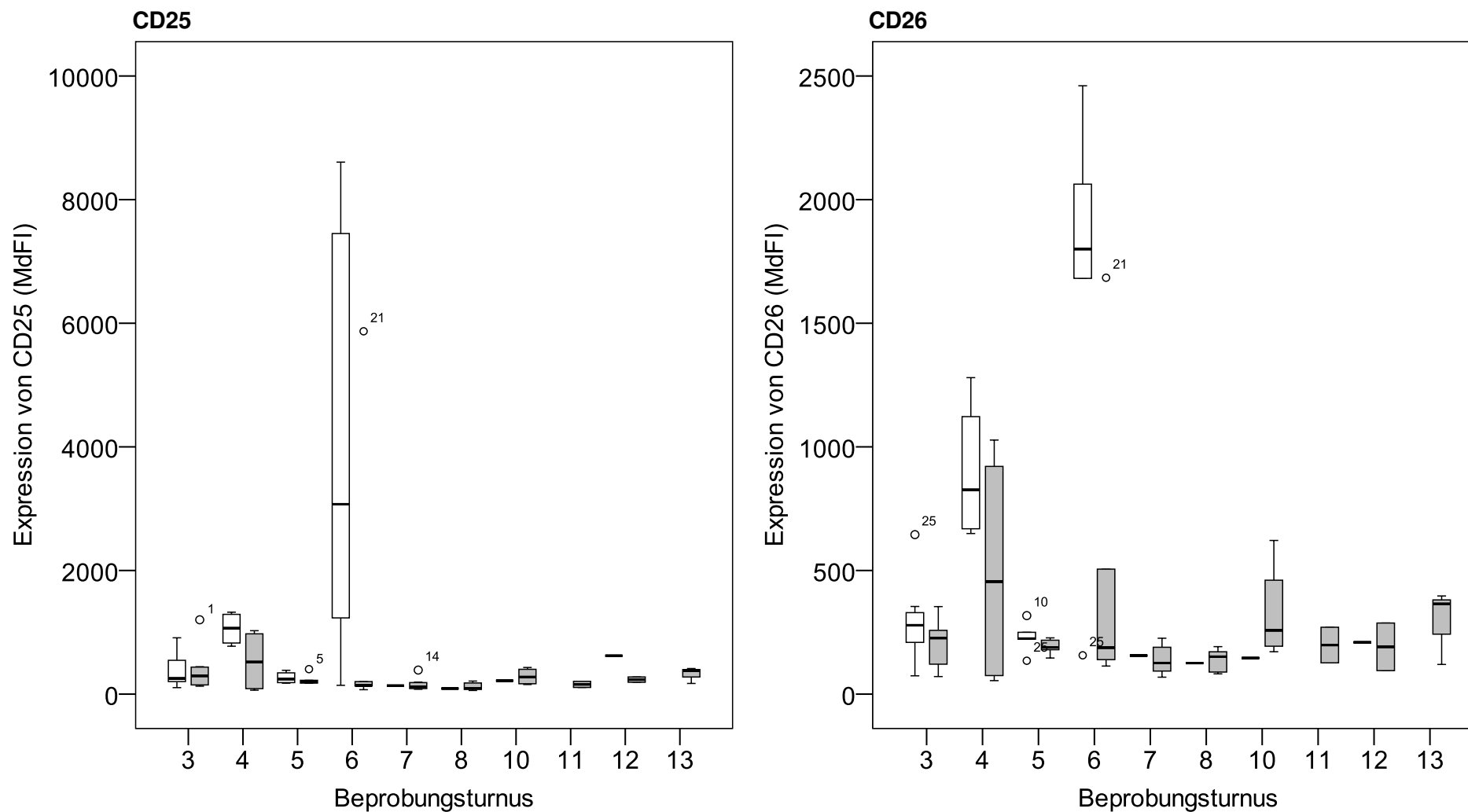


Abb. 24: Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten CD4⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI für den PE-Kanal auf für 6 d inkubierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider.

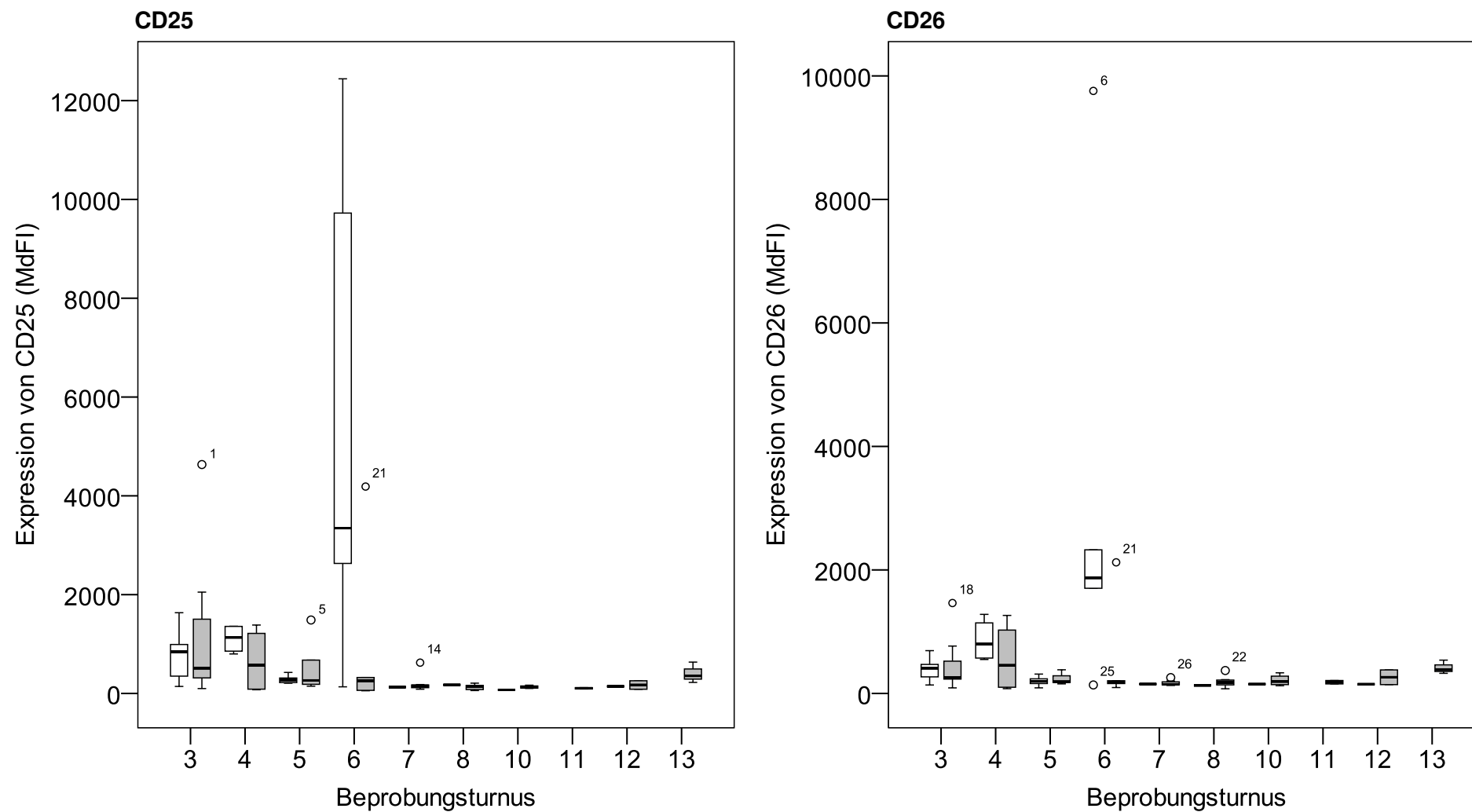


Abb. 25: Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI für den PE-Kanal auf für 6 d inkubierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider.

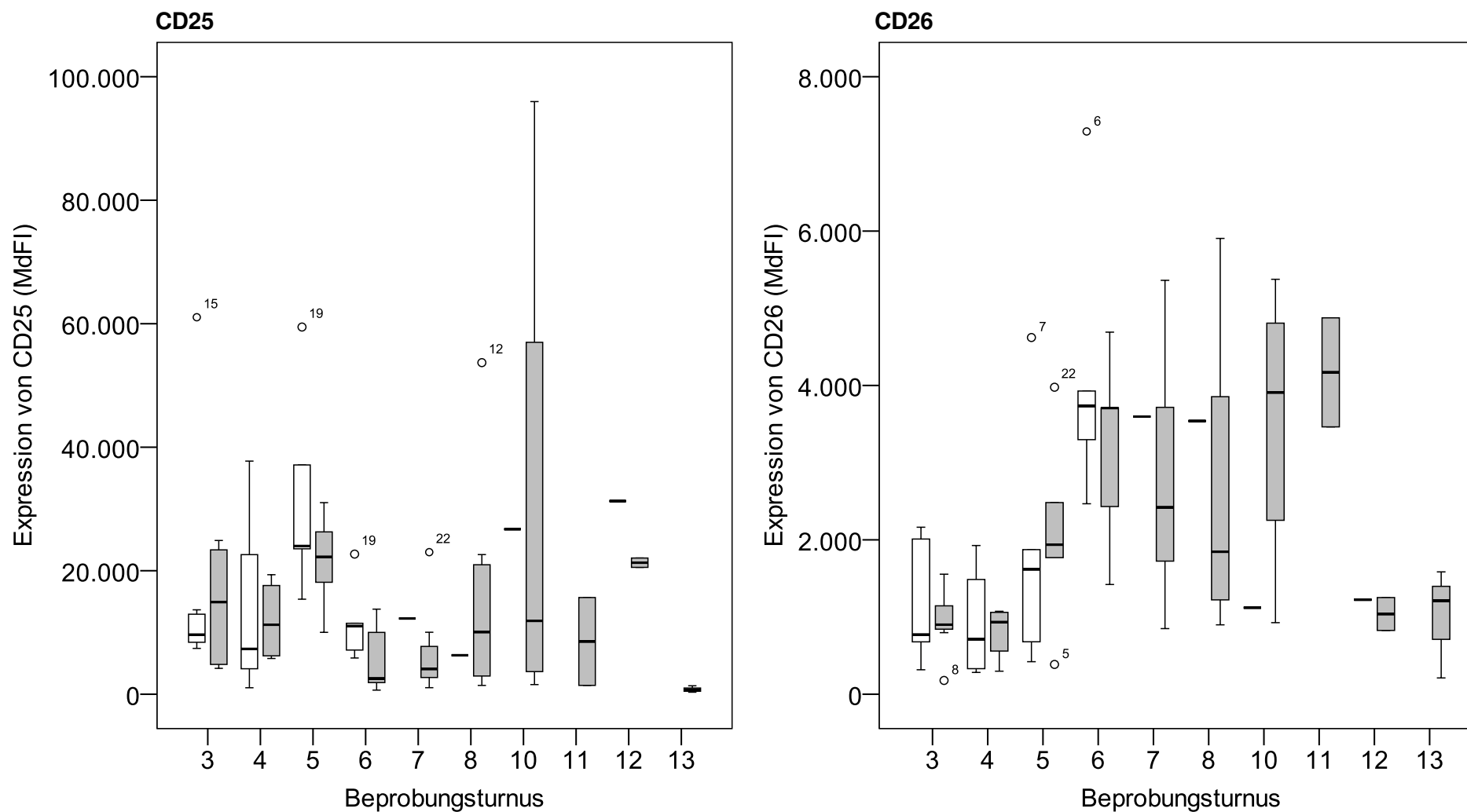


Abb. 26: Expression von CD25 bzw. CD26 auf mit JPPD stimulierten CD4⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI für den PE-Kanal auf für 6 d mit JPPD (4 µg/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
□ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider.

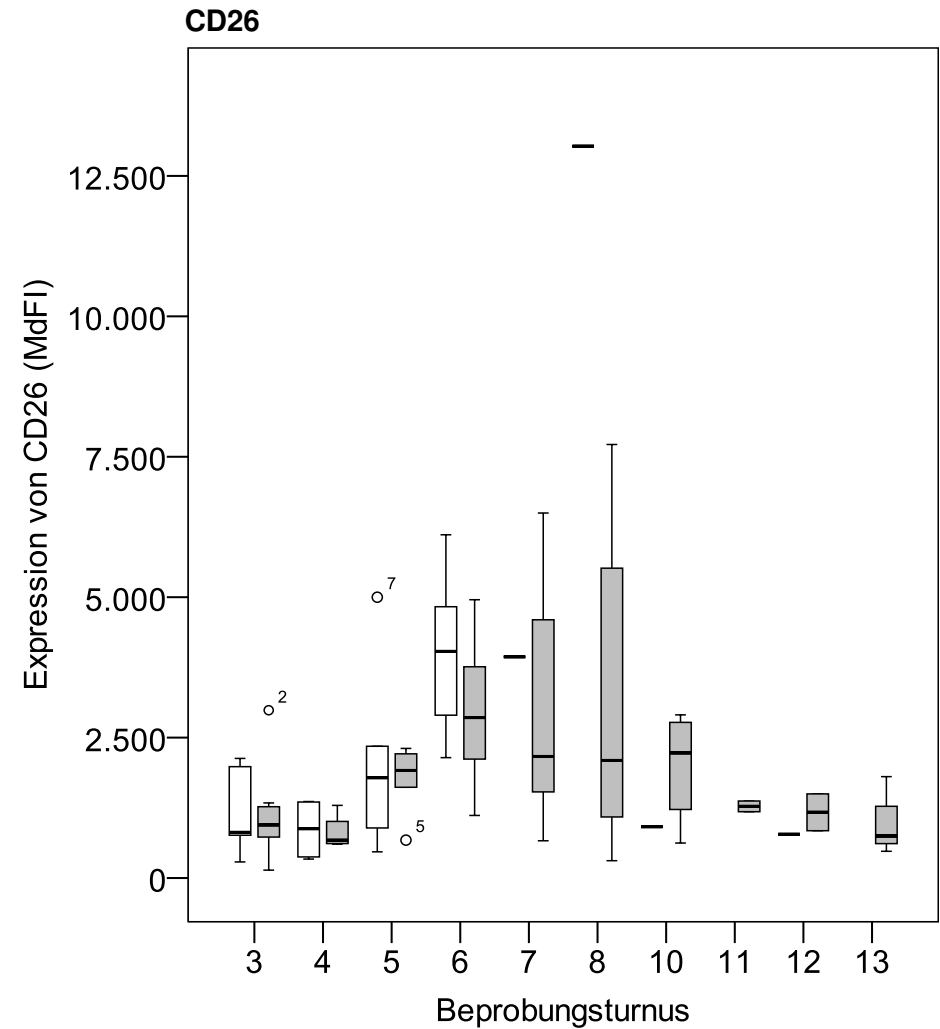
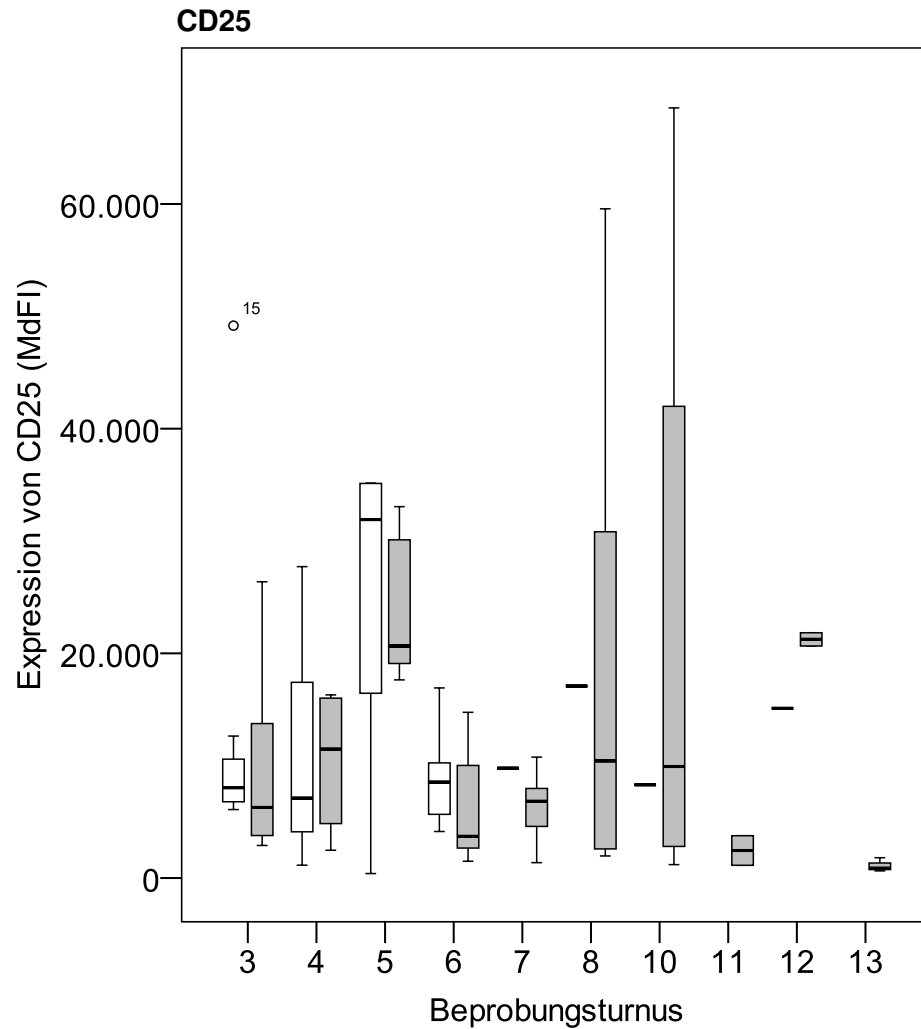


Abb. 27: Expression von CD25 bzw. CD26 auf mit JPPD stimulierten CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI für den PE-Kanal auf für 6 d mit JPPD (4 µg/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
□ = Kurzausscheider; ■ = Dauerausscheider.

5.7.4 Die zelluläre Immunantwort bei Kn-, PB- und MB-Tieren

Es werden im Folgenden nur die Tiere der Versuchsgruppe V4 analysiert. Nur diese Tiere ließen sich hinsichtlich des MAP-Nachweises in Organproben innerhalb einer Versuchsgruppe in Teilgruppen untergliedern und nur der Vergleich innerhalb einer Versuchsgruppe (und damit innerhalb eines Sektionszeitpunktes) ist sinnvoll.

Die spontane Freisetzung von IFN- γ unterschied sich nicht zwischen den Teilgruppen (nicht dargestellt). Nach Stimulation mit JPPD jedoch zeigten die Tiere der PB-Gruppe einen deutlich steileren und insgesamt höheren Anstieg der S/P-Ratios als die Tiere der MB-Gruppe (Abb. 28).

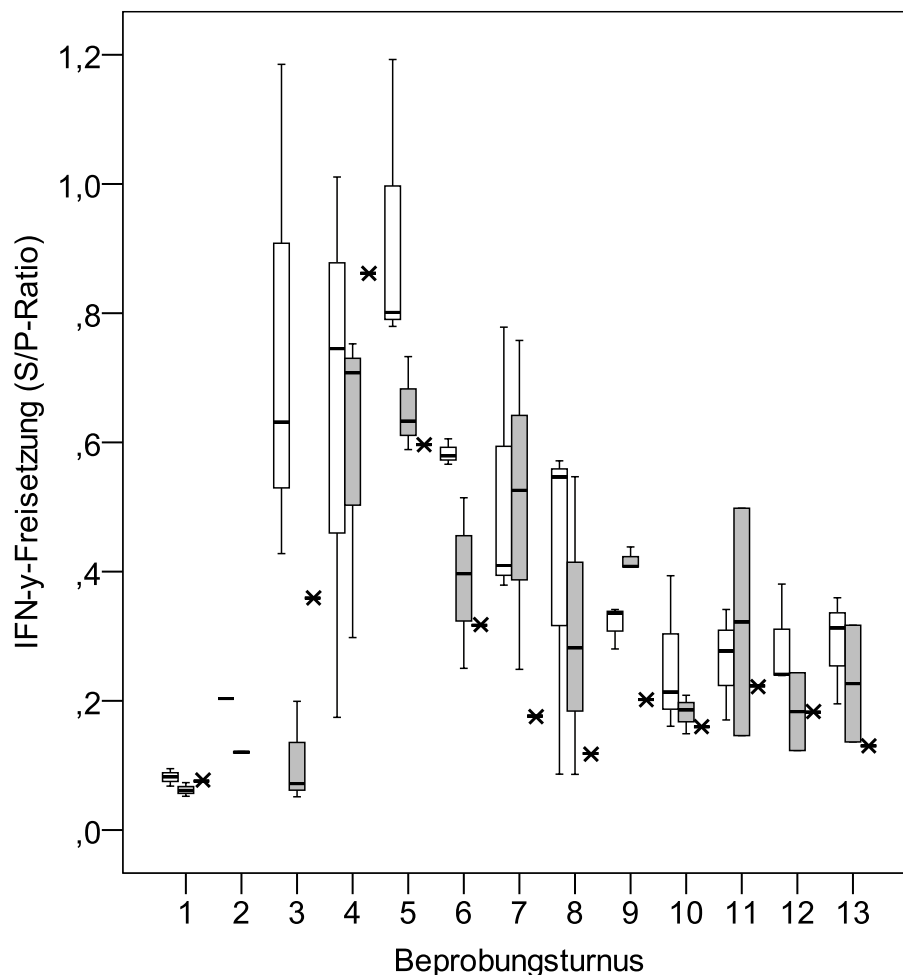


Abb. 28: IFN- γ -Freisetzung der mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 24 h mit JPPD (4 μ g/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
□ = PB; ■ = MB; ✕ = Kn.

Ab BT 6 sanken die S/P-Ratios der PB-Tiere wieder auf das Niveau der MB-Tiere ab. Das Kn-Tier zeigte ebenfalls einen steileren Anstieg der S/P-Ratios als die MB-Tiere

und eine Absenkung der Werte ab BT 5. Letztere verlief steiler als bei den PB-Tieren und die S/P-Ratios lagen ab BT 5 jeweils niedriger als der Median von PB bzw. MB.

Die Unterschiede zwischen den Teilgruppen nach APPD- bzw. ConA-Stimulation ließen sich auf dieselbe Art und Weise beschreiben. Allein das Absinken der Werte vom Kn-Tier zeigte sich weniger ausgeprägt (nicht dargestellt).

Für die spontane Freisetzung von IL-10 ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Tieren der Teilgruppen Kn, PB und MB ausmachen (nicht dargestellt). Auffällig war aber, dass in den Stimulationsansätzen mit JPPD und APPD die höheren S/P-Ratios in BT 2 vornehmlich den PB-Tieren zuzuordnen waren (Abb. 29).

Die spontane Genexpression der untersuchten Zytokine unterschied sich zwischen den Gruppen Kn, PB und MB nur für IL-18. Hier zeigten sich bei PBMC von PB-Tieren gegenüber den MB-Tieren bis einschließlich BT 9 tendenziell geringere Genexpressionen (Abb. 30). In BT 11 und BT 13 hingegen war die IL-18-Genexpression bei den PB-Tieren höher als bei den MB-Tieren. Diese Effekte konnten unabhängig von der Inkubationszeit festgestellt werden. Die Genexpressionslevel von IL-18 in PBMC des Kn-Tieres waren ebenfalls zunächst geringer als die Medianwerte der IL-18-Genexpression der MB-Tiere (bis BT 7 bzw. BT 11 bei einstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation). Ab BT 9 zeigten PBMC des Kn-Tieres nach einstündiger Inkubation eine höhere IL-18-Genexpression als die der MB-Tiere. Nach 24-stündiger Inkubation hingegen war dies nur in BT 13 der Fall.

Diese Unterschiede zwischen den Teilgruppen zeigten sich noch deutlicher bei den mit JPPD stimulierten PBMC (Abb. 31). Hier waren die Werte der MB-Tiere unabhängig von der Stimulationszeit in den ersten drei BT (BT 3, BT 5 und BT 7) deutlich höher und in den folgenden drei BT (BT 9, BT 11 und BT 13) deutlich geringer als die des Kn-Tiers und der PB-Tiere. Dies kam zustande durch ein deutliches Absinken der Genexpression von IL-18 bei den MB-Tieren und eine gleichzeitige Tendenz zu einer ansteigenden Genexpression bei den übrigen Teilgruppen über den Versuchszeitraum. Dieser Anstieg der IL-18-Genexpression war jedoch bei dem Kn-Tier deutlicher nach einstündiger und bei den PB-Tieren deutlicher nach 24-stündiger Stimulation zu erkennen.

Bei den für 24 Stunden mit JPPD stimulierten PBMC konnten darüber hinaus auch Unterschiede in der Gen-Expression der Zytokine IL-10 und IL-12p40 festgestellt werden. So war mit Ausnahme von BT 5 zu jedem Messzeitpunkt die Genexpression

von IL-10 und IL-12p40 bei den PB-Tieren gegenüber den MB-Tieren tendenziell erhöht (Abb. 32). Die Entwicklung der Genexpressionsniveaus beim Kn-Tier glich dabei weder speziell der der PB-Tiere noch der der MB-Tiere. Eine deutliche Abweichung von den Werten der anderen Teilgruppen zeigte sich allerdings nur für IL-12p40 in BT 3.

Während die spontane Expression von CD25 weder auf den CD4⁺ noch auf den CD8⁺ Gedächtniszellen zwischen den Teilgruppen systematische Unterschiede aufwies (nicht dargestellt), waren nach JPPD-Stimulation solche Unterschiede erkennbar. Durch JPPD stimuliert exprimierten sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ Gedächtniszellen von PB-Tieren durchweg mehr CD25 als die von MB-Tieren (Abb. 33). Bei der Expression von CD26 verhielt es sich tendenziell umgekehrt (Abb. 34). Über die Expression von CD25 und CD26 bei dem Kn-Tier lässt sich keine Aussage treffen, da dieses im Versuchsverlauf aufgrund geringer Zellzahlen bei der PBMC-Isolation nur zweimal (BT 10 und BT 12) beprobt wurde.

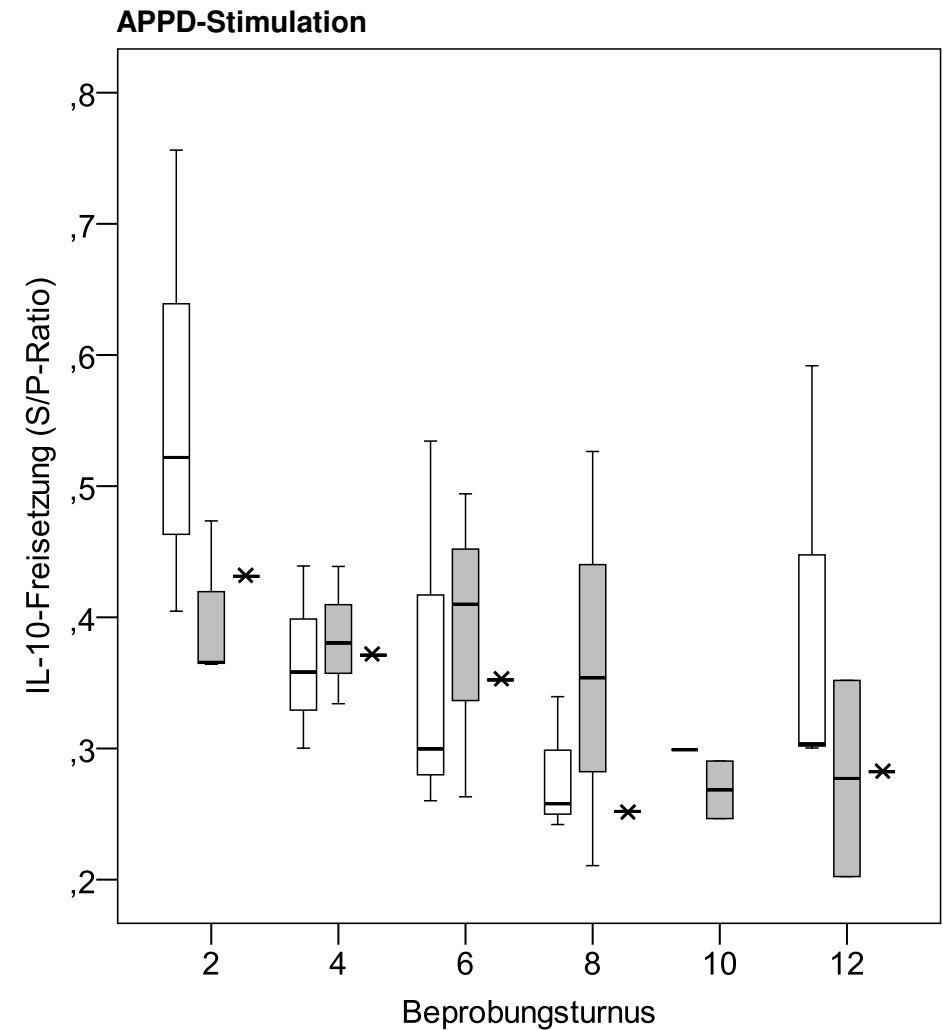
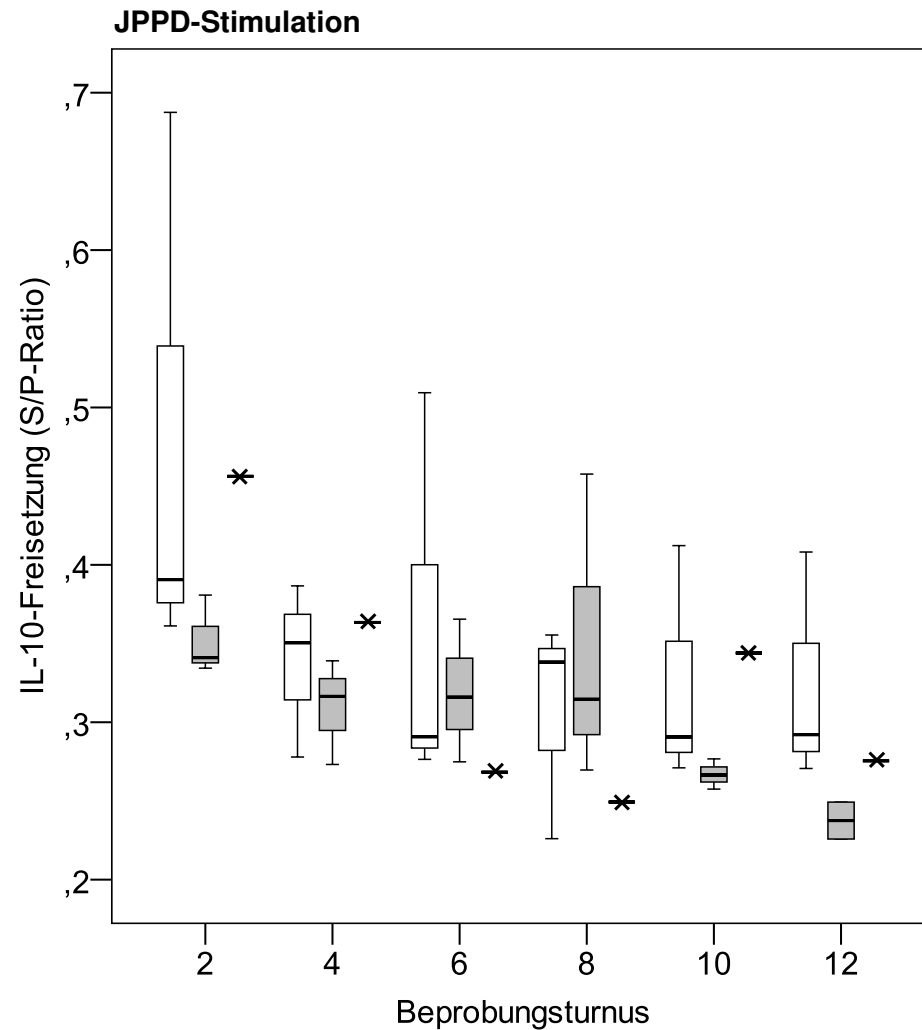


Abb. 29: IL-10-Freisetzung der mit JPPD bzw. APPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist die S/P-Ratio der für 64 h mit JPPD (4 µg/ml) bzw. APPD (125 I.E./ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
□ = PB; ■ = MB; * = Kn.

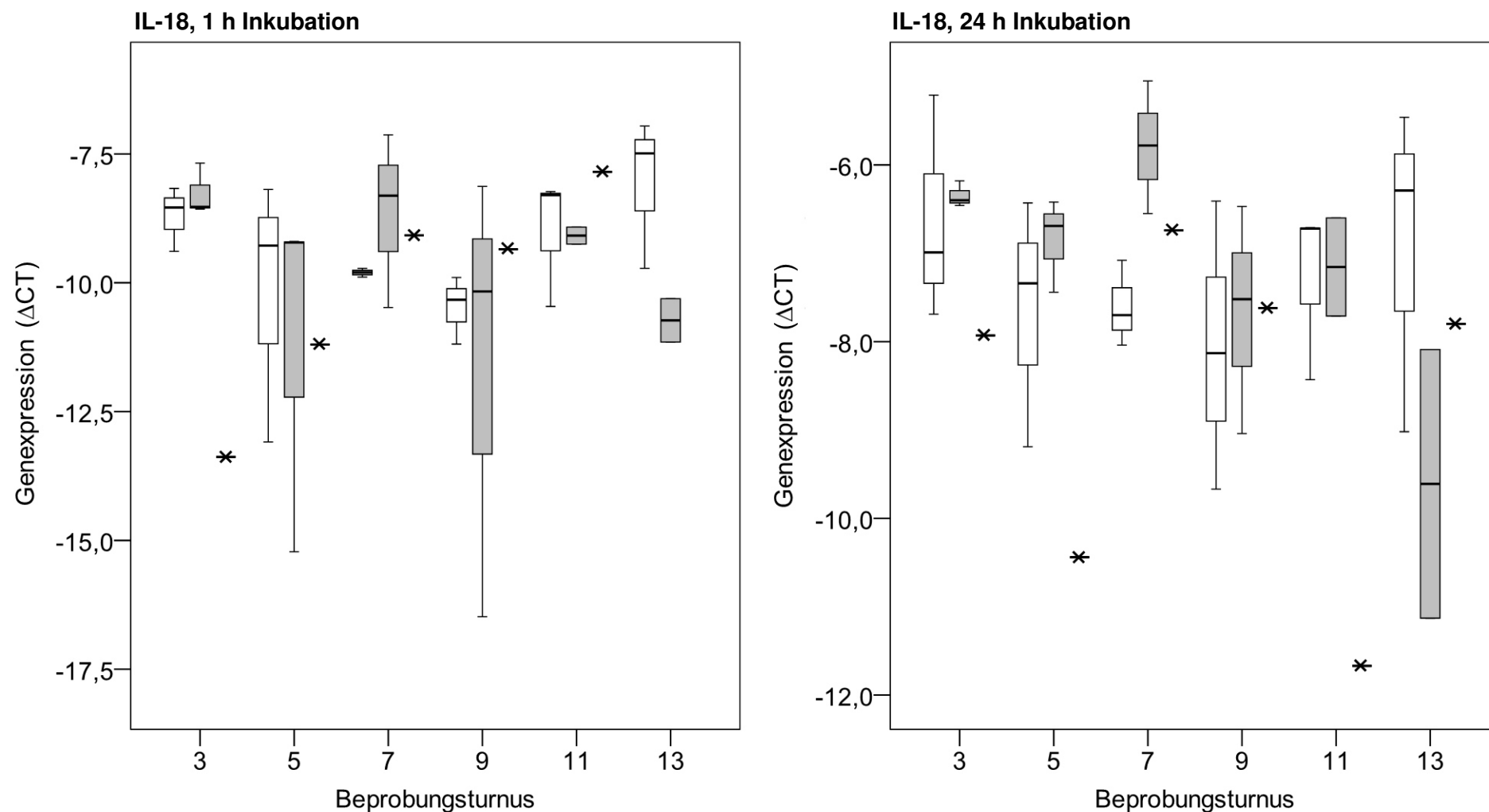


Abb. 30: Genexpression von IL-18 in der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der ΔCT der für 1 h bzw. für 24 h inkubierten Mediumkontrolle in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). Es fehlt ein Wert für die für 1 h inkubierte Mediumkontrolle vom Kn-Tier in BT 13, da in diesem BT nicht genügend PBMC isoliert werden konnten.

□ = PB; ■ = MB; ✱ = Kn.

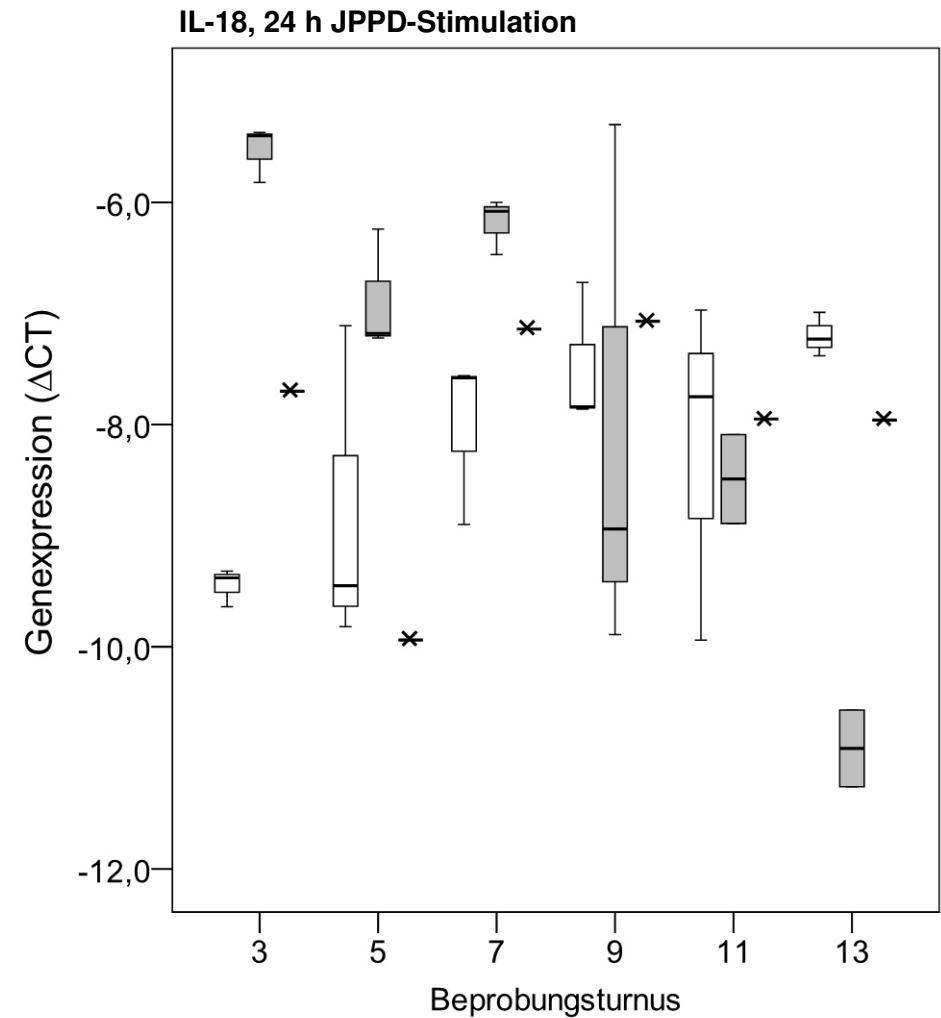
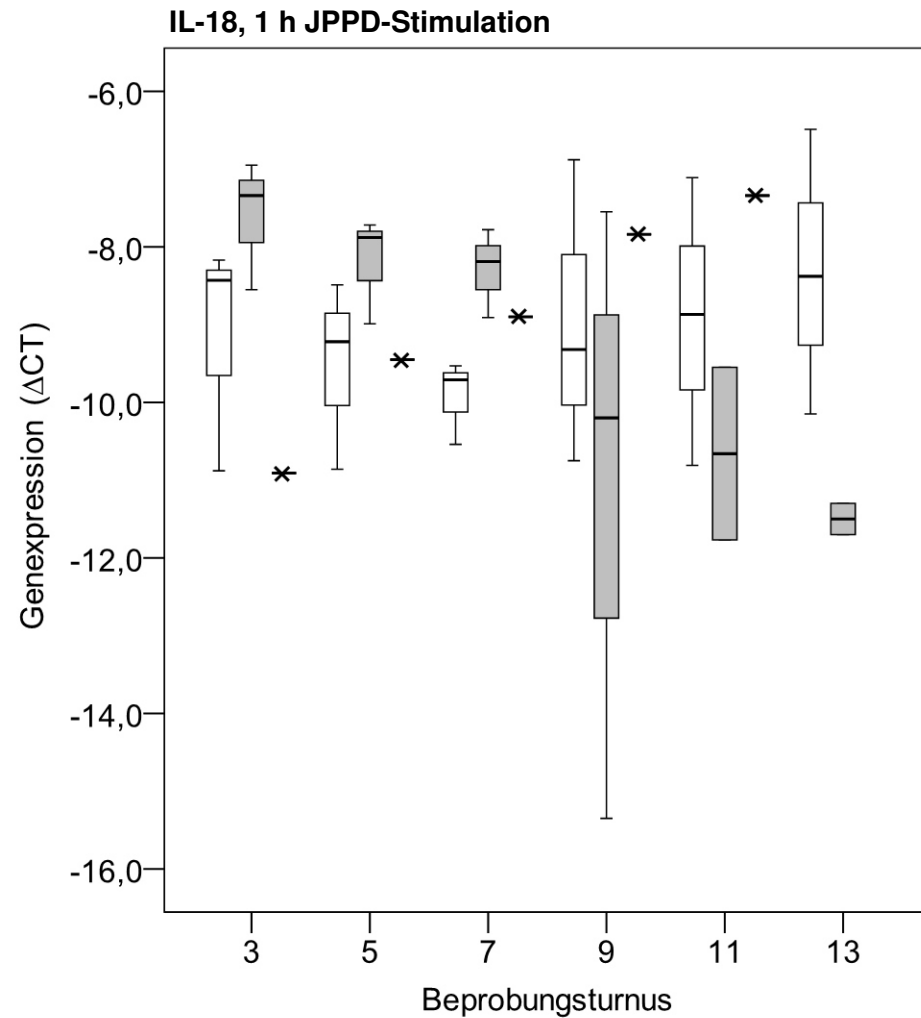


Abb. 31: Genexpression von IL-18 in für 1 h bzw. 24 h mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der ΔCT der für 1 h bzw. für 24 h mit JPPD (4 $\mu g/ml$) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2). Es fehlt der Wert für die für 1 h inkubierte Mediumkontrolle vom Kn-Tier in BT 13, da in diesem BT nicht genügend PBMC isoliert werden konnten.

□ = PB; ■ = MB; * = Kn.

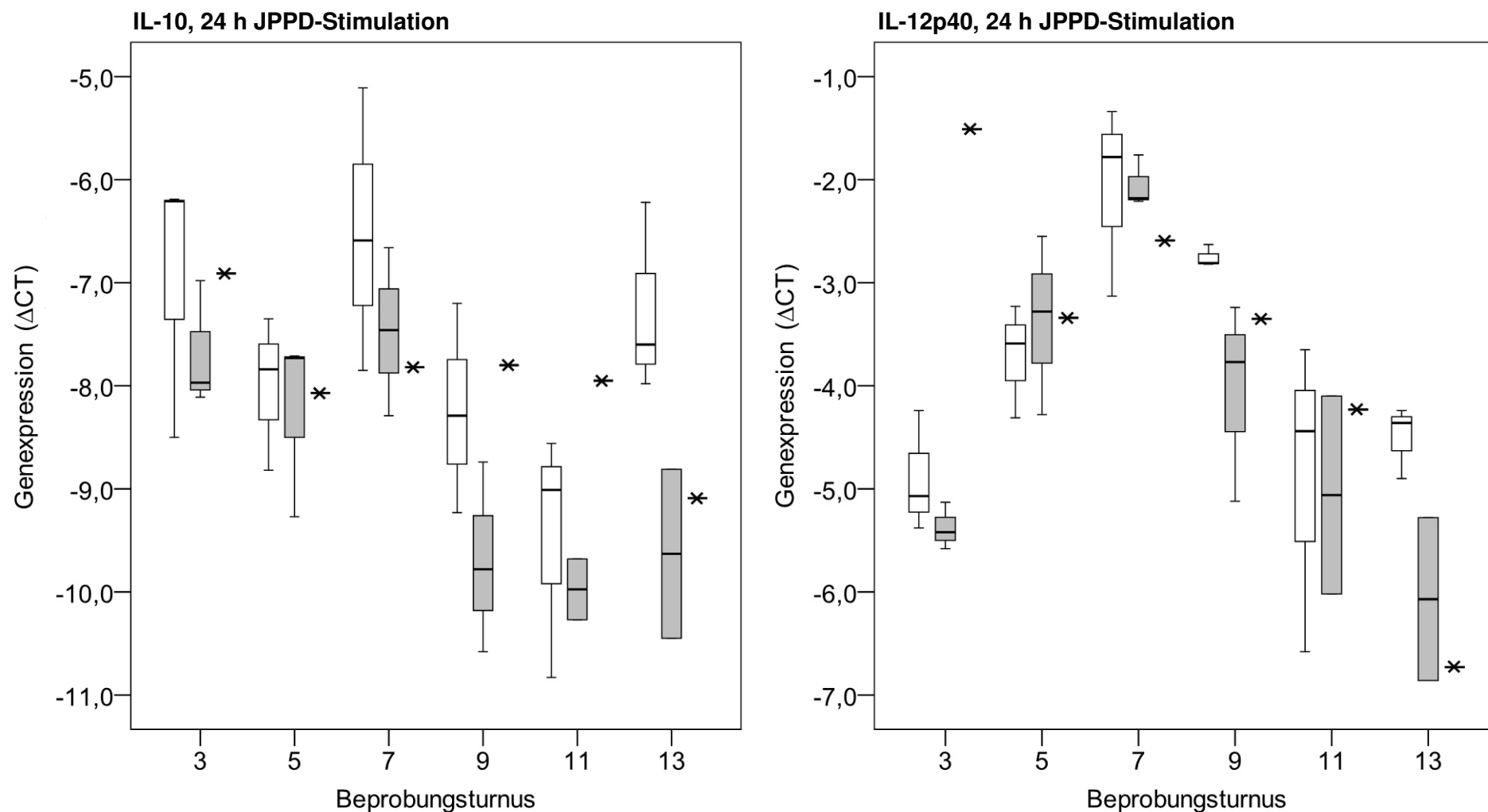


Abb. 32: Genexpression von IL-10 und IL-12p40 in mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der ΔCT der für 24 h mit JPPD (4 $\mu g/ml$) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = PB; ■ = MB; * = Kn.

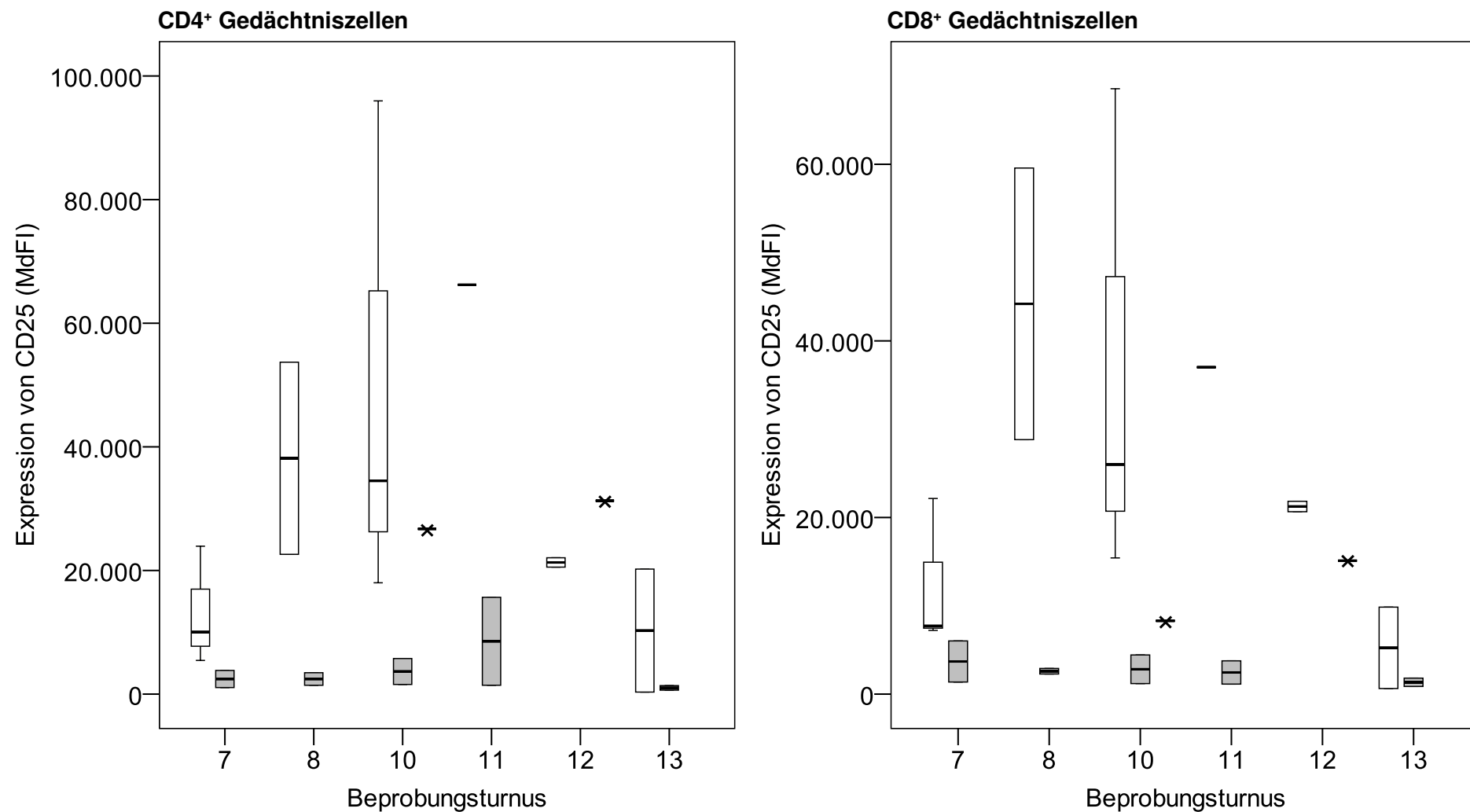


Abb. 33: Expression von CD25 auf mit JPPD stimulierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI der für 6 d mit JPPD (4 µg/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = PB; ■ = MB; * = Kn.

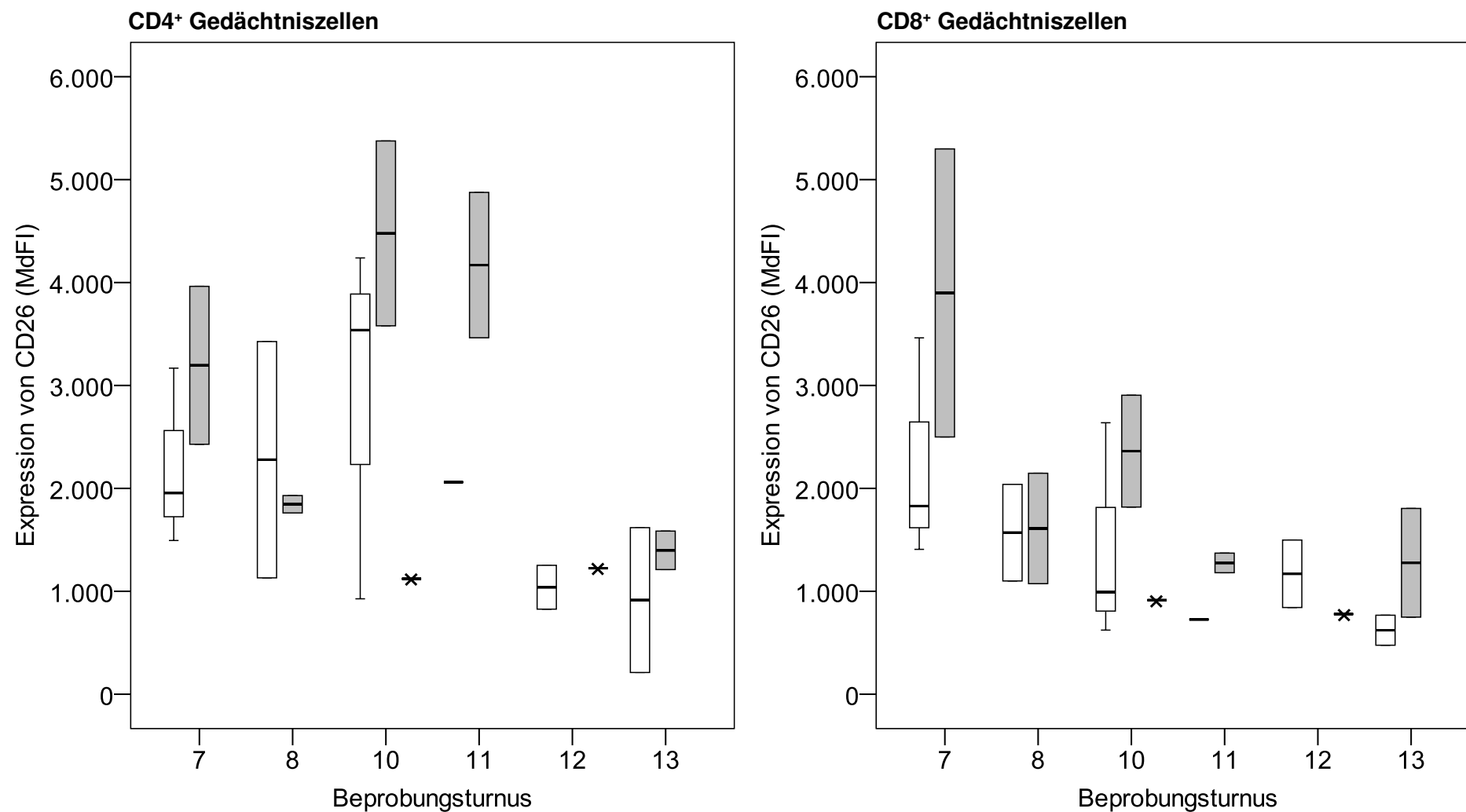


Abb. 34: Expression von CD26 auf mit JPPD stimulierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT. Dargestellt ist der MdFI der für 6 d mit JPPD (4 µg/ml) stimulierten PBMC in *Box-Whisker-Plots* (siehe 4.9.2).
 □ = PB; ■ = MB; * = Kn.

5.8 Zeitliche Einordnung der inokulationsbedingten Veränderungen und Korrelationen zwischen relevanten Parametern der zellvermittelten Immunität

In dieser Studie wurden in verschiedenen Untersuchungen deutliche Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren festgestellt. Die Richtig-Negativ-Raten bei der Auswertung der Daten vom kulturellen MAP-Nachweis in Kotproben, vom Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion, von der IFN- γ -Freisetzung, der Zytokingen- Genexpression von IL-12p40 und TNF- α und der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen nach JPPD-Stimulation wichen nur in Einzelfällen von 100 % ab. Die Richtig-Positiv-Raten hingegen zeigten deutliche Unterschiede über den Versuchsverlauf (Abb. 35). Dabei erreichte die Richtig-Positiv-Rate vom Nachweis von MAP in Kotproben zu Beginn der Untersuchung (BT 2) ihren Höhepunkt, bei allen anderen Parametern ergaben sich die höchsten Richtig-Positiv-Raten hingegen erst im Laufe des Versuchs. Abb. 35 und Abb. 36 fassen die Ergebnisse der verschiedenen Parameter zusammen und bringen sie in einen zeitlichen Zusammenhang.

Um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Parametern der zellvermittelten Immunität darstellen zu können, wurden die Ergebnisse relevanter Parameter mittels Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Es wurden hierfür die S/P-Ratios von IFN- γ und IL-10, die MdFI-Werte von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen und die Δ CT-Werte für IL-10, IL-12p40, IL-18, TNF- α und TGF- β nach 24-stündiger Stimulation mit JPPD und jeweils zum gleichen Zeitpunkt *p.i.* verglichen. Es ergaben sich allerdings wenige statistisch signifikante Korrelationen (Tab. 53).

Es zeigte sich, dass nach JPPD-Stimulation die S/P-Ratio für IFN- γ signifikant mit der Genexpression von IL-12p40, der S/P-Ratio für IL-10 und der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen korrelierte. Allerdings lag der Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho dabei zwischen 0,264 und 0,378. Es handelte sich in diesen Fällen also lediglich um geringe Korrelationen. Eine mittlere Korrelation (Spearmans Rho = 0,587) zeigte sich zwischen der Zytokingen-Genexpression von IL-12p40 und der Expression von CD26 auf CD8⁺ Gedächtniszellen. Darüber hinaus konnten keine Korrelationen mit statistischer Signifikanz festgestellt werden.

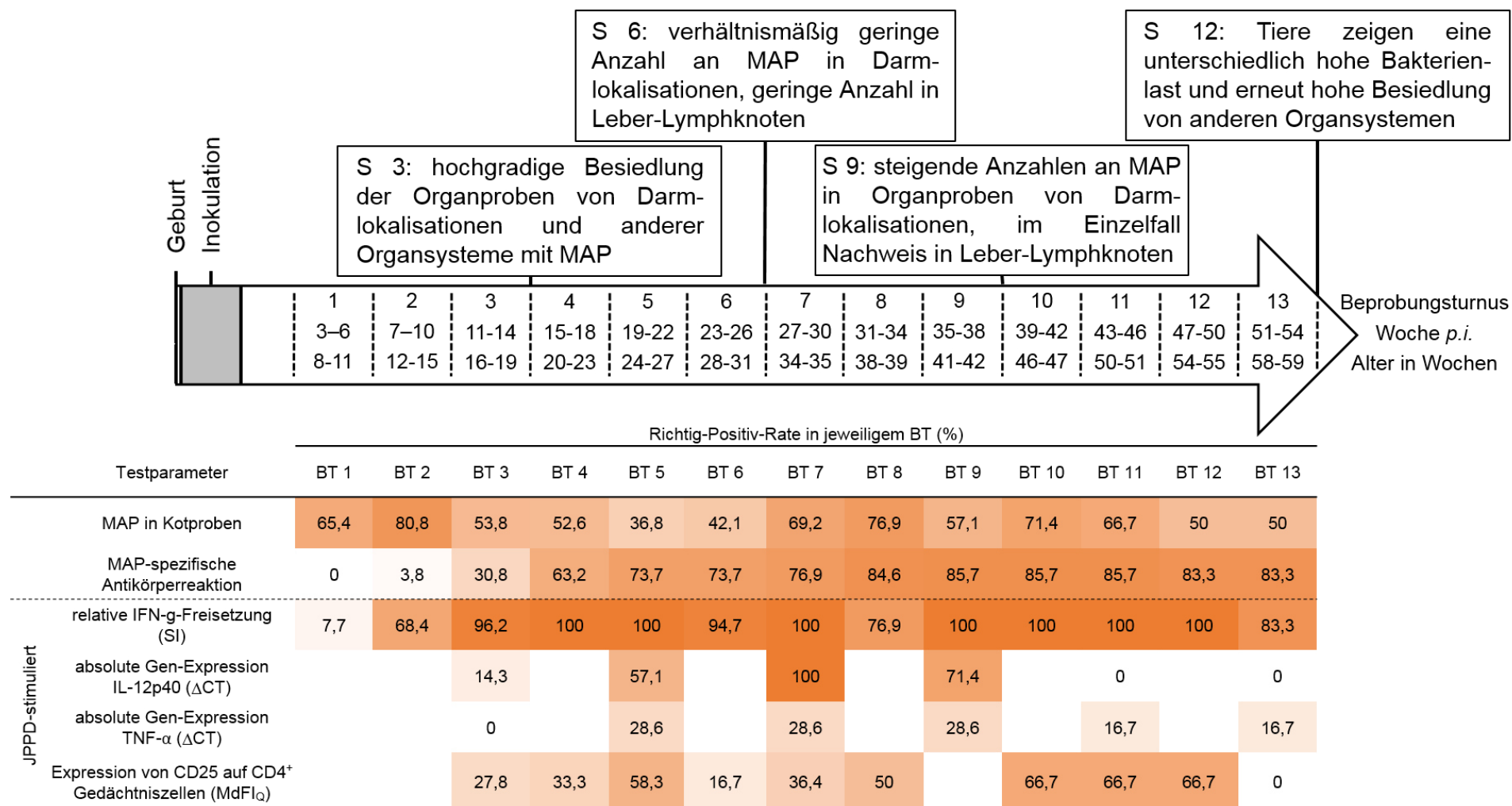


Abb. 35: Zeitstrahl der Befunde bei den Versuchstieren. Die Ergebnisse des kulturellen MAP-Nachweis in Organproben und die Richtig-Positiv-Raten der Testparameter, die sich in dieser Studie für die Differenzierung der Tiergruppen als am besten geeignet erwiesen haben, sind in Abhängigkeit von der Zeit zusammengefasst. Die Richtig-Positiv-Raten sind zur besseren Übersicht ihrer Höhe folgend unterschiedlich intensiv farbllich hinterlegt. □ = Richtig-Positiv-Rate von 0 %. ■ = Richtig-Positiv-Rate von 100 %.

S 3 = Sektion, 3 Monate p.i.; S 6 = Sektion, 6 Monate p.i.; S 9 = Sektion, 9 Monate p.i.; S 12 = Sektion, 12 Monate p.i.

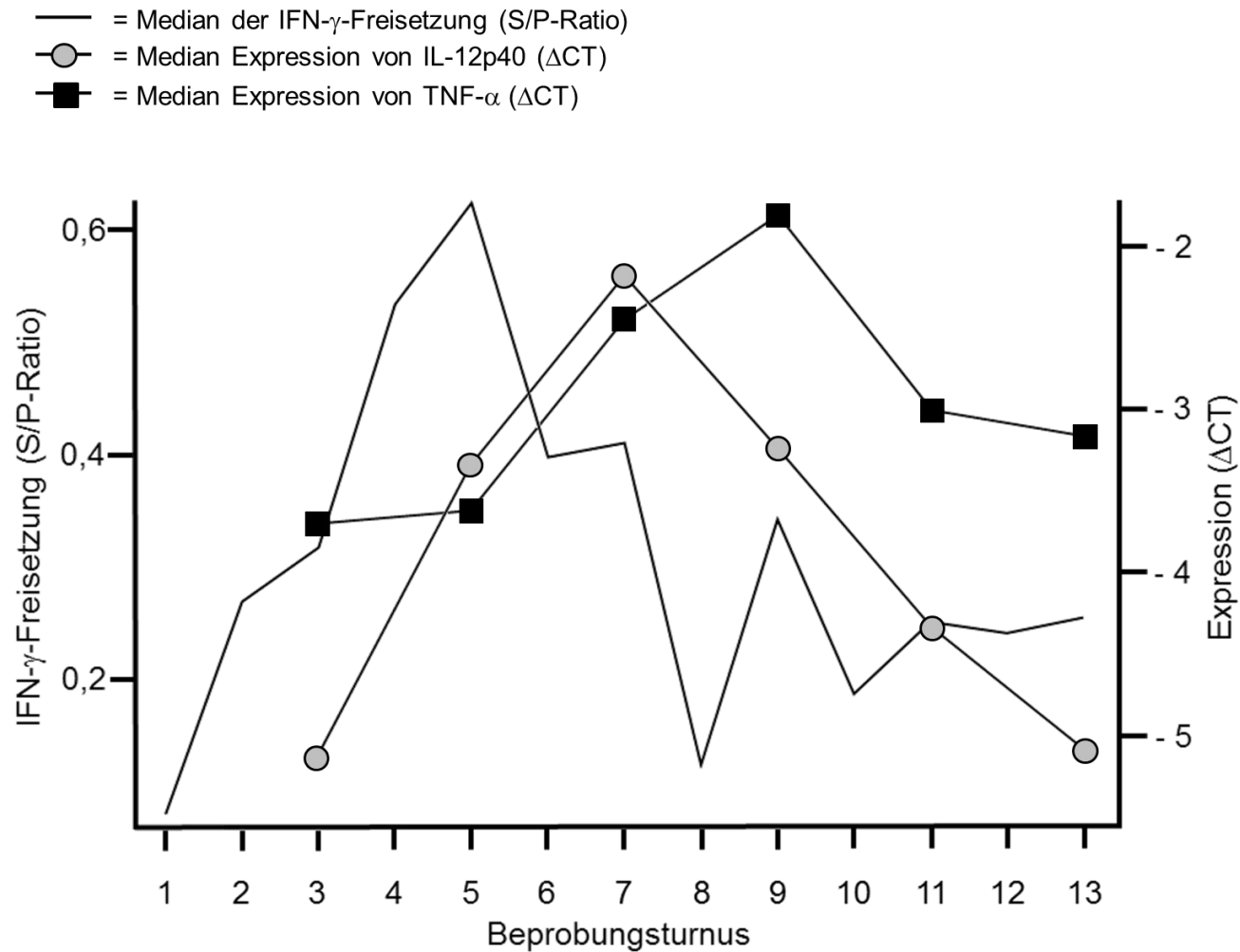


Abb. 36: Gemeinsame Darstellung der zeitlichen Verläufe der Freisetzung von IFN- γ (S/P-Ratio) und der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α (Δ CT) von mit JPPD (4 μ g/ml) stimulierten PBMC (Versuchstiere). Dargestellt ist jeweils der Median der S/P-Ratios bzw. der Δ CT-Werte in Abhängigkeit von der Zeit.

Tab. 53: Spearmans Rho beim Vergleich verschiedener Parameter der zellulären Immunität, nach JPPD-Stimulation und innerhalb der Versuchstiere. Dargestellt sind jeweils der Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho, die exakte Signifikanz zweiseitig und die Anzahl der verglichenen Paare. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden Dopplungen aus dieser Kreuztabelle entfernt.

Quantifiziertes Zytokin	Einheit	Dargestellte Größe	Quantifiziertes Zytokin / Aktivierungsmolekül									
					CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺					
			IFN- γ	IL-10	CD25	CD26	CD25	CD26				
			Einheit									
			S/P-Ratio			MdFI-Wert						
IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	Δ CT-Wert nach 24 h Inkubation	Spearmans Rho	,225	nd	,049	-,238	,238	,210
						Signifikanz (2-seitig)	,163		,880	,457	,457	,513
						Anzahl Paare	40		12	12	12	12
						Spearmans Rho	,318	nd	,350	,238	,510	,587
						Signifikanz (2-seitig)	,046		,265	,457	,090	,045
						Anzahl Paare	40		12	12	12	12
						Spearmans Rho	-,200	nd	,147	,231	,231	,126
						Signifikanz (2-seitig)	,217		,649	,471	,471	,697
						Anzahl Paare	40		12	12	12	12
						Spearmans Rho	-,201	nd	,147	,140	-,063	-,497
						Signifikanz (2-seitig)	,213		,649	,665	,846	,101
						Anzahl Paare	40		12	12	12	12
IL-10	IFN- γ	S/P-Ratio	Spearmans Rho		,378	,264	,308	,277	,296			
			Signifikanz (2-seitig)		,021	,013	,003	,009	,005			
			Anzahl Paare		37	88	88	88	88			
			Spearmans Rho			-,022	-,291	,066	-,253			
			Signifikanz (2-seitig)			,943	,334	,831	,405			
			Anzahl Paare			13	13	13	13			

MK = Mediumkontrolle; JPPD = JPPD-Stimulation (4 μ g/ml); IL-12 = IL-12p40; nd = Vergleich nicht durchgeführt, da keine gültigen Paare vorhanden.

Grau hinterlegt sind Spearmans Rho-Werte, die mit einer Signifikanz innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$) belegt sind. Unterstrichen sind mittlere Korrelationen, die einen Spearmans Rho-Wert $> 0,5$ aufweisen.

6 Diskussion

6.1 Ziele, Hypothesen und wichtigste Ergebnisse

Als Grundlage für eine angemessene Interpretation der weiteren Ergebnisse sollte mit der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass das angewandte Inokulationsschema geeignet ist, eine Infektion mit MAP im Tiermodell zu reproduzieren. Auf dieser Basis wurden die angewandten Tests zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort im Hinblick auf ihre Verlässlichkeit bewertet. Insbesondere wurde die Hypothese geprüft, dass eine Unterscheidung zwischen Kontroll- und Versuchstieren anhand von Parametern der zellulären Immunantwort auf MAP gelingen kann. Hierbei wurde auch untersucht, ob der Nachweis der zellulären Immunantwort früher möglich ist als der der humoralen Immunantwort, bzw. der Ausscheidung von MAP mit dem Kot. Nach der Bestimmung des diagnostischen Potentials der angewandten Nachweismethoden sollte auch analysiert werden, ob die in dieser Studie angewandten Methoden zur Steigerung der Spezifität bzw. der Sensitivität des IFN- γ -Tests erfolgreich eingesetzt wurden. Zu guter Letzt wurde die Hypothese beleuchtet, dass bei Ziegen wie bei Schafen verschiedene Verlaufsformen der Paratuberkulose vorkommen, die durch immunpathologische Prozesse in der frühen Infektionsphase eingeleitet werden, da in diesem Zusammenhang pathogenetisch bedeutsame Beziehungen zwischen den in der vorliegenden Studie erhobenen Parametern diskutiert werden.

Die experimentelle Inokulation neugeborener Thüringer Waldziegen mit MAP führte zu einer erfolgreichen Infektion der Tiere. Der Verlauf der Infektion zeigte sich gegenüber der natürlichen Infektion beschleunigt, aber die generelle Entwicklung der Immunantwort auf MAP ähnelte in hinreichendem Maße der bei einer natürlichen Infektion. Wie nach einer natürlichen Infektion wies die Pathogenese interindividuell Unterschiede auf.

Ungeachtet der Variabilität der pathohistologischen Veränderungen und der Immunantwort bei den Versuchstieren, konnten diese im Verlauf der Infektion deutlich von den Kontrolltieren differenziert werden. Dies war nicht nur mit Hilfe bereits etablierter Nachweismethoden (Kulturelle Anzucht von MAP aus Kot- und Organproben, Antikörper-ELISA) möglich, sondern auch mit Parametern, die die zelluläre Immunantwort auf MAP widerspiegeln. So waren bei mit JPPD stimulierten PBMC von Versuchstieren zu den meisten bzw. zu allen untersuchten Zeitpunkten die IFN- γ -

Freisetzung, die Genexpression von IL-12p40 und TNF- α sowie die Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen signifikant höher als bei solchen von Kontrolltieren. Diese Unterschiede waren teilweise früher nachweisbar als MAP-spezifische Antikörper bei den infizierten Tieren.

Trotz gleicher Infektions- und Haltungsbedingungen zeigten sich bei den Versuchstieren interindividuelle Unterschiede in der Besiedlung der Organe durch MAP, in der Ausscheidung mit dem Kot und im Einsetzen sowie in der Intensität der humoralen und zellulären Immunantwort. Die Versuchstiere, die die Bakterienlast im Infektionsverlauf auf einem moderaten Niveau halten konnten, zeigten dabei im Vergleich mit den anderen Versuchstieren in mit JPPD stimulierten PBMC mehrere Charakteristika: Eine frühe, hohe IFN- γ -Freisetzung bzw. eine hohe Genexpression von IL-10 und IL-12p40 und eine hohe Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen. Die Genexpression von IL-18 nahm bei Tieren, die zwölf Monate *p.i.* eine hohe Bakterienlast aufwiesen, mit der Zeit ab, war bei Tieren mit einer geringeren finalen Bakterienlast aber zu Beginn niedriger als bei den anderen Versuchstieren und stieg im Verlauf des Versuches an.

Da die immunologischen Unterschiede zwischen den Tieren mit unterschiedlichen Infektionsverläufen zu einem frühen Zeitpunkt sichtbar wurden, handelt es sich wahrscheinlich um voneinander abgegrenzte Verlaufsformen der Paratuberkulose, die von bestimmten immunpathogenetischen Prozessen abhängig sind.

6.2 Hypothese 1: Das angewandte Inokulationsschema ist geeignet, eine Infektion mit MAP im Tiermodell sicherzustellen.

Bisher mangelt es an einem Infektionsmodell, das die natürlichen Verhältnisse widerspiegelt und dabei eine ausreichende Praktikabilität aufweist. Das hier verwendete Inokulationsschema wurde gewählt, weil es in einer vorangegangenen Studie eine sichere Infektion der Ziegenlämmer gewährleistete und die induzierten pathologischen Befunde eine hinreichende Ähnlichkeit zu denen von adulten Ziegen mit natürlicher MAP-Infektion aufwiesen (Meyer 2011). Jedoch wurden sowohl in der Studie von Meyer (2011), als auch in der hier vorliegenden Studie Unterschiede zwischen der experimentellen und der natürlichen Infektion deutlich.

6.2.1 Vergleich mit der natürlichen Infektion

Ein erster Unterschied zur natürlichen Infektion wird darin deutlich, dass die Detektion von MAP in Kotproben in der hier vorliegenden Studie ab der ersten Untersuchung nach dem Ende der Inokulation gelang. Dabei kann ein positives Ergebnis allerdings bis zu 7 Tage nach der letzten oralen Inokulation noch mit einer passiven Ausscheidung von MAP erklärt werden (Sweeney, Whitlock *et al.* 1992). Spätestens ab dem BT 2 aber sollten alle positiven Kulturergebnisse der Kotproben als Zeichen einer Vermehrung von MAP im Darmgewebe und Freisetzung von MAP nach Zelluntergang gewertet werden (vgl. 2.2.5, Hines, Stabel *et al.*, 2007). Lybeck, Storset *et al.* (2010) gelang der Nachweis von MAP im Kot dagegen frühestens bei neun Monate alten, natürlich mit MAP infizierten Ziegen, obwohl aufgrund der hohen Durchseuchungsrate des Herkunftsbestandes angenommen werden kann, dass sie sich schon in den ersten Lebenstagen infiziert haben mussten.

Auch der Nachweis einer stabilen, positiven Antikörperreaktion auf MAP wurde in dieser Studie zu einem sehr frühen Zeitpunkt erbracht. So wurden ab Woche 11 *p.i.* MAP-spezifische Antikörper nachgewiesen. Lybeck, Storset *et al.* (2010) wiesen solche jedoch erst bei 14 Monate alten, natürlich infizierten Ziegen nach. Bei einigen Tieren gelang der Nachweis sogar erst in einem Alter von zwei bis dreieinhalb Jahren.

Der kulturelle Nachweis von MAP in Organproben gelang in der vorliegenden Studie bereits einen Monat *p.i.* anlässlich einer aus Tierschutzgründen vorgezogenen Sektion eines erkrankten Tieres. Ein bzw. drei Monate *p.i.* wiesen die Tiere bereits eine hohe bis hochgradige Besiedlung von Darmabschnitten bzw. von darm-assoziiertem Lymphgewebe sowie eine Dissemination von MAP in nicht darm-assoziierte Organe auf. Möglicherweise sind die bei dem nach einem Monat euthanasierten Tier ermittelten Befunde dessen besonderer Empfänglichkeit aufgrund einer allgemein schlechten bzw. durch eine andere Infektion belasteten Immunabwehr geschuldet. Das Tier wurde wegen einer für eine MAP-Infektion untypischen schlaffen Lähmung der Gliedmaßen und schlechtem Allgemeinbefinden unklarer Genese vorzeitig aus dem Versuch genommen. Möglich ist aber auch, dass die weite Verteilung von MAP in den Organen dieses Tieres ein Indiz dafür ist, dass die bei der Sektion drei Monate *p.i.* festgestellten Befunde bereits in den ersten Wochen *p.i.* entstanden sind. Bisher gibt es nach Kenntnis der Autorin keine Berichte über natürlich infizierte Tieren, die in einer solch frühen Phase der Infektion untersucht wurden.

6.2.2 Vergleich mit experimentellen Infektionen in anderen Studien

In anderen Studien mit experimentell infizierten Ziegen gelangen die Nachweise von MAP-spezifischen Antikörpern bzw. von MAP in Kot- und Organproben ebenfalls früher als nach natürlicher Infektion. So beschrieben Stewart, Vaughan *et al.* (2006), ähnlich wie die vorliegende Studie, den Nachweis von MAP im Kot von Ziegen bereits zwei Monate nach experimenteller Infektion. Bei anderen Infektionsversuchen mit Ziegen wurde der Nachweis von MAP im Kot jedoch nicht vor dem siebten Monat *p.i.* erbracht (Munjal, Tripathi *et al.* 2007, Singh, Singh *et al.* 2013). Storset, Hasvold *et al.* (2001) wiesen MAP-spezifische Antikörper bei experimentell infizierten Ziegen ähnlich wie in der vorliegenden Studie bereits 15 Wochen *p.i.* nach. Dieser Nachweis gelang bei Munjal, Tripathi *et al.* (2005) und Singh, Singh *et al.* (2013) hingegen erst sechs bzw. zwölf Monate nach experimenteller Infektion.

Auch die rasche Ausbreitung von MAP aus der Darmmukosa in andere Lokalisationen wurde bereits für experimentell infizierte Rinder und Schafe beschrieben. So konnte MAP bereits vier Tage nach intrainestinaler Inokulation von Kälbern (über einen chirurgischen Zugang) kulturell in der Leber nachgewiesen werden (Wu, Livesey *et al.* 2007). Bei experimentell oral infizierten Schafen fand sich MAP bereits 20 Tage bzw. vier Wochen *p.i.* in der Dünndarmmukosa und den Mesenteriallymphknoten (Brotherston, Gilmour *et al.* 1961, Begara-McGorum, Wildblood *et al.* 1998).

6.2.3 Mögliche Ursachen für Unterschiede nach experimenteller und natürlicher Infektion

Diese zeitlichen Diskrepanzen zwischen experimentellen und natürlichen Infektionen in der Ausscheidung von MAP bzw. der Bildung von MAP-spezifischen Antikörpern sind auch bei Infektionsmodellen mit anderen Tierarten beschrieben (Hines, Stabel *et al.* 2007). Gemeinhin werden diese auf unterschiedliche Grundvoraussetzungen der Infektion zurückgeführt. Dabei haben die Route und der Zeitpunkt der Infektion, die Infektionsdosis sowie der jeweilige MAP-Stamm einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung (Whittington and Sergeant 2001, Reddacliff and Whittington 2003, Begg, O'Brien *et al.* 2005, Mortier, Barkema *et al.* 2013). In der vorliegenden Studie wurden diese Einflussfaktoren den natürlichen Verhältnissen bestmöglich angepasst. Dies wurde umgesetzt durch eine orale Inokulation mit einem Feldisolat von MAP, die zu einem frühen Zeitpunkt im Leben der Ziegen einsetzte, und durch die Verwendung verhältnismäßig geringer Infektionsdosen.

Die hier angewandte Inokulationsdosis war mit zehnmaliger Gabe von $1,16 \times 10^7$ KBE bis $5,51 \times 10^7$ KBE niedriger als in anderen Studien mit experimenteller Infektion von Ziegen (Storset, Hasvold *et al.* 2001, Munjal, Tripathi *et al.* 2005). Sie wurde bewusst am unteren Rand des von Hines, Stabel *et al.* (2007) beschriebenen Spektrums der für Infektionsmodelle mit Ziegen bislang verwendeten Infektionsdosen (3×10^7 KBE bis 8×10^{10} KBE) angesiedelt. Da von Ziegen Ausscheideraten von bis zu $9,5 \times 10^6$ KBE MAP/g Kot bekannt sind, entsprechen die in diesem Infektionsmodell verabreichten Inokulationsdosen ungefähr der Aufnahme von 1 g bis 5 g Kot einer klinisch apparent MAP-infizierten Ziege (Eamens, Walker *et al.* 2007). Unter Feldbedingungen in einer durchseuchten Herde ist eine solche Aufnahme von infiziertem Kot insbesondere deshalb als realistisch einzuschätzen, da diese Dosen lediglich alle zwei bis drei Tage verabreicht wurden. Trotzdem ist anzunehmen, dass die meisten Tiere in Nutztierbeständen geringere Dosen aufnehmen, da z.B. kein Kontakt zu klinisch apparent erkrankten Tieren besteht. Möglicherweise ist also die in dieser Studie verabreichte Infektionsdosis, trotz aller Bemühungen bei sicherer Infektion der Tiere eine möglichst geringe Dosis zu wählen, höher als die durchschnittliche Infektionsdosis unter natürlichen Verhältnissen.

Da ein Zusammenhang zwischen der Infektionsdosis und der Schwere der Infektion bereits beschrieben wurde, kann dieser Umstand zu einem beschleunigten Verlauf der Erkrankung beigetragen haben (McGregor, Dhand *et al.* 2012, Mitchell, Medley *et al.* 2012). In diesem Zusammenhang könnten allerdings auch andere Faktoren eine Rolle gespielt haben. Eine besondere Empfänglichkeit der Thüringer Waldziegen gegenüber MAP ist bisher nicht beschrieben. Es ist lediglich bekannt, dass der Zuchtbestand, aus dem die Versuchstiere stammten, keine Historie von MAP-Infektionen aufwies. Dies kann allerdings auf der guten Abschirmung und Gesundheitskontrolle des Bestandes beruhen. Bei der Ausstattung der Ziegenlämmer mit maternalen Antikörpern gegen MAP konnte in diesem Infektionsmodell naturgemäß nicht den natürlichen Verhältnissen entsprochen werden. Unter Feldbedingungen wären bei Infektion der Jungtiere höchstwahrscheinlich auch die Muttertiere mit MAP infiziert oder mindestens MAP gegenüber exponiert gewesen. Mit dem Kolostrum hätten ihre Ziegenlämmer folglich MAP-spezifische Antikörper und maternale Immunzellen aufnehmen können. Donovan, Reber *et al.* (2007) sprachen der Aufnahme von pathogen-spezifischen, maternalen Immunzellen einen positiven Einfluss auf die zelluläre Immunabwehr des Jungtieres zu. Die fehlende Aufnahme von MAP-spezifischen Antikörpern mit dem

Kolostrum förderte allerdings bei Pithua, Godden *et al.* (2009) nicht die Entwicklung von Paratuberkulose. Auch besteht die Möglichkeit, dass der Inokulationsstamm JII-1961 eine besonders hohe Pathogenität gegenüber Ziegen aufweist. Dazu wurden noch keine Studien durchgeführt, es ist jedoch bekannt, dass die Kultivierung von MAP-Stämmen im Labor deren Pathogenität herabsenken kann (Stewart, Vaughan *et al.* 2004, Begg, O'Brien *et al.* 2005). Insofern könnte der hier verwendete Stamm eine höhere Pathogenität als Stämme haben, die länger im Labor kultiviert wurden. Im Vergleich mit verschiedenen Referenzstämmen wies der Stamm allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Invasivität gegenüber Zellkulturen auf (Borrmann, Mobius *et al.* 2011).

6.2.4 Zwischenfazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das angewandte Inokulationsschema unter weitgehender Berücksichtigung der Umstände bei einer natürlichen Infektion zu einer sicheren Infektion der Tiere führt. Unter Berücksichtigung der beobachteten Beschleunigung des Infektionsverlaufs ist das Modell geeignet, um Entwicklungen der Immunantwort auf MAP im Verlauf der Infektion darzustellen. Weiterhin können anhand dieses Modells die immunologischen Abwehrmechanismen untersucht werden, welche den verschiedenen Ausprägungen der Infektion vorausgehen. Denn wie die vorhergenannten Untersuchungen experimenteller MAP-Infektionen sowie die hier vorliegende Studie zeigen, kommt es selbst bei gleichartiger und gleichzeitiger Infektion altersgleicher Tiere zu Variationen im Verlauf der Paratuberkuloseinfektion.

Die innerhalb der vorliegenden Studie erhobenen Daten sind allerdings nur für den subklinischen Verlauf der Erkrankung repräsentativ. Denn lediglich ein Tier entwickelte zum Ende des Versuchszeitraums klinische Symptome wie Fieber und Abmagerung, während alle anderen Versuchstiere klinisch inapparent blieben. Der Versuchszeitraum müsste entsprechend verlängert werden, wenn Verhältnisse während des Übertritts in die klinisch apparente Phase bzw. innerhalb dieser untersucht werden sollen.

6.3 Hypothese 2: Die angewandten Methoden sind geeignet, die zelluläre Immunantwort auf MAP bei Kontroll- und Versuchstieren darzustellen.

Es sollte geprüft werden, welchen technisch und methodisch bedingten Einflüssen die Testergebnisse in der vorliegenden Studie ausgesetzt waren. Dafür wurden parallel zur Bearbeitung der gewonnenen Proben sowohl interne Kontrollen zur Varianz-

analyse als auch Positivkontrollen zur Überprüfung der Reaktionsfähigkeit der PBMC mitgeführt. Es wurde die Robustheit des Referenzgens GAPDH gegenüber den Versuchsbedingungen eruiert. Anhand der IFN- γ -Antwort auf JPPD wurde beispielhaft untersucht, wie die Testergebnisse durch Stress bei Rangordnungsneubildungen beeinflusst werden. Dabei wurde, wie auch bei allen anderen untersuchten Fragestellungen, bewusst darauf verzichtet, bei statistischen Tests eine Bonferroni-Korrektur vorzunehmen. Eine solche hätte bei multiplen Tests den Fehler erster Art senken können, so dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Stichproben mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einem tatsächlich wahren Unterschied entsprochen hätte. Allerdings hätte es diese Vorgehensweise bei dem teilweise geringem Stichprobenumfang erschwert, einen tatsächlich vorliegenden Unterschied als solchen festzustellen. Der Fehler zweiter Art, einen tatsächlichen Unterschied nicht als solchen zu erkennen, wäre größer gewesen. Damit ist in dieser Studie die Aussagekraft einzelner, als statistisch signifikant klassifizierter Unterschiede eingeschränkt. Allerdings gewinnen ermittelte statistische Unterschiede an Gewicht, wenn sich diese zu verschiedenen Messzeitpunkten wiederholen und im Hinblick auf die Pathogenese biologisch plausibel sind. Diese Umstände machen es wahrscheinlicher, dass signifikante Unterschiede Tatsachen beschreiben und keine Zufallsprodukte sind.

6.3.1 Varianzanalysen

Collins, Angulo *et al.* (1993) bewerteten die Variabilität der Ergebnisse in verschiedenen Laboren für einen kommerziell erhältlichen ELISA zum Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern. Dabei wurden Varianzkoeffizienten von $14,5 \% \pm 9,8 \%$ für die verschiedenen Tagesansätze und von $6,7 \% \pm 2,8 \%$ für verschiedene Replikate als akzeptabel angegeben. Die in der vorliegenden Studie ermittelten, entsprechenden Varianzkoeffizienten des IFN- γ - ($10,83 \%$ und $3,09 \%$) und IL-10-ELISA ($14,68 \%$ und $6,47 \%$) fielen durchweg geringer aus und sind in diesem Vergleich ebenfalls als akzeptabel zu erachten.

Zur Varianz der real-time PCR nach reverser Transkription von RNA aus PBMC gibt es nach Kenntnis der Autorin bisher keine Veröffentlichung. In der vorliegenden Studie zeigte sich allerdings, dass die Gesamtvarianz der Genexpressionsanalyse deutlich geringer ausfiel als die des IFN- γ - bzw. IL-10-ELISA (Variationskoeffizienten: $1,74 \%$ bzw. $19,09 \%$ und $19,07 \%$). Damit zeigte sich die Genexpressionsanalyse mit der ihr innewohnenden geringen methodischen Variabilität besonders geeignet, um geringe

Unterschiede in der Genexpression zwischen Vergleichsgruppen zu erkennen. Als besonders kritischer Punkt in der Minimierung methodisch bedingter Varianz gilt die Zugabe von exakt gleichen Mengen an cDNA zu einzelnen PCR-Ansätzen. Dies ist jedoch aufgrund von möglichen Inhomogenitäten der Proben und minimalen Pipettierfehlern kaum zu gewährleisten (Jacobs, Goetghebeur *et al.* 2014). Die Anfertigung von Vorverdünnungen der cDNA vor Probenzugabe kann hier zur geringen Gesamtvarianz der PCR beigetragen haben.

Unabhängig von der Höhe der Gesamtvarianzen und der einzelnen Varianzanteile hatte allerdings keine der getesteten Einflussgrößen einen systematischen Effekt auf die Vergleiche zwischen unstimulierten und stimulierten PBMC bzw. zwischen Proben von Kontroll- und von Versuchstieren. Die Proben von Kontroll- und von Versuchstieren waren jeweils gleichmäßig auf den Einzelplatten eines Tagesansatzes und damit auch den Plattenchargen, die beim IFN- γ -ELISA den größten Anteil an der Gesamtvarianz hatten, verteilt. Die zusammengehörigen Proben stimulierter und unstimulierter PBMC befanden sich dabei stets auf derselben Platte. Sämtliche Unterschiede zwischen den Chargen, den Einzelplatten und den einzelnen Vertiefungen der Platte haben sich also jeweils mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf beide Elemente dieser Vergleiche ausgewirkt.

6.3.2 Positivkontrollen

Die Analyse der Positivkontrollen bewies, dass die Fähigkeit der PBMC auf geeignete Stimuli mit Veränderungen der Zytokin-Sekretion, der Zytokin-Genexpression bzw. der Expression von Zelloberflächenmolekülen zu reagieren, von der Entnahme der Blutproben bis zur Stimulation im ausreichendem Maß erhalten blieb. Allerdings zeigten sich bei PBMC von Versuchstieren höhere Reaktionen auf die Stimulation mit ConA bzw. LPS als bei PBMC von Kontrolltieren. Dies lässt auf eine allgemein höhere Reaktionsbereitschaft der PBMC von Versuchstieren schließen, die durch ähnliche Stimulationsversuche auch bei natürlich und klinisch inapparent mit MAP infizierten Rindern beschrieben wurde (Stabel 2000). Für PBMC von klinisch apparent erkrankten Rindern hingegen ist eine allgemein verminderte zelluläre Immunantwort beschrieben, die sich auch in der Reaktion auf Mitogene niederschlägt (Kreeger and Snider 1992, Stabel 1996, Stabel 2000). Bis zum Ende der Studie wurde jedoch kein deutlicher Abfall mitogeninduzierter Zytokinproduktion (nach Stimulation mit ConA oder LPS) bei PBMC der Versuchstiere festgestellt. Dies korrespondiert mit der

Tatsache, dass die Mehrzahl der Tiere während des Versuches nicht in die klinische Phase eintrat. Der aus der Literatur und den hier ermittelten Ergebnissen ableitbare Unterschied zwischen der Reaktivität der PBMC von klinisch inapparent bzw. klinisch apparent infizierten Tieren schränkt die Übertragbarkeit der hier ermittelten Ergebnisse auf klinisch apparent infizierte Tiere ein. Für die klinisch inapparent infizierten Tiere ist die hier festgestellte, allgemein höhere Reaktionsbereitschaft der PBMC jedoch nicht als Störfaktor sondern als dieser Infektionsphase zugehöriges Charakteristikum zu verstehen. Möglicherweise wurden auch die Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren nach spezifischer Stimulation erst durch diesen Effekt so deutlich messbar.

6.3.3 Robustheit von GAPDH

GAPDH wurde in diversen Veröffentlichungen als adäquates Referenzgen beschrieben (Leutenegger, Alluwaimi *et al.* 2000, Bustin 2002, Nolan, Hands *et al.* 2006, Schmittgen and Livak 2008, Kaser, Mullebner *et al.* 2012). Die Robustheit der Genexpression von GAPDH gegenüber den Versuchsbedingungen wurde dennoch anhand der in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten überprüft. Anhand der mit ConA bzw. LPS stimulierten Positivkontrollen wurde dabei deutlich, dass die Genexpression von GAPDH durchaus durch äußere Einflüsse verändert werden kann. Der Einfluss der 24-stündigen Stimulation mit JPPD bzw. APPD auf die Genexpression von GAPDH war jedoch als gering einzuschätzen. Signifikante Unterschiede gegenüber der Mediumkontrolle wurden nach Stimulation mit JPPD bzw. APPD lediglich vereinzelt und sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchstieren ermittelt und hatten somit keinen systematischen Einfluss. Auch der Infektionsstatus der Tiere wirkte sich kaum auf die Genexpression von GAPDH in stimulierten PBMC bzw. in der Mediumkontrolle aus. Nur in BT 5, zeitgleich mit der Hochphase der IFN- γ -Freisetzung durch JPPD-stimulierte PBMC von Versuchstieren, exprimierten die PBMC der Versuchstiere nach 24-stündiger Stimulation mit JPPD bzw. APPD signifikant mehr GAPDH als die der Kontrolltiere. Dennoch darf der zu einem einzelnen BT festgestellte, statistisch signifikante Unterschied, wie in 6.3 diskutiert, nicht überbewertet werden. Die höhere Genexpression von GAPDH bei den Versuchstieren führte außerdem beim Vergleich der Δ CT-Werte für die Zytokine zwischen Kontroll- und Versuchstieren im BT 5 zu keinen Auffälligkeiten. Betrachtet man des Weiteren die altersbedingte Entwicklung der Genexpression von GAPDH bei den PBMC von

Kontrolltieren, so scheint diese bei jungen Tieren tendenziell geringer zu sein, als bei älteren Tieren. Dieser Trend findet sich allerdings nicht bei den PBMC von Versuchstieren wieder. Bei diesen fanden sich zu frühen Zeitpunkten sowohl signifikant höhere, als auch signifikant niedrigere Genexpressionen von GAPDH als zu späteren Zeitpunkten. Dies deutet darauf hin, dass entweder die bei den Kontrolltieren ermittelten, signifikanten Unterschiede in der Genexpression von GAPDH keinen allgemein gültigen Verlauf widerspiegeln, oder dass der Einfluss der Infektion diesem bei den Versuchstieren entgegenwirkt. Auf die getroffenen Aussagen zu der Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren und der Charakterisierung von verschiedenen Infektionsverläufen innerhalb der Gruppe der Versuchstiere haben die in diesem Kapitel besprochenen Beobachtungen jedoch keinen Einfluss.

6.3.4 Einfluss Rangordnungsstress

Es sollte ebenfalls untersucht werden ob Unruhe und Stress in den Tiergruppen die Testergebnisse der Tiere beeinflusst. Da während der Versuchsdauer einzelne Versuchs- bzw. Kontrolltiere zur Sektion aus dem Versuch genommen wurden, kam es unter den verbleibenden Tieren zu Rangordnungsneubildungen. Anhand der zeitlichen Assoziation zwischen der Veränderung im Gruppengefüge und der Blutentnahme konnten bei den Versuchstieren zu drei der vier Sektionstermine zwei Gruppen definiert werden. Da alle Kontrolltiere in einer Gruppe gehalten wurden, ließen sich diese nicht derart differenzieren. Der Einfluss des Stresses auf die Immunantwort wurde anhand der durch MAP-Antigene induzierten IFN- γ -Freisetzung bei den Versuchstieren untersucht. Die IFN- γ -Antwort wurde hier als Indikator gewählt, da sich diese bei den Versuchstieren einerseits als gut messbar und andererseits als interindividuell stark variierend erwiesen hatte. Die Tiere, deren Rangordnung vor der Blutentnahme beeinflusst war, zeigten dabei unabhängig vom Stimulationsansatz eine tendenziell höhere IFN- γ -Freisetzung als Tiere in stabiler Rangordnung. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede jedoch nur jeweils im BT 3 bei der Mediumkontrolle und nach Stimulation mit MAP 1365. Angesichts der hohen allgemeinen Streuungen in der IFN- γ -Freisetzung innerhalb der Gruppe der Versuchstiere und des lediglich zu einem Zeitpunkt vorkommenden signifikanten Unterschieds ist dieser allerdings eher als Zufallsprodukt zu werten.

6.3.5 Zwischenfazit

Bei den in dieser Studie angewandten Methoden konnten keine methodischen Einflüsse nachgewiesen werden, die artifizielle Unterschiede zwischen den Tiergruppen bzw. zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen hätten bewirken können. Daher sind die in der vorliegenden Studie verwendeten Testsysteme als geeignet anzusehen, die zelluläre Immunantwort der Tiere darzustellen und Unterschiede in dieser zwischen Kontroll- und Versuchstieren zu untersuchen.

6.4 Hypothese 3: Die Kontroll- und Versuchstiere lassen sich anhand ihrer zellulären Immunantwort auf MAP differenzieren und dies früher als anhand der humoralen Immunantwort bzw. der MAP-Ausscheidung.

Die Ergebnisse zur zellulären Immunantwort auf MAP bieten verschiedene Möglichkeiten die Infektion nachzuweisen. Bei mit JPPD stimulierten PBMC wurden einige statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchstieren gefunden; diese zeigten sich vom ersten BT an und zu mehreren, aufeinander folgenden BT bei der Freisetzung von IFN- γ , bei der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α , sowie bei der Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen. Dabei war die Differenzierung zwischen infizierten und gegenüber MAP naiven Tieren mit Hilfe dieser Parameter zu einem früheren Zeitpunkt im Infektionsverlauf möglich als mit Hilfe des Nachweises von MAP-spezifischen Antikörpern. Ähnliche Ergebnisse erlangten auch Antognoli, Hirst *et al.* (2007) und Hughes, Denham *et al.* (2013) bei natürlich infizierten Rindern bzw. Schafen und Gwozdz, Thompson *et al.* (2000), Reddacliff and Whittington (2003), Begg, O'Brien *et al.* (2005) und Storset, Hasvold *et al.* (2001) bei experimentell infizierten Schafen und Ziegen.

Die Testergebnisse der Kontrolltiere wurden zu allen Zeitpunkten zur Festlegung eines Grenzwertes herangezogen, der der Differenzierung zwischen infizierten und naiven Tieren dienen sollte. Bei Anwendung dieses Grenzwertes wurden jedoch einzelne Tiere der vorliegenden Studie nicht ihrem Infektionsstatus entsprechend klassifiziert. Um den Wert des Tests zu verschiedenen Zeitpunkten *p.i.* einschätzen zu können wurden daher für jeden Untersuchungszeitpunkt Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten bestimmt. Bei mit JPPD stimulierten PBMC wichen die Richtig-Negativ-Raten der Freisetzung von IFN- γ , der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α sowie der Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen nur in Einzelfällen von

100 % ab. Die Richtig-Positiv-Raten dieser Parameter waren vergleichsweise heterogener. Für den IL-10-Test sowie die Genexpression von IL-10, IL-18 und TGF- β wurden keine solchen Berechnungen angestellt, da sich diese Parameter in der vorliegenden Studie nicht geeignet zeigten die infizierten Tiere von den nicht infizierten Kontrolltieren zu unterscheiden.

6.4.1 IFN- γ -Test

Der IFN- γ -Test wurde bereits mehrfach bei experimentell bzw. natürlich infizierten Rindern, Schafen und Ziegen angewendet. Dabei wurde dem Test in verschiedenen Studien eine hohe Spezifität von 93,6 bis 99 % zugeschrieben (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Perez, Tellechea *et al.* 1999, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Kalis, Collins *et al.* 2003, Huda, Jungersen *et al.* 2004, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006, Lybeck, Storset *et al.* 2010). Dies wird durch die hier ermittelte Richtig-Negativ-Rate von 100 % bei der Identifizierung von infizierten Tieren anhand des SI nach JPPD-Stimulation bestätigt. Falsch-positive Ergebnisse, wie sie in anderen Studien für Jungtiere beschrieben wurden (McDonald, Ridge *et al.* 1999, Jungersen, Huda *et al.* 2002, Huda, Lind *et al.* 2003), zeigten sich in der vorliegenden Studie nicht.

Die Sensitivität des IFN- γ -Test bei Ziegen wurde nach Kenntnis der Autorin bisher nicht veröffentlicht. Die dafür in der vorliegenden Studie bei Betrachtung des SI nach JPPD-Stimulation ermittelten Richtig-Positiv-Raten von 68,4 bis 100 % ab BT 2 scheinen aber angesichts der für klinisch inapparent infizierte Schafe veröffentlichten Sensitivitäten von 87,5 bis 100% durchaus realistisch (Perez, Tellechea *et al.* 1999).

6.4.2 IL-10-Test

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass die Produktion von IL-10 in PBMC MAP-infizierter Rinder und Schafe durch MAP-Antigene induziert wird (Weiss, Evanson *et al.* 2002, Coussens, Verman *et al.* 2004). Es ist sogar möglich MAP-exponierte bzw. MAP-infizierte Schafen anhand der IL-10-Antwort ihrer PBMC von Kontrolltieren zu unterscheiden (de Silva, Begg *et al.* 2011). In der hier vorliegenden Studie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Maximal 30 % der Versuchstiere wurden pro BT mittels des errechneten Grenzwerts richtig als MAP-positiv erkannt während zu den meisten BT auf diesem Wege keines der Versuchstiere richtig identifiziert werden konnte. Möglicherweise fand die Entnahme von Zellkulturüberständen nach 64-stündiger Stimulation zu spät statt, um eine deutliche IL-10-Antwort detektieren zu können. In

unveröffentlichten Versuchen mit caprinen PBMC wurde ein Anstieg der IL-10-Antwort bis zu einer Stimulationszeit von 72 h beobachtet (Kather und Köhler, unveröffentlicht). Andere Studien legen weitaus frühere Probenahmezeitpunkte nahe, da dort das Maximum des IL-10-Nachweises nach zwei bzw. vier Stunden Stimulation erreicht wurde (Weiss, Evanson *et al.* 2005, de Almeida, Colvin *et al.* 2008). Tatsächlich zeigten sich in der vorliegenden Studie nach einstündiger Inkubation der Mediumkontrolle bzw. der mit JPPD bzw. APPD stimulierten PBMC teilweise signifikant höhere Genexpressionen von IL-10 als nach 24-stündiger Inkubation. Jedoch war auch in der Genexpression von IL-10 weder nach einstündiger noch nach 24-stündiger Inkubation ein Unterschied zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren sichtbar.

6.4.3 Genexpression von IL-12p40

In der vorliegenden Studie zeigte sich die Genexpression von IL-12p40 in für 24 Stunden mit JPPD stimulierten PBMC von Versuchstieren durchgehend signifikant höher als in gleich behandelten PBMC von Kontrolltieren. Während die Richtig-Negativ-Rate bei Anwendung des aus den Δ CT-Werten errechneten Grenzwertes über den gesamten Versuchszeitraum 100 % betrug, lag die Richtig-Positiv-Rate nur von BT 5 bis BT 9 bei über 50 %. Nach Kenntnis der Autorin ist dies jedoch die erste Beschreibung der durch MAP-Antigen induzierten, gegenüber Kontrolltieren erhöhten Genexpression von IL-12p40 durch PBMC MAP-infizierter Tiere. Allerdings gibt auch Coussens (2004) an, dass unveröffentlichten Daten zu Folge (Coussens, P.M. *et al.*) die Genexpression von IL-12p40 in PBMC MAP-infizierter Tiere durch Stimulation mit MAP steigt. Andere Studien machten entweder keine Aussage darüber, in welcher Untereinheit von IL-12 sich die nachgewiesene Gensequenz befindet, oder untersuchten eine Gensequenz von IL-12p35. Singh, Singh *et al.* (2013) fanden die Genexpression von IL-12 in PBMC experimentell infizierter Ziegenlämmer vier, acht und zwölf Monate *p.i.* nach 18-stündiger Stimulation mit einem Vollzellantigen 40 % bis 49 % geringer exprimiert als in gleichbehandelten PBMC von Kontrolltieren. Möglicherweise ist aber dieses andersartige Ergebnis auf im Vollzellantigen reichlich vorhandenes LAM zurückzuführen, welches die pro-inflammatorische Immunantwort inhibiert (Ellner and Daniel 1979, Moreno, Mehlert *et al.* 1988, Sibley, Hunter *et al.* 1988, Chan, Fan *et al.* 1991, Arsenault, Maattanen *et al.* 2014). Dafür spricht auch, dass mit MAP infizierte Makrophagen in anderen *in vitro* Versuchen vielfach bis zu 24 Stunden nach Infektion eine erhöhte Genexpression von IL-12 zeigten (Weiss,

Evanson *et al.* 2002, Zur Lage, Goethe *et al.* 2003, Plain, de Silva *et al.* 2011). Bei Weiss, Evanson *et al.* (2002) war 72 Stunden *p.i.* hingegen keine Genexpression von IL-12 mehr nachweisbar. In einer nachfolgenden Studie führten Weiss, Evanson *et al.* (2005) die zuvor beobachtete, MAP-induzierte, aber verzögert einsetzende Inhibition der IL-12-Genexpression auf die Gegenregulation durch ebenfalls nach der MAP-Infektion gebildetes IL-10 zurück.

6.4.4 Genexpression von IL-18

Anhand der Genexpression von IL-18 war in der vorliegenden Studie keine Unterscheidung zwischen den Kontroll- und Versuchstieren möglich. Nach Kenntnis der Autorin wurden bisher keine Daten zur antigen-induzierten Genexpression von IL-18 in PBMC MAP-infizierter Tiere veröffentlicht. In Organproben vom terminalen Ileum MAP-infizierter Schafe zeigte sich die Genexpression von IL-18 abhängig von der Verlaufsform der Erkrankung stark verschieden (Smeed, Watkins *et al.* 2007). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Untersuchungen von mit dem Ileum assoziiertem Lymphgewebe klinisch inapparent infizierter Rinder (Tanaka, Sato *et al.* 2005). So ist die Genexpression von IL-18 vermutlich zur Differenzierung zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren weniger geeignet, aber möglicherweise von Relevanz für die Unterscheidung verschiedener Verlaufsformen der Infektion bzw. für das Verständnis der Pathogenese derselben.

6.4.5 Genexpression von TGF- β

Die Genexpression von TGF- β war in JPPD-stimulierten PBMC unbeeinflusst vom Infektionsstatus der Tiere. Auch in einer anderen Studie mit natürlich mit Paratuberkulose infizierten Rindern zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von TGF- β zwischen klinisch inapparent infizierten und nicht infizierten Rindern (Coussens, Verman *et al.* 2004). Auch auf Proteinebene wurde in einer Untersuchung der Produktion von TGF- β von PBMC natürlich und klinisch inapparent mit MAP infizierter Rinder nach Stimulation mit lebenden MAP kein Unterschied zu nicht infizierten Kontrolltieren gefunden (Khalifeh and Stabel 2004).

6.4.6 Genexpression von TNF- α

TNF- α war bei den Versuchstieren nach JPPD-Stimulation der PBMC fast durchgängig signifikant höher exprimiert als bei den Kontrolltieren. Die ermittelten Richtig-Negativ-

Raten weichen nur in einem Fall von 100 % ab, aber die Richtig-Positiv-Raten von 16,7 bis 28,6 % (von BT 5 bis BT 13) sind für die Anwendung in der Diagnostik noch unzureichend. Dennoch wird hier ein Unterschied in der Reaktion auf JPPD deutlich, der sehr ähnlich bereits für PBMC natürlich und experimentell MAP-infizierter Rinder nach Stimulation mit MAP-Vollzellantigen beschrieben wurde (Stabel 2000, Subharat, Shu *et al.* 2012). Coussens, Verman *et al.* (2004) fanden hingegen TNF- α in mit MAP stimulierten PBMC von natürlich infizierten Rindern geringer exprimiert als in gleichbehandelten PBMC von gesunden Kontrolltieren. Es wurde aber auch eine deutliche Induktion von IL-10 bei den klinisch inapparent infizierten Versuchstieren festgestellt, die in den vorhergenannten sowie in der vorliegenden Studie nicht gefunden wurde. Die stärkere anti-inflammatorische Immunantwort der von Coussens, Verman *et al.* untersuchten Rinder könnte daher die TNF- α -Produktion gehemmt haben (Weiss, Evanson *et al.* 2005). Die Ursache für diesen Unterschied könnte in dem Infektionsstamm oder dem Alter bei der Infektion liegen; beides war allerdings aufgrund der natürlichen Infektion unbekannt. Auch in Darmgewebeproben MAP-infizierter Schafe wurde im Vergleich mit nicht infizierten Kontrolltieren eine signifikant höhere Expression von TNF- α festgestellt (Alzuherri, Woodall *et al.* 1996).

6.4.7 Expression von CD25 bzw. CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen

Die antigen-induzierte Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD26 auf *in vitro* stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen spiegelt die durch aktive Auseinandersetzung erworbene Immunreaktion auf das betreffende Antigen wider (Garcia, DiSanto *et al.* 1999, Waters, Miller *et al.* 2003, Stabel and Robbe-Austerman 2011). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten daher die Versuchstiere in der vorliegenden Studie zu den ersten fünf bzw. sechs Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Expression von CD25 auf CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen. Für die Bestimmung des Infektionsstatus lagen die Richtig-Negativ-Raten bei Verwendung der MdFIQ-Werte für den Nachweis von CD25 auf CD4⁺ Gedächtniszellen nach JPPD-Stimulation zwischen 90 und 100 %. Gleichzeitig rangierten die Richtig-Positiv-Raten mit einer Ausnahme (16,7 % in BT 6) von BT 4 bis BT 12 von 33,33 bis 66,67 %. Die Beurteilung anhand des Nachweises von CD26 nach JPPD-Stimulation war dafür weniger geeignet, da die Expression von CD26 auf den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen zu Beginn der Untersuchungen nicht so stark ausgeprägt war wie zu den Zeitpunkten BT 5 bis BT 11 bzw. BT 10. So wurde auf den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtniszellen der

Versuchstiere lediglich in BT 5 bis BT 8 bzw. in BT 5, BT 7 und BT 8 eine signifikant höhere Expression von CD26 festgestellt. Sehr ähnliche, ebenfalls früh nachweisbare immunologische Prozesse zeigten sich in zwei Verlaufsstudien über zwölf Monate bzw. 104 Wochen nach oraler, experimenteller Inokulation von Kälbern bzw. Ziegenlämmern (Storset, Hasvold *et al.* 2001, Stabel and Robbe-Austerman 2011). Ab einem Monat *p.i.* konnten in mit Vollzellantigen stimulierten PBMC infizierter Kälber signifikant höhere Prozentsätze von CD25⁺/CD4⁺ bzw. CD25⁺/CD8⁺ Zellen als bei den Kontrolltieren festgestellt werden. Bei den infizierten Ziegenlämmern wurden im Vergleich mit den Kontrolltieren von neun Wochen *p.i.* an bis zum Ende der Studie signifikant höhere Prozentsätze von CD25⁺/CD4⁺ bzw. CD25⁺/CD8⁺ Zellen nachgewiesen. In dem Infektionsversuch mit Kälbern wurde auch die Expression von CD26 untersucht. Hier zeigte sich wie in der vorliegenden Studie die Hochphase der antigen-induzierten Expression von CD26 im Vergleich mit der von CD25 erst zeitversetzt und bei den CD4⁺ Zellen deutlicher als bei den CD8⁺ Zellen. So war bei den mit Vollzellantigen stimulierten PBMC der Versuchstiere der Anteil der CD26⁺/CD4⁺ Zellen trotz ansteigendem Verlaufs zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant höher als der bei gleichbehandelten PBMC der Kontrolltiere. Für die CD26⁺/CD8⁺ Zellen hingegen wurde lediglich zwölf Monate *p.i.* ein solcher signifikanter Unterschied festgestellt. Dass CD26 auf CD4⁺ Zellen stärker als auf CD8⁺ Zellen exprimiert wird, belegt auch eine Studie, in der CD26-spezifische Antikörper zur Differenzierung von Zellpopulationen eingesetzt wurden (Morimoto, Torimoto *et al.* 1989). Auch eine andere Studie an experimentell mit MAP infizierten Kälbern fand bei diesen im Vergleich zu den Kontrolltieren 24 und 50 Wochen *p.i.* einen signifikant höheren Anteil an CD25⁺ bzw. CD26⁺ Gedächtniszellen (Koo, Park *et al.* 2004). In den ersten sechs Monaten nach der Infektion gehörten diese vorwiegend der CD4⁺ Zellpopulation an. Im Vergleich dazu wurden 18 Monate *p.i.* weniger CD4⁺ Gedächtniszellen mit Aktivierungsmarkern, aber deutlich höhere Anteile an CD8⁺ Gedächtniszellen mit CD25 oder CD26 gefunden. Dies kann als Indiz für eine Änderung der Immunantwort im Infektionsverlauf angesehen werden, die jedoch in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden konnte. Es ist möglich, dass dieser Wechsel durch die begrenzte Laufzeit der Studie nicht erfasst werden konnte. Eine Studie an natürlich infizierten Rindern, die klinisch inapparent und im Mittel 5,3 Jahre alt waren, zeigte, dass die Identifizierung infizierter Tiere anhand der antigen-induzierten Expression von CD25 auf PBMC auch im fortgeschrittenen Alter der Tiere gelingen kann (Shu, Subharat *et al.* 2011).

6.4.8 Übertragbarkeit auf Verhältnisse nach natürlicher Infektion

In der vorliegenden Studie wurde bewusst darauf verzichtet die ermittelten Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten mit den Begriffen Spezifität und Sensibilität gleichzusetzen, obwohl sich diese ebenso berechnen. Bei allen Bemühungen die Infektion im Modell naturgetreu nachzustellen, hat dieses Modell seine Limitationen. Zum einen wäre unter Feldbedingungen auch ein Kontakt der Tiere zu anderen Mykobakterienspezies wahrscheinlich. Dieser würde bei Verwendung des Stimulans JPPD aufgrund der in der Literaturübersicht beschriebenen Kreuzreaktionen vor allem bei den Kontrolltieren zu einer höheren Streuung der Ergebnisse und somit zu einer geringeren Spezifität der Tests führen. Die Grenzwerte für die Differenzierung von infizierten und naiven Tieren würden dadurch angehoben und die Sensitivität gleichzeitig gesenkt. Außerdem ist es aufgrund des bei diesem Tiermodell beschriebenen, beschleunigten Infektionsverlaufs möglich, dass PBMC von natürlich infizierten Tieren wesentlich später im Infektionsverlauf bzw. geringer auf JPPD reagieren, als PBMC der hier untersuchten Versuchstiere. Dies würde sich ebenfalls negativ auf die Sensitivität der Tests auswirken.

6.4.9 Zwischenfazit

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass mehrere der verwendeten Testmethoden zum Nachweis der zellulären Immunantwort das Potential zur Differenzierung infizierter und naiver Ziegen besitzen. Dazu zählt insbesondere der IFN- γ -Test, aber auch der Nachweis der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α sowie der Nachweis der Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen in mit MAP-Antigen stimulierten PBMC könnten nach Anpassung der Tests oder der Grenzwerte dazu verwendet werden. Die Verwendung von relativen, also auf die Mediumkontrolle normalisierten Werten (SI, *Ratio* und MdFI_Q), die gegenüber interindividuellen Schwankungen weniger anfällig sind als die absoluten Werte (S/P-Ratio, Δ CT und MdFI), führte dabei nur für den IFN- γ -Test und den Nachweis der Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen zu einer Erhöhung der Differenzierungsqualität. Für den IL-10-Test und die Genexpression von IL-12p40 und TNF- α hingegen waren sowohl die Richtig-Negativ- als auch die Richtig-Positiv-Rate unter Verwendung der absoluten Werte höher. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchstieren konnten darüber hinaus allgemein häufiger beim Vergleich der absoluten Werte als beim Vergleich der relativen Werte ermittelt werden.

Relative Werte bringen insbesondere dann keinen Vorteil zur Differenzierung zwischen Kontroll- und Versuchstieren, wenn der zur Differenzierung zu nutzende Parameter nicht nur bei den stimulierten Zellen, sondern bereits in der unstimulierten Mediumkontrolle der Versuchstiere verändert ist. In solchen Fällen wird die Differenz gegenüber den Werten der Kontrolltiere durch die Verrechnung zum relativen Wert verringert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Versuchstiere in den hier untersuchten Tests eine Tendenz zu einer erhöhten Reaktivität der unstimulierten PBMC aufweisen, die sich nur in den vorhergenannten Berechnungen niederschlägt. Eine allgemein höhere Reaktivität auf unspezifische Stimulation zeigten sowohl die PBMC der hier untersuchten Versuchstiere, als auch solche von klinisch inapparent mit MAP infizierten Rindern (vgl. 6.3.2). Ob die hier ermittelten Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten allerdings mit der Spezifität bzw. der Sensitivität unter Feldbedingungen übereinstimmen, muss in Feldversuchen überprüft werden.

Unter experimentellen Bedingungen stellte sich der IFN- γ -Test im Vergleich mit dem Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion als deutlich besser geeignet für die frühe Infektionsphase dar. Der Nachweis von MAP im Kot gelang wie der IFN- γ -Test von Beginn an, letzterer wies aber ab BT 3 höhere Richtig-Positiv-Raten auf. Die hohen Nachweisraten von MAP in Kotproben direkt nach der Inokulation und in BT 1 und BT 2 entsprechen jedoch, wie in 6.2.1 bereits diskutiert, nicht den Erwartungen nach einer natürlichen Infektion mit MAP. Daher ist nicht auszuschließen, dass sich auch die zelluläre Immunantwort in diesem Modell früher nachweisen lässt, als es unter Feldbedingungen der Fall gewesen wäre. Allerdings belegen auch andere Studien, dass sich die zelluläre Immunantwort unter natürlichen Bedingungen früher nachweisen lässt als MAP-spezifische Antikörper bzw. MAP im Kot (Billman-Jacobe, Carrigan *et al.* 1992, Huda, Jungersen *et al.* 2004, Robbe-Austerman, Stabel *et al.* 2006).

Im Hinblick auf die Spezifität zeigten die untersuchten Testmethoden keine Vorteile gegenüber dem Nachweis von MAP in Kotproben bzw. von MAP-spezifischen Antikörpern im Serum. Diese herkömmlichen Nachweismethoden zeigten im Gegensatz zu den Nachweisen der zellulären Immunantwort keinerlei falsch-positive Ergebnisse. Es besteht also noch Optimierungsbedarf in der Wahl des Stimulans für den Nachweis der zellulären Immunantwort, sodass falsch-positive Ergebnisse (wie bereits in 2.4.2.2 beschrieben) reduziert bzw. eliminiert werden.

6.5 Hypothese 4: Die Spezifität bzw. die Sensitivität des IFN- γ -Tests lässt sich durch Verwendung MAP-spezifischer Antigene bzw. IL-10 blockierender Antikörper steigern.

Ergebnisse diverser Studien legen nahe, dass die Spezifität bzw. die Sensitivität des IFN- γ -Tests optimiert werden können, wenn bei der Restimulation MAP-spezifische Antigene bzw. IL-10 blockierende Antikörper zum Einsatz kommen (vgl. 2.4.2.3). Ein für MAP hochspezifisches Stimulans würde nicht nur Kreuzreaktionen reduzieren, die letztlich über die Grenzwertfestlegung auch die Sensitivität beeinflussen, sondern vor allem die Spezifität des Tests erhöhen. Ein IL-10 blockierender Antikörper könnte die IFN- γ -Produktion erhöhen und die Sensitivität des Tests steigern.

6.5.1 MAP-spezifische Antigene für die Restimulation im IFN- γ -Test

Die hier verwendeten, MAP-spezifischen rekombinanten Proteine erzeugten in der verwendeten Konzentration und in einzelner Anwendung nur vereinzelt, bzw. im Falle vom rekombinanten Protein BLAG in keinem Fall, signifikante Unterschiede in der IFN- γ -Freisetzung der PBMC von Kontroll- bzw. Versuchstieren.

Das rekombinante Protein BLAG wurde allerdings im Vorfeld der Studie lediglich auf seine Eigenschaften in serologischen Tests geprüft (Tim Bull, St George's University of London, London, Großbritannien; persönliche Mitteilung). Die Induktion einer zellulären Immunantwort durch BLAG war daher kein zu erwartendes Ergebnis. Die Möglichkeit, dass BLAG ein Potential zum Nachweis der zellulären Immunantwort aufweist, wird durch die vorliegende Studie aber auch nicht widerlegt, da BLAG aus Bereitstellungsgründen nicht vor der 33. Woche *p.i.* eingesetzt werden konnte. Möglicherweise hätte, wie bei den anderen rekombinanten Proteinen, zu einem früheren Zeitpunkt im Infektionsverlauf eine Reaktion der zellulären Immunantwort auf BLAG festgestellt werden können.

Die rekombinanten Proteine MAP 1365, MAP 0268c und MAP 3651c hingegen bewiesen bereits im Vorfeld ihr Potential in Vollblutproben von natürlich und klinisch inapparent mit MAP infizierten Schafen eine erhöhte Freisetzung von IFN- γ zu induzieren (Hughes, Denham *et al.* 2013). Statistisch signifikant waren diese Unterschiede nach Stimulation mit MAP 3651c bzw. MAP 0268c. Ähnlich wie in der hier vorliegenden Studie fanden auch Hughes, Denham *et al.* (2013) die Induktion der IFN- γ -Freisetzung am deutlichsten bei dem MAP-Protein MAP 3651c. Die rekombinanten Proteine wur-

den bei Hughes *et al.* allerdings in einer Konzentration von 10 µg/ml, also im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie in der doppelten Konzentration eingesetzt.

Hughes, Denham *et al.* (2013) zeigten weiterhin, dass das Antigengemisch JPPD die Freisetzung von IFN- γ in den Blutproben stärker induzierte als die einzeln zur Stimulation eingesetzten rekombinanten Proteine, obwohl JPPD mit einer Konzentration von 2,5 µg/ml nur ein Viertel so hoch konzentriert eingesetzt wurde. Eine kombinierte Anwendung rekombinanter Proteine soll unveröffentlichten Beobachtungen zu Folge synergistisch auf die IFN- γ -Freisetzung wirken und damit die Sensitivität des Tests erhöhen (Hughes, Denham *et al.* 2013). Eine kombinierte Verwendung von Antigenen könnte durch das breitere Epitop-Spektrum die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Präsentation durch entsprechende MHC-Moleküle erhöhen (Kathaperumal, Kumanan *et al.* 2009, Casey, Sanalla *et al.* 2011, Mikkelsen, Aagaard *et al.* 2011).

Anders als erwartet wies der IFN- γ -Test unter Verwendung von MAP 3651c als Stimulans in der vorliegenden Studie eine niedrigere Richtig-Negativ-Rate auf als unter Verwendung von JPPD. Möglicherweise müsste für eine höhere Spezifität des so modifizierten IFN- γ -Tests der Grenzwert noch optimiert werden.

6.5.2 Nutzen des IL-10-Blocks bei der Restimulation für den IFN- γ -Test

Um die Sensitivität des IFN- γ -Tests zu erhöhen, wurden sowohl bei Buza, Hikono *et al.* (2004) als auch in der vorliegenden Studie IL-10-blockierende Antikörper zum Stimulationsansatz zugegeben. Die Freisetzung von IFN- γ konnte in der vorliegenden Studie durch die Neutralisation des antagonistisch wirkenden IL-10 fast durchgehend statistisch signifikant gesteigert werden. Nur in dem ersten BT, der bei Kontroll- wie bei Versuchstieren eine hohe Streuung aufwies, und in BT 6, in dem nur noch sechs Tiere mit dem IL-10-Block getestet wurden, waren die gemessenen Konzentrationen an IFN- γ nicht signifikant höher als nach alleiniger Anwendung von JPPD zur Stimulation. Buza, Hikono *et al.* (2004) beschrieben sogar eine durch den IL-10-Block erreichte, 23-fache Steigerung der IFN- γ -Freisetzung. Hierbei kam ein IFN- γ -Test für Vollblutproben von experimentell mit MAP infizierten Rindern zum Einsatz. Der Einsatz IL-10 blockierender Antikörper schien sowohl in der hier vorliegenden Studie als auch bei Buza, Hikono *et al.* keine negativen Auswirkungen auf die Spezifität des Tests zu haben.

6.5.3 Zwischenfazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen Berichte über die Steigerung der Sensitivität durch Zugabe IL-10-blockierender Antikörper während der *ex vivo* Restimulation. Zur Verbesserung der Spezifität des IFN- γ -Tests ist der Einsatz eines MAP-spezifischen Stimulans unumgänglich. Die hier untersuchten MAP-spezifischen Antigene zeigen mit Ausnahme von BLAg das Potential eine spezifische IFN- γ -Antwort in PBMC zu induzieren. Jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um die für die Restimulation von PBMC optimale Konzentration bzw. eine geeignete Kombination der jeweiligen Antigene zu ermitteln. Dabei sollte das MAP-Protein BLAg auch zu einem früheren Zeitpunkt im Infektionsverlauf getestet werden.

6.6 Hypothese 5: Immunpathologische Prozesse in der frühen Phase der Infektion bestimmen den Verlauf der Erkrankung bei Ziegen.

Diese Hypothese wurde aufgestellt, da für Schafe ähnliches bereits beschrieben ist (Perez, Tellechea *et al.* 1999, Smeed, Watkins *et al.* 2007, Begg, de Silva *et al.* 2010, de Silva, Begg *et al.* 2013). Zu ihrer Prüfung wurden die Versuchstiere anhand der Besiedlung ihrer Organe durch MAP in die Teilgruppen der Kn-, PB- und MB-Tiere unterteilt. Diese wurden hinsichtlich ihrer Immunantwort charakterisiert. Dabei zeigten sich Unterschiede in Parametern der zellulären Immunantwort, die bereits in anderen Studien mit unterschiedlichen Infektionsverläufen in Zusammenhang gebracht wurden.

6.6.1 Besiedlung der Organe mit MAP im Infektionsverlauf

Im Versuchsverlauf stiegen die Wachstumsindizes von MAP in den Organproben nicht linear an. Vielmehr wiesen die Versuchstiere bereits einen Monat bzw. drei Monate *p.i.* verglichen mit den nachfolgenden Sektionsterminen eine durchschnittlich stärkere Besiedlung der darm-assoziierten sowie der nicht darm-assoziierten Organe mit MAP auf. Ähnliche Verhältnisse zeigte auch eine Studie mit experimentell infizierten Schafen (Brotherston, Gilmour *et al.* 1961). In den untersuchten, nicht darm-assoziierten Lokalisationen wurde MAP in der vorliegenden Studie sechs bzw. neun Monate *p.i.* nur noch im Leberlymphknoten nachgewiesen. Möglicherweise hatte eine früh einsetzende zelluläre Immunantwort zu diesem Zeitpunkt bereits einen Teil der Mykobakterien abgetötet. Coussens (2004) beschrieb in einem Modell der Immunantwort auf MAP, dass im Blut zirkulierende, aktivierte, pro-inflammatorische T-Zellen mangels enger Zellkontakte nicht durch Einflüsse der anti-inflammatorischen T-Zellen

an der Freisetzung von IFN- γ gehindert würden. Demnach könnte sich in der Peripherie des Infektionsgeschehens, also in den nicht darm-assoziierten Lokalisationen, am ehesten ein pro-inflammatorisches Milieu halten, das die Beseitigung der Mykobakterien begünstigt. Verschiedene Studien deuteten für das Gewebe des Ileums und des damit assoziierten Lymphgewebes hingegen an, dass sich die MAP-Infektion aufgrund des inhibierenden Einflusses der dort vorkommenden anti-inflammatorischen T-Zellen halten kann; die Infektion könne sich später von dort aus erneut ausbreiten (Hines, Kreeger *et al.* 1995, Coussens 2004, Wu, Livesey *et al.* 2007). Die Ergebnisse der in der vorliegenden Studie zwölf Monate *p.i.* seziierten Tiere sprechen für eine solche erneute Ausbreitung der Infektion. Bei diesen Tieren finden sich teilweise wieder allgemein erhöhte Wachstumsindizes der Organproben, auch einhergehend mit erneutem Nachweis von MAP in verschiedenen nicht darm-assoziierten Organen. Die Höhe der festgestellten Wachstumsindizes variierte dabei stark. Ob sich dieses Wiederaufleben der Infektion bei einigen Versuchstieren allein mit einer weniger günstigen Abwehrlage in bestimmten infizierten Geweben erklären lässt oder welche Rolle evtl. eine orale Reinfektion der Tiere durch Aufnahme von kontaminierten Ausscheidungen spielen kann, ist nicht ganz klar. Allerdings konnten Schafe bzw. Mäuse, die nach einer Infektion mit MAP bzw. dem attenuierten Rindertuberkulosestamm Bacillus Calmette-Guérin erneut mit diesen Erregern infiziert wurden, bei der Reinfektion einer neuerlichen Vermehrung der Mykobakterien zuvorkommen (Collins and Miller 1969, Angus and Gilmour 1971). Diese Ergebnisse sprechen dagegen, dass die in der vorliegenden Studie beobachtete Ausbreitung von MAP im Gesamtorganismus zwölf Monate *p.i.* durch eine orale Reinfektion der Tiere bedingt wurde.

6.6.2 Unterschiede in der Besiedlung durch MAP zwölf Monate *p.i.* als Kriterium für die Einteilung in Teilgruppen

Da sich zwölf Monate *p.i.* deutliche Unterschiede zwischen den Versuchstieren hinsichtlich des kulturellen Nachweises von MAP aus Organproben zeigten, wurden entsprechende Teilgruppen definiert. Drei Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine moderate und drei weitere Tiere eine starke Bakterienlast in den Organproben. Diese Tiere wurden auch von Krüger, Köhler *et al.* (2014) als Tiere mit paucibazillären bzw. multibazillären Läsionen beschrieben und in der vorliegenden Studie als PB- bzw. MB-Tiere definiert. Bei natürlich infizierten Rindern, Schafen und Ziegen wurden ebenfalls Tiere beschrieben, bei denen entweder pauci- oder multibazilläre Läsionen überwogen

(Clarke and Little 1996, Corpa, Garrido *et al.* 2000, Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Dennis, Reddacliff *et al.* 2011, Vazquez, Garrido *et al.* 2013). Bei einem Tier der vorliegenden Studie gelang 12 Monate *p.i.*, ähnlich wie bei einem Infektionsversuch mit Ziegen von Munjal, Tripathi *et al.* (2005), kein kultureller Nachweis von MAP in Organproben. Dieses Tier wurde deshalb als Kn-Tier bezeichnet. Sweeney, Whitlock *et al.* (2006) zu Folge kann der wahre Infektionsstatus eines Tieres erst nach Untersuchung von 30 Organproben aus dem Darm als gesichert angesehen werden. Hier sprach allerdings die Gesamtheit der Befunde dieses Tieres dafür, dass es sich um ein Tier handelt, das eine Infektion mit MAP erlebt, aber nahezu eliminiert hat. In anderen Studien mit natürlich bzw. experimentell infizierten Schafen lagen zum Teil ähnliche Befunde vor, wenn Tiere als infiziert, aber „asymptomatisch“ beschrieben wurden (Smeed, Watkins *et al.* 2007, de Silva, Begg *et al.* 2009).

6.6.3 Vergleiche zwischen den Teilgruppen

Die hier verglichenen Teilgruppen wiesen Stichprobenumfänge von $n = 1$ (Kn-Tier) bzw. $n = 3$ (PB- bzw. MB-Tiere) auf, sodass im Folgenden beim Vergleich zwischen den Kn-, PB- und MB-Tieren lediglich von Tendenzen gesprochen werden kann. Im Kontext mit Ergebnissen anderer Studien zeichnen sich jedoch Zusammenhänge zwischen Parametern der zellulären Immunantwort und dem Ausgang der Infektion ab. Wenn möglich, wurden dafür Studien herangezogen, die diese mit möglichst gleichen Voraussetzungen untersucht haben. Bei Ermangelung solcher musste auf Studien zurückgegriffen werden, die andere Materialien als PBMC untersucht haben. Ergebnisse von Gewebeproben sind allerdings nur eingeschränkt vergleichbar, da sie stark von lokalen Prozessen beeinflusst sein können, die nicht für die Gesamtheit der Läsionen repräsentativ sein müssen (Begara-McGorum, Wildblood *et al.* 1998). PBMC hingegen spiegeln im Vergleich dazu eher eine Art Gesamtüberblick über die lokalen Vorgänge wider (Storset 2003). Verglichen mit den MB-Tieren zeigte sich bei den PB-Tieren die Tendenz zu einer früher einsetzenden und initial höheren JPPD-induzierten IFN- γ -Freisetzung. Der Antikörpertiter hingegen war, über alle Untersuchungszeitpunkte hinweg betrachtet, bei den MB-Tieren signifikant höher als bei den PB-Tieren (Mann-Whitney-U-Test; Daten nicht dargestellt). Diese Ergebnisse stützen somit die bereits mehrfach beschriebene Assoziation der paucibazillären Form mit einer starken zellulären Immunantwort und der multibazillären Form mit einer starken humoralen Immunantwort (Clarke and Little 1996, Navarro, Ramis *et al.* 1998, Burrells, Clarke *et*

al. 1999). Dabei gehörten sowohl die PB- als auch die MB-Tiere zu der Teilgruppe der Dauerausscheider. Jedoch waren die in der kulturellen Anzucht aus Kotproben ermittelten WI-Werte bei den MB-Tieren höher als bei den PB-Tieren.

6.6.3.1 IFN- γ -Test

Unterschiede in der IFN- γ -Antwort konnten mit der späteren Ausprägung der Infektion in Zusammenhang gebracht werden. So war bei den JPPD-stimulierten PBMC von dem Kn-Tier und den PB-Tieren bereits ab BT 3 ein sprunghafter Anstieg der Freisetzung von IFN- γ zu beobachten. Bei den MB-Tieren trat dieser einen Monat später, ab BT 4, ein und erreichte dabei nicht dieselben Maximalwerte. Andere Studien mit experimentell bzw. natürlich infizierten Schafen zeigten ebenfalls, dass eine hohe MAP-antigeninduzierte Freisetzung von IFN- γ eine effiziente Kontrolle bzw. Elimination des Erregers reflektiert (Perez, Tellechea *et al.* 1999, Smeed, Watkins *et al.* 2007, Begg, de Silva *et al.* 2010, de Silva, Begg *et al.* 2013). Bei Begg, de Silva *et al.* zeigten nicht nur die paucibazillären Tiere gegenüber den multibazillären Tieren eine höhere durch MAP-Antigen induzierte IFN- γ -Antwort, sondern auch die Nichtausscheider gegenüber den Ausscheidern. Diese Verhältnisse zeichneten sich in der vorliegenden Studie ebenfalls ab. Die Unterschiede in der IFN- γ -Freisetzung waren allerdings nicht nur nach Stimulation der PBMC mit JPPD und dem dazu weitgehend homologen APPD, sondern auch nach Stimulation mit ConA erkennbar. Ähnliches wurde bereits nach unspezifischer Stimulation von PBMC MAP-infizierter Schafe mittels *Pokeweed Mitogen* beobachtet (Begg, de Silva *et al.* 2010). Auch bei PBMC multibazillärer Rinder wurde eine schwächere Proliferation in Reaktion auf Mitogene festgestellt und als allgemeiner Verlust lymphozytärer Funktionen bei fortgeschrittener Paratuberkulose gedeutet (Stabel 2000). Coussens (2004) schrieb dieses Phänomen der Entwicklung einer Population von zytotoxischen, immunregulatorischen Zellen zu.

6.6.3.2 IL-10-Test und Genexpression von IL-10

Während die Freisetzung von IL-10 durch mit JPPD stimulierte PBMC wenig Unterschiede zwischen den Teilgruppen offenbarte, waren diese auf Ebene der Genexpression deutlicher zu erkennen. Den Ergebnissen des IL-10-Tests zu Folge war die IL-10-Freisetzung bei den PBMC des Kn-Tieres und der PB-Tiere nach JPPD-Stimulation lediglich zu Beginn der Untersuchungen (in BT 2 und BT 4) höher als bei denen der MB-Tiere. Wie bereits in 6.4.2 diskutiert, könnte die Stimulation für 64

Stunden suboptimal gewählt sein. Die Genexpression von IL-10 nach 24-stündiger Stimulation könnte somit evtl. die tatsächlichen Verhältnisse korrekter abbilden. Hier zeigten sich bei dem Kn-Tier und den PB-Tieren tendenziell höhere Werte als bei den MB-Tieren. Ganz ähnliche Ergebnisse fanden auch Gillan, O'Brien *et al.* (2010) in mit JPPD stimulierten PBMC. Bei mit MAP infizierten Schafen und Rindern ist ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten IL-10-Antwort auf MAP und einem wenig progressiven Infektionsverlauf beschrieben. Bei natürlich infizierten Schafen zeigte sich die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung zu entgehen positiv assoziiert mit der durch MAP-Antigen induzierten Freisetzung von IL-10 vier Monate *p.i.* (de Silva, Begg *et al.* 2013). Gleiches galt dabei für die durch MAP-Antigen induzierte Freisetzung von IFN- γ . Eine andere Studie beschrieb einen negativen Zusammenhang zwischen der Sekretion von IL-10 durch PBMC und der Anzahl an MAP-positiven Organ- und Kotproben in experimentell infizierten Kälbern (Subharat, Shu *et al.* 2012). Wieder andere Studien beschrieben eine hohe IL-10-Antwort assoziiert mit einer hohen Bakterienlast bzw. mit klinischen Symptomen (Khalifeh and Stabel 2004, Tanaka, Sato *et al.* 2005, Smeed, Watkins *et al.* 2007). Anders als in der vorliegenden Studie ging die IL-10-Antwort in diesen Untersuchungen jedoch nicht mit einer starken zellulären Immunantwort einher. Außerdem wurden in diesen Studien keine PBMC sondern Organproben vom Darm und von darm-assoziierten Lymphknoten untersucht. Daher könnten die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse auch durch verschiedene Anteile zytokinproduzierender Zellen in den untersuchten Probenmaterialien bedingt sein (de Silva, Begg *et al.* 2009).

6.6.3.3 Genexpression von IL-12p40

Die Genexpression von IL-12p40 nach JPPD-Stimulation war nicht nur bei den Versuchstieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren sondern auch bei den PB-Tieren tendenziell höher als bei den MB-Tieren. Smeed, Watkins *et al.* (2007) beschrieben dazu passend in paucibazillären Gewebeproben aus dem terminalen Ileum klinisch apparent und natürlich infizierter Schafe eine tendenziell höhere Expression von IL-12p40 als in multibazillären Gewebeproben. Auch in Gewebeproben von mit *M. leprae* infizierten Patienten war die Genexpression von IL-12 in paucibazillären Läsionen 10-fach höher als in multibazillären Läsionen (Sieling and Modlin 1994). Im Gegensatz dazu fand sich bei natürlich und klinisch inapparent infizierten Rindern in mit dem Ileum assoziierten Lymphknoten multibazillärer Tiere

eine tendenziell höhere Genexpression von IL-12p40 als bei paucibazillären Tieren (Tanaka, Sato *et al.* 2005).

6.6.3.4 Genexpression von IL-18

Die Genexpression von IL-18 durch JPPD-stimulierte PBMC veränderte sich bei allen untersuchten Teilgruppen im Laufe des Versuchs. Während diese bei den PB-Tieren (und tendenziell auch bei dem Kn-Tier) zu Beginn am geringsten ausfiel und bis zum Ende des Versuchs anstieg, zeigte sich bei den MB-Tieren ein entgegengesetzter, abfallender Verlauf der IL-18-Genexpression. Die Genexpression von IL-18 in mit dem Ileum assoziiertem Lymphgewebe mindestens 18 Monate alter, natürlich und klinisch inapparent infizierter Rinder zeigte sich in multibazillären Läsionen statistisch signifikant geringer als in paucibazillären Läsionen (Tanaka, Sato *et al.* 2005). Smeed, Watkins *et al.* (2007), die die Genexpression von IL-18 in Gewebeproben vom terminalen Ileum klinisch apparent und natürlich infizierter Schafe untersuchten, stellten hingegen keinen Unterschied zwischen Tieren mit paucibazillären und multibazillären Läsionen fest. In beiden Teilgruppen war die Genexpression von IL-18 höher als bei den Kontrolltieren. Eine dritte Teilgruppe MAP-infizierter Schafe wies hingegen sowohl im Vergleich zu den Kontrolltieren als auch im Vergleich zu den anderen infizierten Schafen eine geringere Genexpression von IL-18 im Ileumgewebe auf. Diese, von Smeed, Watkins *et al.* als „asymptomatische“ Schafe beschriebenen Tiere zeigten keine klinischen Symptome, es gelang aber sowohl der Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern als auch der Nachweis von MAP im Gewebe per PCR. Ob diese „asymptomatischen“ Schafe jedoch mit dem in der vorliegenden Studie charakterisierten Kn-Tier vergleichbar sind, ist schon aufgrund der unterschiedlichen Antikörperantwort fraglich, da das Kn-Tier über den Versuchszeitraum keinen positiven Antikörpertiter entwickelte. Das deutet darauf hin, dass bei diesen Tieren unterschiedliche immunologische Prozesse abgelaufen sind.

6.6.3.5 Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD26

Bei für sechs Tage mit JPPD stimulierten CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen von PB-Tieren wurde im Vergleich mit solchen von MB-Tieren eine tendenziell höhere Expression von CD25 festgestellt. Ähnliches zeigte sich bei Leukozyten natürlich mit MAP infizierter Schafe (Gillan, O'Brien *et al.* 2010). Bei paucibazillären Schafen war die absolute Anzahl der Zellen, die CD25 exprimierten, nach dreitägiger Stimulation

mit JPPD höher als bei multibazillären Schafen. Auch experimentell infizierte Schafe zeigten mit geringerer Wahrscheinlichkeit klinische Symptome, wenn sie eine höhere Anzahl von Zellen, die CD25 exprimieren, aufwiesen (Begg, O'Brien *et al.* 2005).

Die Expression von CD26 nach JPPD-Stimulation hingegen war bei PBMC der MB-Tiere tendenziell höher als bei denen der PB-Tiere. Leider sind bisher keine vergleichbaren Ergebnisse zur Expression von CD26 bei mit MAP infizierten Tieren veröffentlicht worden. Bei mit *M. leprae* infizierten Patienten zeigte sich allerdings die Expression von CD26 mit der IFN- γ -Antwort korreliert. In Hautproben von Patienten mit paucibazillärer Form war CD26 höher exprimiert als in solchen von Patienten mit multibazillärer Form (Scheel-Toellner, Richter *et al.* 1995). Andere Studien stellten einen Zusammenhang zwischen einer fehlgeleiteten oder gar auto-aggressiven Immunantwort (z.B. bei Rheumatoider Arthritis, Morbus Basedow, Asthma und Multipler Sklerose) und einer starken Expression von CD26 her (Eguchi, Ueki *et al.* 1989, Hosono, Ohnuma *et al.* 2003, Kruschinski, Skripuletz *et al.* 2005).

Das Kn-Tier wurde in der vorliegenden Studie nur zwei Mal in die durchflusszytometrischen Untersuchungen eingeschlossen, weshalb über die bei diesem Tier geltenden Verhältnisse keine Aussage gemacht werden kann.

6.6.4 Ausprägung der zellulären Immunantwort in den Teilgruppen

PB-Tiere und MB-Tiere wiesen Charakteristika in der zellulären Immunantwort auf MAP-Antigene auf, die die Teilgruppen voneinander unterschieden. Unterschiedliche Tendenzen zeigten sich nach JPPD-Stimulation der PBMC in der Freisetzung von IFN- γ und IL-10, in der Genexpression von IL-12p40 und IL-18 und in der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen (vgl. 6.6.3). Dabei korrelierte die nach JPPD-Stimulation ermittelte Freisetzung von IFN- γ statistisch signifikant mit der von IL-10, mit der Genexpression von IL-12p40 und der Expression von CD25 und CD26 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen. Es handelt sich dabei lediglich um geringe bis mittlere Korrelationen, denn die einzelnen Parameter weisen zeitlich versetzte Höhepunkte auf. Dennoch ergibt sich mit diesen Parametern ein Muster der zellulären Immunantwort auf MAP, das mit dem Infektionsverlauf in Zusammenhang gebracht werden kann. Die Genexpression von IL-18 korrelierte nicht statistisch signifikant mit der Freisetzung von IFN- γ , der Rangkorrelationskoeffizient deutet allerdings eine sehr geringe negative Korrelation an.

Wenn man den bei PB-Tieren vergleichsweise stärker ausgeprägten Parametern einen protektiven Charakter zuschreibt, wäre zunächst anzunehmen, dass sich diese bei dem Kn-Tier mindestens genauso deutlich darstellen wie bei den PB-Tieren. Dies war jedoch in der vorliegenden Studie wie in zwei Studien mit natürlich MAP-infizierten Tieren nicht der Fall. So zeigten PBMC von natürlich infizierten Ziegen, die nach MAP-Infektion geringe bzw. MAP-unspezifische Läsionen ohne darin nachweisbare Mykobakterien aufwiesen, eine schwächere IFN- γ -Antwort als Tiere mit deutlicherer Pathologie (Lybeck, Lovoll *et al.* 2013). Auch natürlich infizierte Schafe ohne histopathologische Veränderungen zeigten keine stärkere zelluläre Immunantwort als solche mit paucibazillären Läsionen (Gillan, O'Brien *et al.* 2010). Vielmehr fanden Gillan, O'Brien *et al.* bei den Schafen ohne histopathologische Veränderungen einen immunologischen Phänotyp, der zwischen dem der Kontrolltiere und dem der paucibazillären Tiere lag. Letztlich stellt sich also die Frage, ob der Schlüssel zur Kontrolle der Infektion in einer frühen, möglichst starken oder doch eher in einer ausreichend starken, aber nicht ausufernden zellulären Immunantwort zu finden ist. Sollte ersteres der Fall sein, könnte man die geringeren Messwerte des Kn-Tiers dadurch erklären, dass dieses Tier eine relativ geringe Anzahl an MAP und an Entzündungsherden aufweist. So kann lokal eine sehr starke zelluläre Immunantwort ablaufen, die sich jedoch in der Peripherie nicht in der gleichen Frequenz an MAP-spezifischen Effektorzellen niederschlagen muss. Jedoch ist auch möglich, dass eine gute Balance zwischen einer schnellen, starken zellulären Immunantwort und den zum Gewebsschutz nötigen Regulationsmechanismen nötig ist, um die Infektion effektiv einzudämmen. Festgestellt werden kann ohne weitere Untersuchungen nur, dass ohne eine starke zelluläre Immunantwort die Kontrolle der Infektion nicht gelingt.

Eine früh einsetzende und starke Produktion von IFN- γ in Antwort auf MAP-Antigene, wie sie das Kn-Tier und die PB-Tiere zeigten, wurde mehrfach als der wichtigste Faktor für eine effiziente Abwehr der mykobakteriellen Infektion beschrieben (Cooper, Adams *et al.* 2002, Zuniga, Torres-Garcia *et al.* 2012). IFN- γ ist essentiell für die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, was wiederum erst die erfolgreiche Abtötung nach Phagozytose von MAP durch diese ermöglicht (Boehm, Klamp *et al.* 1997, Stabel 2000, Schroder, Hertzog *et al.* 2004). IFN- γ fördert in diesem Zusammenhang nicht nur die Reifung der Phagosomen, sondern auch die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Makrophagen (Schaible, Sturgill-Koszycki *et al.* 1998, Cooper, Adams *et al.* 2002). Es aktiviert außerdem NK-Zellen, welche

zusätzlich zu ihrer zytotoxischen Funktion wie die Monozyten und Makrophagen zur weiteren Produktion von IFN- γ und IL-12 beitragen (Boehm, Klamp *et al.* 1997, Munder, Mallo *et al.* 1998, Carnaud, Lee *et al.* 1999, Schroder, Hertzog *et al.* 2004).

IL-12 weist in vielerlei Hinsicht ähnliche Funktionen wie IFN- γ auf und unterstützt die zelluläre Immunantwort (Robertson, Soiffer *et al.* 1992, Trinchieri 1995). Vor allem aber induziert das durch IFN- γ in seiner Produktion geförderte IL-12 im Gegenzug wiederum die Produktion von IFN- γ in NK-Zellen, Th1-Zellen und in Synergie mit IL-18 auch in Makrophagen (Trinchieri 1995, Boehm, Klamp *et al.* 1997, Munder, Mallo *et al.* 1998). Durch diese wechselseitige Induktion der Produktion korreliert eine starke IFN- γ -Antwort in der Regel, und so auch in der vorliegenden Studie, mit einer hohen Konzentration an IL-12. Die Kombination beider Zytokine zeigte sich bereits als essentiell für die Eindämmung bzw. Beseitigung von mykobakteriellen Infektionen (Flynn, Goldstein *et al.* 1995, Rosenzweig and Holland 2005).

Für die ausreichende Produktion von IFN- γ , aber auch von IL-12 ist allerdings wiederum auch IL-18 wichtig (Kawakami, Koguchi *et al.* 2000, Wei, Leung *et al.* 2001, Kinjo, Kawakami *et al.* 2002). Nicht zuletzt durch seine Wirkung auf die Produktion von IFN- γ und IL-12 zeigte sich IL-18 in verschiedenen Infektionsmodellen als relevant für die Abwehr mykobakterieller Infektionen (Sugawara, Yamada *et al.* 1999, Kinjo, Kawakami *et al.* 2002, Schneider, Korbel *et al.* 2010). IL-18 wurden allerdings auch Funktionen zugewiesen, die der Th1-Immunantwort zuwider laufen (Yoshimoto, Tsutsui *et al.* 1999, Hoshino, Yagita *et al.* 2000, Nakanishi, Yoshimoto *et al.* 2001). Ob diese allerdings bei Infektionen mit Mykobakterien zum Tragen kommen, ist fraglich, da die pro-inflammatorische Wirkung von IL-18 in den Infektionsmodellen überwiegt. Eine weitere Untersuchung dieser unterschiedlichen Funktionsweisen von IL-18 könnte aber Aufschluss darüber geben, warum sich die Genexpression von IL-18 in der vorliegenden Studie zwischen den PB- und MB-Tieren unterschied, dabei aber weder mit der Genexpression von IL-12 noch mit der Freisetzung von IFN- γ korrelierte.

TNF- α fördert die rasche Rekrutierung der Immunzellen aus dem Blutkreislauf zum Infektionsherd und damit die dortige Produktion von IFN- γ , IL-12 und IL-18 (Sedgwick, Riminton *et al.* 2000, Roach, Bean *et al.* 2002, Egen, Rothfuchs *et al.* 2008). In einem mathematischen Modell der MAP-Infektion wurden der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen eine besondere Relevanz für die Entwicklung der Infektion zugewie-

sen (Klinkenberg and Koets 2015). Dennoch zeigten die in der vorliegenden Studie untersuchten Teilgruppen keine Unterschiede in der Genexpression von TNF- α .

Nach dem Erstkontakt mit MAP stehen für die schnelle und ausreichende Produktion der zuvor beschriebenen Zytokine und für die rasche Bekämpfung der Infektion durch zytotoxische Mechanismen sensibilisierte CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen bereit. In der vorliegenden Studie wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ Gedächtniszellen von PB-Tieren eine höhere Expression von CD25 nachgewiesen als auf denen von MB-Tieren. CD25 ist Teil des IL-2-Rezeptors, der die Proliferation der T-Zellen induziert, wenn er das pro-inflammatorische Zytokin IL-2 bindet (Malek 2008, Letourneau, Krieg *et al.* 2009). Somit ist anzunehmen, dass die CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen der PB-Tiere stärker bei pro-inflammatorischer Zytokinausschüttung proliferieren als die der MB-Tiere. Die so neu gebildeten CD4⁺ Zellen unterstützen die zelluläre Immunantwort weiterhin durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Cerottini and MacDonald 1989, Flynn and Chan 2001, Serbina and Flynn 2001). Auch die CD8⁺ Zellen produzieren pro-inflammatorische Zytokine und wirken zusätzlich zytotoxisch auf Zellen, die infiziert sind und deren MHC-I-Moleküle körperfremde Antigene präsentieren (Flynn and Chan 2001, Serbina and Flynn 2001, Wong and Pamer 2003, Zhang and Bevan 2011).

Der Aktivierungsmarker CD26 hingegen wurde in der vorliegenden Studie auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen der MB-Tiere tendenziell stärker exprimiert als auf denen der PB-Tiere. CD26 vermittelt sowohl die Co-Stimulation als auch die Proliferation dieser Zellen und trägt somit ebenfalls zur zellulären Immunantwort bei (Munoz, Blazquez *et al.* 1992, Tanaka, Kameoka *et al.* 1993, Boonacker and Van Noorden 2003). In diesem Zusammenhang ist jedoch von größerer Bedeutung, dass CD26 in der Lage ist, die chemotaktische Funktion bestimmter Chemokine mittels enzymatischer Umsetzung zu potenzieren (Boonacker and Van Noorden 2003, Lim, Burns *et al.* 2005, Rai, Thakur *et al.* 2012). Damit, und da es die Durchlässigkeit von Endothelzellen für Immunzellen erhöht, trägt CD26 zur Rekrutierung von T-Zellen zum Infektionsgeschehen bei (Ikushima, Munakata *et al.* 2002). Allerdings konnte auch bei verschiedenen Erkrankungen, die mit einer fehlgeleiteten oder gar auto-aggressiven Immunantwort einhergehen, eine starke Expression von CD26 festgestellt werden (Eguchi, Ueki *et al.* 1989, Hosono, Ohnuma *et al.* 2003, Kruschinski, Skripuletz *et al.* 2005). Insofern ist, auch im Zusammenhang mit den anderen Befunden, denkbar,

dass die hohe Bakterienlast der MB-Tiere letztlich nicht durch eine zu geringe, sondern eher durch eine fehlgeleitete zelluläre Immunantwort bedingt ist.

In diesem Sinne erscheint es weniger paradox, dass bei den PB-Tieren die im Vergleich mit den MB-Tieren stärkeren pro-inflammatorischen Reaktionen mit einer ebenfalls erhöhten Produktion an IL-10 einhergehen. Dies zeigte sich auch bei ähnlichen Untersuchungen (Subharat, Shu *et al.* 2012, de Silva, Begg *et al.* 2013). Es ist allerdings nicht klar, ob die IL-10-Antwort ursächlich zur Kontrolle der Infektion beiträgt oder ob sie als Nebeneffekt der starken IFN- γ -Antwort gewertet werden muss. Jedenfalls schützt nicht nur eine starke zelluläre Immunantwort, sondern auch eine gute Balance zwischen dieser und einer diese regulierenden IL-10-Produktion das infizierte Gewebe (Zhou, Streutker *et al.* 2004, O'Garra and Vieira 2007, Gillan, O'Brien *et al.* 2010, Cope, Le Friec *et al.* 2011). IL-10 kann also dadurch protektiv wirken, dass negative Effekte einer ansonsten überbordenden zellulären Immunantwort auf die Gewebsintegrität begrenzt werden. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass IL-10 nicht ausschließlich anti-inflammatorisch wirksam ist (Cohen, Katsikis *et al.* 1994, Schlaak, Hermann *et al.* 1994). So konnten Cohen, Katsikis *et al.* die Expression von CD25 auf CD4⁺ Zellen durch Zugabe von exogenem IL-10 erhöhen. Dieser Effekt zeigte sich nicht nur bei bestimmten untersuchten Zellklonen sondern auch in PBMC. Jedoch ging diese Steigerung der CD25-Expression nicht bei allen untersuchten CD4⁺ T-Zell-Klonen mit einer erhöhten IL-2-induzierten Proliferation einher. Schlaak, Hermann *et al.* wiesen in PBMC eine durch IL-10 induzierte Proliferation von T-Zellen nach. Unter welchen Umständen IL-10 die Proliferation von pro-inflammatorisch wirksamen Zellen unterstützt, geht aus diesen Studien jedoch nicht deutlich hervor. Möglich scheint jedoch, dass IL-10 die erfolgreiche Abwehr einer mykobakteriellen Infektion nicht ausschließlich durch die Limitierung der zellulären Immunantwort fördert.

6.6.5 Zwischenfazit

PB-Tiere zeigten sowohl in dieser als auch in anderen Studien eine mindestens zeitweise stärkere zelluläre Immunantwort auf MAP als MB-Tiere. Die Ergebnisse des Kn-Tiers waren schwieriger mit denen anderer Studien zu vergleichen, da sich keine exakten Entsprechungen dieser Verlaufsform finden ließen. Es deutet sich jedoch an, dass Tiere, die die Infektion mit MAP kontrollieren, im Vergleich mit den PB-Tieren eine schwächere zelluläre Immunantwort auf MAP zeigen. Demnach ist die Protektion

der Tiere nicht allein durch die Stärke der zellulären Immunantwort bedingt. Da diese Unterschiede in der Immunantwort auf MAP bereits zu einem so frühen Zeitpunkt der Infektion festgestellt wurden, könnten diese an der Weichenstellung für den weiteren Verlauf der Infektion beteiligt sein. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass es sich bei den hier vorgenommenen Klassifizierungen in Kn-, PB- und MB-Tiere nicht um verschiedene pathogenetische Stadien handelt, die in einander übergehen, sondern um voneinander unabhängige Krankheitsverläufe der Paratuberkulose. Für die Paratuberkulose der Schafe wird angenommen, dass es unterschiedliche Krankheitsverläufe gibt, die letztlich zu verschiedenen pathologischen und histologischen Befunden führen (Clarke and Little 1996, Smeed, Watkins *et al.* 2007, Gillan, O'Brien *et al.* 2010, de Silva, Begg *et al.* 2013). Für Rinder, bei denen mehr Mischformen gefunden wurden als bei Schafen, scheinen pauci- und multibazilläre Läsionen hingegen lediglich verschiedene Stadien innerhalb eines Krankheitsverlaufs zu kennzeichnen (Gonzalez, Geijo *et al.* 2005, Vazquez, Garrido *et al.* 2013). In dieser Hinsicht scheint also die Paratuberkulose bei Ziegen mehr der Paratuberkulose bei Schafen zu ähneln als der bei Rindern.

Was letztlich ursächlich für die unterschiedlichen, frühen immunpathogenetischen Prozesse bei den Teilgruppen verantwortlich ist, können die vorliegenden Daten nicht abschließend klären. Wie in 6.2.3 bereits erörtert, kann der Infektionsverlauf durch die Route und das Alter bei der Infektion, durch die Infektionsdosis sowie durch den Infektionsstamm beeinflusst sein. Für die vorliegende Studie können diese Einflüsse als Ursache für die unterschiedlichen Verlaufsformen der Paratuberkulose jedoch ausgeschlossen werden, da Infektionsroute, -dosis und -stamm bei allen Versuchstieren gleich waren. Die Tiere, die zwölf Monate *p.i.* seziert und als Kn, PB oder MB klassifiziert wurden, wiesen zwar im Infektionsalter maximal einen Unterschied von acht Tagen auf, aber es war kein Zusammenhang zwischen diesem und dem Infektionsverlauf erkennbar (Daten nicht dargestellt). Weitere denkbare Einflüsse aus der Umwelt der Tiere auf die Immunreaktionen sind die Haltung und Fütterung, die Beeinträchtigung der Tiere durch andere Erkrankungen sowie der Stress durch Artgenossen. In der vorliegenden Studie sind wiederum die Haltung und Fütterung aller Tiere gleichartig gestaltet worden, sodass der Einfluss auf die Immunantwort nur gering gewesen sein kann. Durch die Gesundheitskontrolle vor und nach der Einstellung können auch Einflüsse durch andere Erkrankungen ausgeschlossen werden. Der Einfluss der individuellen Position in der Rangordnung kann allerdings

mangels genauer Aufzeichnungen über die Rangordnungsverhältnisse nicht nachvollzogen werden.

Individuelle, genetische Unterschiede können die Empfänglichkeit von Tieren gegenüber MAP und damit den Krankheitsverlauf beeinflussen (Koets, Adugna *et al.* 2000, Mortensen, Nielsen *et al.* 2004, Korou, Liandris *et al.* 2010, Purdie, Plain *et al.* 2011). Interessanterweise stammte das Kn-Tier von anderen Elterntieren ab als die PB- und MB-Tiere, während die PB- und MB-Tiere zwar unterschiedliche Mutter- aber teilweise gleiche Vatertiere hatten (Daten zur Abstammung der Tiere nicht dargestellt).

6.7 Offene Fragen und Verbesserungsoptionen

Für die Weiterentwicklung des Tiermodells hin zu einem, das die Infektion auch in der zeitlichen Dimension authentisch wiedergibt, sollte die Infektionsdosis minimiert werden. Auch bleibt zu klären, welchen Einfluss der verwendete Inokulationsstamm bzw. die untersuchte Ziegenrasse auf den Infektionsverlauf hat. Die Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf die Verhältnisse nach einer natürlichen Infektion muss in Feldstudien überprüft werden. Hier sollte der Infektionsstatus der Tiere anhand von Gewebeproben auf histopathologischer Ebene oder mittels Erregernachweis zweifelsfrei bestimmt werden.

Die Erprobung der Testmethoden in Infektionsversuchen mit anderen Mykobakterienspezies könnte dazu dienen, die wahre Spezifität der Tests zu bestimmen. In diesem Zusammenhang könnte sich die Stimulation mit den in der vorliegenden Studie untersuchten MAP-spezifischen Antigenen als wertvoller zur Identifizierung von mit MAP infizierten Tieren erweisen, als die Stimulation mit JPPD. Dabei sollte auch getestet werden, ob eine höhere Konzentration, bzw. ein kombinierter Einsatz verschiedener MAP-Antigene oder die Zugabe von IL-10-blockierenden Antikörpern die Sensitivität der Tests positiv beeinflussen. Bei diesen Versuchen sollte das MAP-spezifische Antigen BLAg weiterhin berücksichtigt werden. Zur Erhöhung der Sensitivität des IL-10-Tests sollte noch einmal die dafür optimale Stimulationszeit bestimmt werden.

Die methodische Varianz von ELISA-Systemen aus hauseigener Herstellung kann in nachfolgenden Studien weiter reduziert werden: So sollte, um den Varianzanteil unterschiedlicher Plattenchargen zu umgehen, möglichst eine Plattencharge zur Untersuchung aller Proben hergestellt werden. Weiterhin könnten, wie von van der Veen, Oliveira *et al.* (2009) vorgeschlagen, optimierte Protokolle den Umgang mit den Pro-

ben und die Durchführung der ELISA vor allem dort erleichtern und standardisieren, wo mehrere Personen an der Bearbeitung einer Probensammlung beteiligt sind.

Da über die Immunantworten der in verschiedene Teilgruppen eingeordneten Tiere aufgrund der geringen Fallzahlen keine statistisch signifikanten Aussagen gemacht werden konnten, sollten die hier beschriebenen Tendenzen mit höheren Tierzahlen überprüft werden. Um die Anzahl über einen langen Zeitraum zu haltender Tiere zu begrenzen, wäre es möglich, wenige Monate *p.i.* anhand der die Teilgruppen charakterisierenden Parameter der zellulären Immunantwort eine Auswahl aus einer größeren Tierzahl zu treffen. So könnten die gewünschten Gruppengrößen gezielter eingestellt werden. Besonders interessant wäre, ob eine Gruppe von Kn-Tieren ein homogenes immunologisches Muster aufweist, oder ob sich innerhalb dieser Teilgruppe interindividuelle Unterschiede ergeben. Dies würde einen Hinweis darauf geben, ob eine Resistenz gegenüber der Paratuberkulose monokausal bedingt, oder durch verschiedene Faktoren verursacht ist.

Weiterhin wäre wichtig zu prüfen, ob die in der vorliegenden Studie charakterisierten Teilgruppen auch bei längerer Versuchslaufzeit ihr charakteristisches, histopathologisches Erscheinungsbild bewahren. Sollten sich bei den Kn- oder PB-Tieren zu einem späteren Zeitpunkt schwerere, MAP-bedingte Läsionen zeigen, so müsste gegebenenfalls die These verworfen werden, dass diese Klassifizierungen langfristige Entwicklungen der Infektion vorhersagen können.

Um die Ursache(n) für die verschiedenen immunologischen Prozesse in der frühen Phase der MAP-Infektion zu ergründen, sollten bei nachfolgenden Studien weitere Daten erhoben werden. Hier wären Erhebungen der Rangordnungsverhältnisse bei den untersuchten Tieren und eine detaillierte Einsicht in die Verwandtschaftsverhältnisse bzw. eine genetische Untersuchung der Versuchstiere hilfreich.

6.8 Bedeutung für die Paratuberkuloseforschung

Die Ergebnisse dieser Studie können dazu beitragen, das Wissen auf verschiedenen Ebenen der Paratuberkuloseforschung zu vertiefen. Das angewandte Infektionsmodell hat sich bei Berücksichtigung seiner Limitationen als geeignet erwiesen die Infektion mit MAP und die Immunantwort auf MAP darzustellen. So kann es zum einen für die Testung und Evaluierung von Impfstoffen und diagnostischen Testsystemen genutzt werden. Anhand dieses Modells können aber auch wertvolle Daten zur individuellen

Immunantwort auf die Infektion bzw. zu Zusammenhängen zum Infektionsverlauf generiert werden. Das verwendete Inokulationsprotokoll führte bei allen Tieren zur Infektion und kann auch zur Ermittlung einer minimalen, effektiven Infektionsdosis verwendet werden. Die angewandten Messmethoden erwiesen sich als geeignet, die zelluläre Immunantwort der Tiere darzustellen. Die ELISA-Tests zum Nachweis von IFN- γ und IL-10 lieferten bei hauseigener, nicht automatisierter Anfertigung der Testplatten hinreichend konstante Ergebnisse. Im Vergleich damit fielen allerdings die Varianzen in der real-time-PCR deutlich geringer aus, weshalb sie zur Minimierung technisch bedingter Streuungen der Werte vorzuziehen ist.

Es gelang MAP infizierte Ziegen anhand von Parametern der zellulären Immunantwort zu identifizieren. Dieser indirekte Nachweis konnte zu einem früheren Zeitpunkt erbracht werden als der Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern. Die Reaktionen auf JPPD zeigen das Potential der angewendeten Testmethoden, wenn auch offen bleibt, ob dieses Antigen-Gemisch unter Feldbedingungen eine hinreichende Spezifität aufweist. Die Verwendung des MAP-Antigens MAP 3651c ergab vielversprechende Ergebnisse. So ist denkbar, dass dieses, in höherer Konzentration oder in Kombination mit anderen Antigenen eingesetzt, PBMC genauso gut, aber möglicherweise spezifischer, stimuliert als JPPD es vermag.

Immunologische Prozesse unterliegen in der frühen Infektionsphase interindividuellen Unterschieden. Obwohl die Tierzahlen in der vorliegenden Studie keine statistisch signifikanten Aussagen zulassen, deuteten sich Zusammenhänge zwischen der Ausprägung der zellulären Immunantwort auf MAP und der Krankheitsentwicklung an. Auch bei der Pathogenese der Paratuberkulose bei Ziegen könnte es damit, wie bei der der Schafe, unterschiedliche Verlaufsformen geben. Die Grundlage ist gelegt, die frühe Immunantwort auf MAP bei Ziegen gezielter zu untersuchen. Größere Stichprobenumfängen pro Teilgruppe könnten die sich in Tendenzen andeutenden Muster in der zellulären Immunantwort bestätigen oder spezifizieren. Dies würde zum einen das Verständnis der Pathogenese verbessern. Zum anderen könnte dazu beigetragen werden, ein *ex vivo* erzeugbares, spezifisches Zytokin-Muster zu finden, das wiederum als Biomarker für die Infektion mit MAP verwendet werden kann. Möglicherweise ist mit Hilfe dieses Musters dann bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion eine Aussage darüber möglich, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Tier Träger des Erregers ist und mit welcher Wahrscheinlichkeit es klinisch an Paratuberkulose erkranken wird.

7 Zusammenfassung

Paratuberkulose ist eine weltweit verbreitete, chronische Enteritis der Wiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Besonderes Merkmal der Erkrankung ist die regelmäßig sehr lange Inkubationszeit, während derer weder Methoden der direkten noch der indirekten Infektionsdiagnostik zuverlässig anwendbar sind. Für eine effiziente Kontrolle der Tierseuche mangelt es daher an adäquater Diagnostik für die frühe Infektionsphase. Geeignete Impfstoffe stehen nicht zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es, die begonnene Entwicklung eines detailliert definierten Infektionsmodells mit Ziegen fortzusetzen. Mit der Verfolgung von fünf aufeinander aufbauenden Arbeitshypothesen sollte über ein vertieftes Verständnis der (Immun)Pathogenese das diagnostische Potenzial von Methoden zum Nachweis der zellulären Immunantwort überprüft werden.

Achtundzwanzig Thüringer Waldziegen wurden im Alter von durchschnittlich 16 Tagen mit MAP (Stamm JII-1961) inokuliert. Über 51 Wochen wurden vierwöchentlich mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gewonnen und mit Johnin (JPPD), Geflügeltuberkulin, den rekombinanten MAP-Proteinen MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c oder BLAg restimuliert. Die so induzierte Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin(IL)-10 wurde mittels *enzyme linked immunosorbent assay* auf Proteinebene und die von IL-10, IL-12p40, IL-18, *Transforming Growth Factor* β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion auf Genexpressionsebene quantifiziert. Die Expression des Differenzierungsmarkers (CD) CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Zur Einschätzung des Infektionsstatus wurden Daten zur Ausscheidung von MAP mit dem Kot, dem serologischen Status sowie der Bakterienlast der Tiere zu vier definierten Sektionszeitpunkten drei, sechs, neun und zwölf Monate *post inoculationem* (p.i.) herangezogen. Sechzehn nicht-infizierte Tiere dienten als Kontrolle.

Die erste Hypothese, dass das angewandte Inokulationsschema geeignet ist, eine Infektion mit MAP im Tiermodell sicherzustellen, wurde durch einen 100-prozentigen Inokulationserfolg bestätigt. Trotz der Unterschiede zur natürlichen Infektion (vor allem im zeitlichen Verlauf) bietet das Modell eine gute Grundlage für die Bearbeitung weiterführender Fragestellungen.

Die zweite Hypothese war, dass die angewandten *ex vivo* Methoden geeignet sind, die zelluläre Immunantwort auf MAP darzustellen und Kontroll- und Versuchstiere zu unterscheiden. Nach umfänglicher Validierung der Methoden und dem Ausschluss methodischer Fehler, konnten tatsächlich Unterschiede zwischen den Tiergruppen bzw. verschiedenen Stimulationsansätzen nachgewiesen werden.

Die dritte Hypothese besagte, dass die Kontroll- und Versuchstiere sich anhand ihrer zellulären Immunantwort auf MAP früher differenzieren lassen als anhand der humoralen Immunantwort bzw. der MAP-Ausscheidung. Bereits drei Wochen *p.i.* zeigten sich Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren. Am deutlichsten waren diese in der Freisetzung von IFN- γ durch JPPD-stimulierte PBMC. Die Differenzierung von Kontroll- und Versuchstieren anhand dieses Parameters gelang ab der dritten Woche *p.i.* und damit acht Wochen früher als anhand von MAP-spezifischen Antikörpern. Der direkte Nachweis von MAP in Kotproben gelang ebenfalls ab der dritten Woche *p.i.*, der IFN- γ -Test zeigte dabei ab der elften Woche *p.i.* mehr richtig-positive Ergebnisse. In der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α sowie in der Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen waren ebenfalls Gruppen-Unterschiede anhand JPPD-stimulierter PBMC erkennbar.

Die vierte Hypothese, dass die Spezifität bzw. die Sensitivität des IFN- γ -Tests durch Verwendung MAP-spezifischer Antigene bzw. IL-10-blockierender Antikörper zu steigern ist, wurde teilweise bestätigt. MAP 3651c induzierte von den getesteten MAP-spezifischen rekombinanten Proteinen die stärkste IFN- γ -Antwort, welche jedoch deutlich hinter der auf JPPD zurückblieb. Hier wird noch Optimierungspotential vermutet. Die Zugabe IL-10-blockierender Antikörper während der Restimulation hatte indes zu einer Steigerung der IFN- γ -Antwort geführt, welche die Sensitivität des IFN- γ -Tests steigern kann.

Weiterhin zeigten sich Unterschiede innerhalb der Gruppe der inokulierten Versuchstiere. Dies stützt die fünfte Hypothese, dass immunpathologische Prozesse in der frühen Phase der Infektion den Verlauf der Erkrankung bei Ziegen bestimmen. So zeigten die Tiere, die die Infektion mit MAP vergleichsweise gut kontrollieren konnten und wenig MAP ausschieden, zu einem frühen Zeitpunkt immunologische Charakteristika, die ursächlich für die effektive Kontrolle der Infektion sein könnten. Bei JPPD-stimulierten PBMC dieser Tiere war die Produktion von IFN- γ , IL-10 und IL-12p40

sowie die Expression von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen zu einem frühen Zeitpunkt *p.i.* höher als bei den restlichen infizierten Tieren.

Das verwendete Infektionsmodell sowie die angewandten Methoden zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort auf MAP wiesen zwar Optimierungspotential auf, zeigten sich jedoch grundsätzlich geeignet um verschiedene Fragestellungen der Paratuberkuloseforschung zu adressieren. Damit liefert diese Arbeit sowohl eine adäquate Grundlage als auch interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. So könnte eine titrierte Infektionsdosis helfen die natürliche Infektion im zeitlichen Verlauf besser abzubilden. Für die Nachweismethoden der zellulären Immunantwort bietet der Einsatz von höheren Konzentrationen bzw. von Kombinationen verschiedener rekombinanter MAP-Proteine noch Chancen zur Optimierung. Weiterhin sollten die hier aufgrund geringer Stichprobenumfänge nicht statistisch auswertbaren Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen inokulierter Tiere mit größeren Tierzahlen überprüft werden. Wenn sich so das Vorkommen unterschiedlicher, den Verlauf der Infektion bestimmender immunologischer Reaktionen auf MAP bestätigen ließe, wäre die Erforschung der Ursachen bzw. Auslöser dieser ein weiterer wichtiger Schritt zum Verständnis und zur Kontrolle der Erkrankung. Letztlich sollte allerdings in Feldstudien die Übertragbarkeit der im Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse nach einer natürlichen Infektion überprüft werden.

8 Summary

Paratuberculosis is a chronic enteritis affecting ruminants worldwide caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Characteristic for this disease is a very long latent period during which neither direct nor indirect diagnostic methods provide reliable results. Thus, efficient control of paratuberculosis is still hampered by a lack of adequate diagnostic methods applicable during the early phase of infection. Furthermore, there are no appropriate vaccines available. One objective of this study was to continue the development of an infection model previously defined in detail. Five consecutive working hypotheses were built upon each other and pursued to deepen the understanding of the disease's (immuno)pathogenesis and to investigate the diagnostic potential of methods quantifying the cellular immune response.

Twenty-eight Thuringian goats were inoculated at an average age of 16 days with MAP (strain JII-1961). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated in a four-week cycle over a period of 51 weeks and restimulated with Johnin purified protein derivative (JPPD), avian purified protein derivative or recombinant MAP proteins MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c or BLAg. The production of cytokines induced *in vitro* was quantified at protein level via enzyme linked immunosorbent assays for interferon gamma (IFN- γ) and interleukin (IL)-10 and at gene expression level by means of polymerase chain reactions for IL-10, IL-12p40, IL-18, transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The expression of cluster of differentiation (CD) molecule CD25 on CD4⁺ und CD8⁺ memory cells was determined by flow cytometric analyses. Additional data regarding the goats' excretion of MAP in faeces, their serological status as well as their mycobacterial burden determined at necropsy on four predefined points in time three, six, nine and twelve months *post inoculationem* (*p.i.*) was used to assess the infection status. Sixteen non-inoculated animals served as controls.

The first hypothesis claimed that the applied scheme of inoculation reliably ensures infection with MAP in the animal model and was verified in this study by a hundred percent success of inoculation. Despite differences to natural infection with respect to the temporal course in particular, this model offers a good basis for further research.

The second hypothesis stated that the applied *ex vivo* methods were suitable to depict the cellular immune response after MAP-infection as well as to differentiate between

inoculated animals and controls. In fact, following extensive validation of methods and exclusion of methodological errors differences between trial groups were determined.

The third hypothesis implied that inoculated and control animals could be differentiated earlier by their cellular immune response to MAP than by their humoral immune response or by detection of MAP excretion. Differences between animal groups became evident as early as three weeks *p.i.* and were most prominent regarding the secretion of IFN- γ by PBMC stimulated with JPPD. Inoculated and control animals could be differentiated based on this parameter from the third week *p.i.* onwards and thereby eight weeks earlier than by detection of MAP-specific antibodies. Direct detection of MAP in faecal samples was also possible beginning from the third week *p.i.* but the IFN- γ test showed a higher rate of true positive results from week eleven *p.i.* onwards. Differences between trial groups were also found regarding the gene expression of IL-12p40 and TNF- α or the expression of CD25 on CD4⁺ and CD8⁺ memory cells of JPPD-stimulated PBMC.

The forth hypothesis stating that the specificity and sensitivity of the IFN- γ test could be enhanced by use of MAP-specific antigens or anti-IL-10 antibodies was partially confirmed. Of the MAP-specific recombinant proteins tested, MAP 3651c induced the strongest IFN- γ response, yet fell short compared to the response to JPPD. It can be assumed that there still is some achievable potential for optimisation. Nevertheless, presence of anti-IL-10 antibodies during re-stimulation enhanced the IFN- γ response and can thus increase the sensitivity of the IFN- γ test.

Furthermore, this study unveiled differences within the group of inoculated animals. This supports the fifth hypothesis suggesting that immunopathological processes in the early phase of infection determine the course of disease in goats. For instance, animals controlling the infection with MAP comparatively well and excreting low numbers of MAP with the faeces showed early immunological characteristics which could be causative for an efficient control of infection. PBMC of these animals had at an early time point *p.i.* a higher production of IFN- γ , IL-10 and IL-12p40 as well as a higher expression of CD25 on CD4⁺ and CD8⁺ memory cells compared to the other inoculated animals.

The applied infection model as well as the utilised methods quantifying the cellular immune response to MAP demonstrated some pending optimisation potential but were shown to be generally suited to address various research questions raised in the context of paratuberculosis. Therefore, this study provides an adequate basis as well as

interesting approaches for further investigations. For example, an optimized, i.e. lower infectious dose may help reflecting the natural chronology of events during infection more accurately. When it comes to optimising the methods for quantifying the cellular immune response, application of higher concentrations or combinations of different recombinant MAP-proteins possess considerable potential. Furthermore, future studies should revise the differences within groups of inoculated animals which could not be statistically evaluated in this study due to low sample sizes. If following investigations validate the existence of different immunological reactions to MAP determining the course of infection, the research into the causes or triggers will be a further important step towards the understanding and control of the disease. Finally, the transferability of results obtained within this infection model to infection with MAP under natural conditions has to be verified in field studies.

9 Literaturverzeichnis

Amtliche Methodensammlung Stand Januar 2014, Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald - Insel Riems.

Adams, D. H., M. Hathaway, J. Shaw, D. Burnett, E. Elias and A. J. Strain (1991). "Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro." J Immunol **147**(2): 609-612.

Ahn, H. J., S. Maruo, M. Tomura, J. Mu, T. Hamaoka, K. Nakanishi, S. Clark, M. Kurimoto, H. Okamura and H. Fujiwara (1997). "A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma." J Immunol **159**(5): 2125-2131.

Akira, S. (2000). "The role of IL-18 in innate immunity." Curr Opin Immunol **12**(1): 59-63.

Alinovi, C. A., C. C. Wu and T. L. Lin (2009). "In utero Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection of a pygmy goat." Vet Rec **164**(9): 276-277.

Alzuherri, H. M., C. J. Woodall and C. J. Clarke (1996). "Increased intestinal TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 expression in ovine paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **49**(4): 331-345.

Angelidou, E., P. Kostoulas and L. Leontides (2014). "Bayesian validation of a serum and milk ELISA for antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Greek dairy goats across lactation." J Dairy Sci **97**(2): 819-828.

Angus, K. W. and N. J. Gilmour (1971). "Effect of the rimino phenazine B663 (G30320) on Mycobacterium johnei infection and reinfection in sheep. II. Pathology." J Comp Pathol **81**(2): 227-234.

Antognoli, M. C., H. L. Hirst, F. B. Garry and M. D. Salman (2007). "Immune response to and faecal shedding of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams." Zoonoses Public Health **54**(3-4): 152-159.

Antognoli, M. C., M. D. Remmenga, S. D. Bengtson, H. J. Clark, K. A. Orloski, L. L. Gustafson and A. E. Scott (2011). "Analysis of the diagnostic accuracy of the gamma interferon assay for detection of bovine tuberculosis in U.S. herds." Prev Vet Med **101**(1-2): 35-41.

Arlettaz, L., C. Barbey, F. Dumont-Girard, C. Helg, B. Chapuis, E. Roux and E. Roosnek (1999). "CD45 isoform phenotypes of human T cells: CD4(+)CD45RA(-)RO(+) memory T cells re-acquire CD45RA without losing CD45RO." Eur J Immunol **29**(12): 3987-3994.

Arsenault, R. J., P. Maattanen, J. Daigle, A. Potter, P. Griebel and S. Napper (2014). "From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." Vet Res **45**: 54.

Assoian, R. K., B. E. Fleurdelys, H. C. Stevenson, P. J. Miller, D. K. Madtes, E. W. Raines, R. Ross and M. B. Sporn (1987). "Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(17): 6020-6024.

Assoian, R. K., A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller and M. B. Sporn (1983). "Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization." J Biol Chem **258**(11): 7155-7160.

Bach, H. (2015). "What Role Does Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Play in Crohn's Disease?" Curr Infect Dis Rep **17**(2): 463.

Bannantine, J. P., Q. Zhang, L. L. Li and V. Kapur (2003). "Genomic homogeneity between Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis belies their divergent growth rates." BMC Microbiol **3**: 10.

- Barbulescu, K.**, C. Becker, J. F. Schlaak, E. Schmitt, K. H. Meyer zum Buschenfelde and M. F. Neurath (1998). "IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes." J Immunol **160**(8): 3642-3647.
- Bassey, E. O.** and M. T. Collins (1997). "Study of T-lymphocyte subsets of healthy and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-infected cattle." Infect Immun **65**(11): 4869-4872.
- Bean, A. G.**, D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick and W. J. Britton (1999). "Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol Mycobacterium tuberculosis infection, which is not compensated for by lymphotoxin." J Immunol **162**(6): 3504-3511.
- Beard, P. M.**, M. J. Daniels, D. Henderson, A. Pirie, K. Rudge, D. Buxton, S. Rhind, A. Greig, M. R. Hutchings, I. McKendrick, K. Stevenson and J. M. Sharp (2001). "Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland." Journal of Clinical Microbiology **39**(4): 1517-1521.
- Begara-McGorum, I.**, L. A. Wildblood, C. J. Clarke, K. M. Connor, K. Stevenson, C. J. McInnes, J. M. Sharp and D. G. Jones (1998). "Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **63**(3): 265-287.
- Begg, D. J.**, K. de Silva, N. Carter, K. M. Plain, A. Purdie and R. J. Whittington (2010). "Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infections?" Immunobiology **216**(7): 840-846.
- Begg, D. J.**, R. O'Brien, C. G. Mackintosh and J. F. Griffin (2005). "Experimental infection model for Johne's disease in sheep." Infect Immun **73**(9): 5603-5611.
- Bembridge, G. P.**, N. D. MacHugh, D. McKeever, E. Awino, P. Sopp, R. A. Collins, K. I. Gelder and C. J. Howard (1995). "CD45RO expression on bovine T cells: relation to biological function." Immunology **86**(4): 537-544.
- Bendixen, P. H.** (1978). "Immunological reactions caused by infection with Mycobacterium paratuberculosis. A review." Nord Vet Med **30**(4-5): 163-168.
- Benini, J.**, E. M. Ehlers and S. Ehlers (1999). "Different types of pulmonary granuloma necrosis in immunocompetent vs. TNFRp55-gene-deficient mice aerogenically infected with highly virulent Mycobacterium avium." J Pathol **189**(1): 127-137.
- Berard, M.** and D. F. Tough (2002). "Qualitative differences between naive and memory T cells." Immunology **106**(2): 127-138.
- Bermudez, L. E.** and J. Champs (1993). "Infection with Mycobacterium avium induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice." Infect Immun **61**(7): 3093-3097.
- Bhattarai, B.**, G. T. Fosgate, J. B. Osterstock, C. P. Fossler, S. C. Park and A. J. Roussel (2013). "Comparison of calf weaning weight and associated economic variables between beef cows with and without serum antibodies against or isolation from feces of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis." J Am Vet Med Assoc **243**(11): 1609-1615.
- Biet, F.**, I. A. Sevilla, T. Cochard, L. H. Lefrancois, J. M. Garrido, I. Heron, R. A. Juste, J. McLuckie, V. C. Thibault, P. Supply, D. M. Collins, M. A. Behr and K. Stevenson (2012). "Inter- and intra-subtype genotypic differences that differentiate Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis strains." BMC Microbiol **12**: 264.
- Billman-Jacobe, H.**, M. Carrigan, F. Cockram, L. A. Corner, I. J. Gill, J. F. Hill, T. Jessep, A. R. Milner and P. R. Wood (1992). "A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle." Aust Vet J **69**(2): 25-28.
- Bitegye, C.**, S. Hannier, S. Guerif, S. Valitutti and S. Demotz (2002). "Tuning of T cell clone size and activation threshold by control of CD25 expression through mitogen-activated protein kinase pathways." Int Arch Allergy Immunol **127**(4): 322-332.

- Bliss, S. K.,** Y. Zhang and E. Y. Denkers (1999). "Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12." J Immunol **163**(4): 2081-2088.
- Boehm, U.,** T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.
- Boonacker, E.** and C. J. Van Noorden (2003). "The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV." Eur J Cell Biol **82**(2): 53-73.
- Borrmann, E.,** P. Mobius, R. Diller and H. Köhler (2011). "Divergent cytokine responses of macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains of Types II and III in a standardized in vitro model." Vet Microbiol **152**(1-2): 101-111.
- Borsuk, S.,** J. Newcombe, T. A. Mendum, O. A. Dellagostin and J. McFadden (2009). "Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS." Tuberculosis (Edinb) **89**(6): 423-430.
- Bosward, K. L.,** N. K. Dhand, D. J. Begg, P. C. Thomson, D. L. Emery and R. J. Whittington (2010). "Optimization of a whole blood gamma interferon assay for the detection of sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." J Vet Diagn Invest **22**(2): 210-217.
- Bower, K. L.,** D. J. Begg and R. J. Whittington (2011). "Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) from blood and extra-intestinal tissues in experimentally infected sheep." Vet Microbiol **147**(1-2): 127-132.
- Brandes, M. E.,** U. E. Mai, K. Ohura and S. M. Wahl (1991). "Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta." J Immunol **147**(5): 1600-1606.
- Brotherston, J.,** F., N. J. L. Gilmour and J. M. Samuel (1961). "Quantitative Studies of *Mycobacterium Johnei* in Tissues of Sheep .1. Routes of Infection and Assay of Viable *M. Johnei*." Journal of Comparative Pathology and Therapeutics **71**(3): 286-&.
- Bruno, L.,** J. Kirberg and H. von Boehmer (1995). "On the cellular basis of immunological T cell memory." Immunity **2**(1): 37-43.
- Bühl, A.** and P. Zöfel (2008). "SPSS 16: Einführung in die moderne Datenanalyse", Pearson Deutschland GmbH.
- Burrells, C.,** C. J. Clarke, A. Colston, J. M. Kay, J. Porter, D. Little and J. M. Sharp (1998). "A study of immunological responses of sheep clinically-affected with paratuberculosis (Johne's disease). The relationship of blood, mesenteric lymph node and intestinal lymphocyte responses to gross and microscopic pathology." Vet Immunol Immunopathol **66**(3-4): 343-358.
- Burrells, C.,** C. J. Clarke, A. Colston, J. M. Kay, J. Porter, D. Little and J. M. Sharp (1999). "Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease)." Vet Immunol Immunopathol **68**(2-4): 139-148.
- Burrells, C.,** N. F. Inglis, R. C. Davies and J. M. Sharp (1995). "Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies silvaticum and paratuberculosis using two defined mycobacterial antigens." Vet Immunol Immunopathol **45**(3-4): 311-320.
- Bustin, S. A.** (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Buza, J. J.,** H. Hikono, Y. Mori, R. Nagata, S. Hirayama, g. Aodon, A. M. Bari, Y. Shu, N. M. Tsuji and E. Momotani (2004). "Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected cattle with paratuberculosis." Infect Immun **72**(4): 2425-2428.

- Carnaud, C.**, D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka and A. Bendelac (1999). "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells." J Immunol **163**(9): 4647-4650.
- Casey, J. L.**, A. M. Sanalla, D. Tamvakis, C. Thalmann, E. L. Carroll, K. Parisi, A. M. Coley, D. J. Stewart, J. A. Vaughan, W. P. Michalski, R. Luke and M. Foley (2011). "Peptides specific for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection: diagnostic potential." Protein Eng Des Sel **24**(8): 589-596.
- Cassatella, M. A.**, L. Meda, S. Gasperini, A. D'Andrea, X. Ma and G. Trinchieri (1995). "Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes." Eur J Immunol **25**(1): 1-5.
- Cerottini, J. C.** and H. R. MacDonald (1989). "The cellular basis of T-cell memory." Annu Rev Immunol **7**: 77-89.
- Chan, J.**, X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan and B. R. Bloom (1991). "Lipoarabino-mannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages." Infect Immun **59**(5): 1755-1761.
- Chandler, R. L.** (1961). "Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. IV. Comparative susceptibility to infection of C.57, C.B.A and Swiss white mice." J Comp Pathol **71**: 233-242.
- Chiba, M.**, T. Fukushima, Y. Horie, M. Iizuka and O. Masamune (1998). "No *Mycobacterium paratuberculosis* detected in intestinal tissue, including Peyer's patches and lymph follicles, of Crohn's disease." J Gastroenterol **33**(4): 482-487.
- Chiodini, R. J.** (1989). "Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities." Clin Microbiol Rev **2**(1): 90-117.
- Chiodini, R. J.** and C. D. Buergelt (1993). "Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*." J Comp Pathol **109**(4): 309-319.
- Chiodini, R. J.** and W. C. Davis (1992). "The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity." Microb Pathog **13**(6): 447-463.
- Chiodini, R. J.**, H. J. Van Kruiningen and R. S. Merkal (1984). "Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects." Cornell Vet **74**(3): 218-262.
- Christ, M.**, N. L. McCartney-Francis, A. B. Kulkarni, J. M. Ward, D. E. Mizel, C. L. Mackall, R. E. Gress, K. L. Hines, H. Tian, S. Karlsson and *et al.* (1994). "Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice." J Immunol **153**(5): 1936-1946.
- Christopher-Hennings, J.**, M. A. Dammen, S. R. Weeks, W. B. Epperson, S. N. Singh, G. L. Steinlicht, Y. Fang, J. L. Skaare, J. L. Larsen, J. B. Payeur and E. A. Nelson (2003). "Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-time PCR, a new commercial PCR assay, and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine feces." J Vet Diagn Invest **15**(2): 87-93.
- Clark, D. L., Jr.**, J. J. Koziczowski, R. P. Radcliff, R. A. Carlson and J. L. Ellingson (2008). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction." J Dairy Sci **91**(7): 2620-2627.
- Clarke, C. J.** (1997). "The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species." J Comp Pathol **116**(3): 217-261.
- Clarke, C. J.** and D. Little (1996). "The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues." J Comp Pathol **114**(4): 419-437.
- Cohen, S. B.**, P. D. Katsikis, M. Feldmann and M. Londei (1994). "IL-10 enhances expression of the IL-2 receptor alpha chain on T cells." Immunology **83**(3): 329-332.

- Collins, D. M.**, D. M. Gabric and G. W. De Lisle (1989). "Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*." FEMS Microbiol Lett **51**(1): 175-178.
- Collins, D. M.**, D. M. Gabric and G. W. de Lisle (1990). "Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization." J Clin Microbiol **28**(7): 1591-1596.
- Collins, D. M.**, D. M. Stephens and G. W. de Lisle (1993). "Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces." Vet Microbiol **36**(3-4): 289-299.
- Collins, F. M.** and T. E. Miller (1969). "Growth of a drug-resistant strain of *Mycobacterium bovis* (BCG) in normal and immunized mice." J Infect Dis **120**(5): 517-533.
- Collins, M. T.** (2011). "Diagnosis of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 581-591, vi.
- Collins, M. T.**, A. Angulo, C. D. Buergelt, S. G. Hennager, S. K. Hietala, R. H. Jacobson, D. L. Whipple and R. H. Whitlock (1993). "Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories." J Vet Diagn Invest **5**(1): 52-55.
- Collins, M. T.**, K. B. Kenefick, D. C. Sockett, R. S. Lambrecht, J. McDonald and J. B. Jorgensen (1990). "Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine fecal specimens." J Clin Microbiol **28**(11): 2514-2519.
- Cooper, A. M.**, L. B. Adams, D. K. Dalton, R. Appelberg and S. Ehlers (2002). "IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands." Trends Microbiol **10**(5): 221-226.
- Cooper, A. M.**, D. K. Dalton, T. A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell and I. M. Orme (1993). "Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice." J Exp Med **178**(6): 2243-2247.
- Cooper, A. M.**, A. Kipnis, J. Turner, J. Magram, J. Ferrante and I. M. Orme (2002). "Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present." J Immunol **168**(3): 1322-1327.
- Cope, A.**, G. Le Friec, J. Cardone and C. Kemper (2011). "The Th1 life cycle: molecular control of IFN-gamma to IL-10 switching." Trends Immunol **32**(6): 278-286.
- Cordero, O. J.**, F. J. Salgado, J. E. Vinuela and M. Nogueira (1997). "Interleukin-12 enhances CD26 expression and dipeptidyl peptidase IV function on human activated lymphocytes." Immunobiology **197**(5): 522-533.
- Corpa, J. M.**, J. Garrido, J. F. Garcia Marin and V. Perez (2000). "Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats." J Comp Pathol **122**(4): 255-265.
- Couper, K. N.**, D. G. Blount and E. M. Riley (2008). "IL-10: the master regulator of immunity to infection." J Immunol **180**(9): 5771-5777.
- Coussens, P. M.** (2001). "*Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system." Anim Health Res Rev **2**(2): 141-161.
- Coussens, P. M.** (2004). "Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in cattle." Infect Immun **72**(6): 3089-3096.
- Coussens, P. M.**, N. Verman, M. A. Coussens, M. D. Elftman and A. M. McNulty (2004). "Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern." Infect Immun **72**(3): 1409-1422.
- Crossley, B. M.**, F. J. Zagmutt-Vergara, T. L. Fyock, R. H. Whitlock and I. A. Gardner (2005). "Fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by dairy cows." Vet Microbiol **107**(3-4): 257-263.

- D'Andrea, A.**, M. Aste-Amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin and G. Trinchieri (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells." J Exp Med **178**(3): 1041-1048.
- D'Andrea, A.**, M. Rengaraju, N. M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S. H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg and *et al.* (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." J Exp Med **176**(5): 1387-1398.
- Dalton, J. P.** and C. Hill (2013). "Survival of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in synthetic human gastric juice and acidified porcine bile." Appl Environ Microbiol **79**(4): 1418-1420.
- Damato, J. J.** and M. T. Collins (1990). "Growth of Mycobacterium paratuberculosis in radiometric, Middlebrook and egg-based media." Vet Microbiol **22**(1): 31-42.
- Daniels, M. J.**, D. Henderson, A. Greig, K. Stevenson, J. M. Sharp and M. R. Hutchings (2003). "The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants." Epidemiol Infect **130**(3): 553-559.
- Das, K. M.** and D. N. Seril (2012). "Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis in Crohn's disease: the puzzle continues." J Clin Gastroenterol **46**(8): 627-628.
- de Almeida, D. E.**, C. J. Colvin and P. M. Coussens (2008). "Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **125**(3-4): 234-245.
- de Juan, L.**, J. Alvarez, B. Romero, J. Bezoz, E. Castellanos, A. Aranaz, A. Mateos and L. Dominguez (2006). "Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains isolated from cattle and goats." Appl Environ Microbiol **72**(9): 5927-5932.
- de Lisle, G. W.** and J. R. Duncan (1981). "Bovine paratuberculosis III. An evaluation of a whole blood lymphocyte transformation test." Can J Comp Med **45**(3): 304-309.
- de Lisle, G. W.**, P. Seguin, B. S. Samagh, A. H. Corner and J. R. Duncan (1980). "Bovine paratuberculosis I. A herd study using complement fixation and intradermal tests." Can J Comp Med **44**(2): 177-182.
- de Silva, K.**, D. Begg, N. Carter, D. Taylor, L. Di Fiore and R. Whittington (2009). "The early lymphocyte proliferation response in sheep exposed to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis compared to infection status." Immunobiology **215**(1): 12-25.
- de Silva, K.**, D. Begg and R. Whittington (2011). "The interleukin 10 response in ovine Johne's disease." Vet Immunol Immunopathol **139**(1): 10-16.
- de Silva, K.**, D. J. Begg, K. M. Plain, A. C. Purdie, S. Kawaji, N. K. Dhand and R. J. Whittington (2013). "Can early host responses to mycobacterial infection predict eventual disease outcomes?" Prev Vet Med **112**(3-4): 203-212.
- de Waal Malefyt, R.**, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.
- Denis, M.** and E. Ghadirian (1993). "IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic Mycobacterium avium infections." J Immunol **151**(10): 5425-5430.
- Dennis, M. M.**, L. A. Reddacliff and R. J. Whittington (2011). "Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis." Vet Pathol **48**(3): 565-575.
- Dinarello, C. A.** (1999). "IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family." J Allergy Clin Immunol **103**(1 Pt 1): 11-24.
- Dinarello, C. A.** (1999). "Interleukin-18." Methods **19**(1): 121-132.

- Donat, K.**, K. Eulenberger and P. Kampfer (2005). "Seroprevalence of paratuberculosis in cattle in Saxony." Tieraerztliche Umschau **60**(9): 497-501.
- Donovan, D. C.**, A. J. Reber, J. D. Gabbard, M. Aceves-Avila, K. L. Galland, K. A. Holbert, L. O. Ely and D. J. Hurley (2007). "Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves." Am J Vet Res **68**(7): 778-782.
- Douarre, P. E.**, W. Cashman, J. Buckley, A. Coffey and J. M. O'Mahony (2010). "Isolation and detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) from cattle in Ireland using both traditional culture and molecular based methods." Gut Pathog **2**(1): 11.
- Drapier, J. C.**, J. Wietzerbin and J. B. Hibbs, Jr. (1988). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages." Eur J Immunol **18**(10): 1587-1592.
- Eamens, G. J.**, D. M. Walker, N. S. Porter and S. A. Fell (2007). "Pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in goats." Aust Vet J **85**(6): 243-251.
- Eamens, G. J.**, R. J. Whittington, I. B. Marsh, M. J. Turner, V. Saunders, P. D. Kemsley and D. Rayward (2000). "Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease." Vet Microbiol **77**(3-4): 357-367.
- Egen, J. G.**, A. G. Rothfuchs, C. G. Feng, N. Winter, A. Sher and R. N. Germain (2008). "Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas." Immunity **28**(2): 271-284.
- EGUCHI, K.**, Y. Ueki, C. Shimomura, T. Otsubo, H. Nakao, K. Migita, A. Kawakami, M. Matsunaga, H. Tezuka, N. Ishikawa and *et al.* (1989). "Increment in the Ta1+ cells in the peripheral blood and thyroid tissue of patients with Graves' disease." J Immunol **142**(12): 4233-4240.
- Ehlers, S.**, J. Benini, S. Kutsch, R. Endres, E. T. Rietschel and K. Pfeffer (1999). "Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*." Infect Immun **67**(7): 3571-3579.
- Elguezal, N.**, F. Bastida, I. A. Sevilla, N. Gonzalez, E. Molina, J. M. Garrido and R. A. Juste (2011). "Estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis growth parameters: strain characterization and comparison of methods." Appl Environ Microbiol **77**(24): 8615-8624.
- Ellner, J. J.** and T. M. Daniel (1979). "Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan." Clin Exp Immunol **35**(2): 250-257.
- Elze, J.**, E. Liebler-Tenorio, M. Ziller and H. Kohler (2013). "Comparison of prevalence estimation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection by sampling slaughtered cattle with macroscopic lesions vs. systematic sampling." Epidemiol Infect **141**(7): 1536-1544.
- Englund, S.**, A. Ballagi-Pordany, G. Bolske and K. E. Johansson (1999). "Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." Diagn Microbiol Infect Dis **33**(3): 163-171.
- Espevik, T.**, I. S. Figari, M. R. Shalaby, G. A. Lackides, G. D. Lewis, H. M. Shepard and M. A. Palladino, Jr. (1987). "Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta." J Exp Med **166**(2): 571-576.
- Fang, Y.**, W. H. Wu, J. L. Pepper, J. L. Larsen, S. A. Marras, E. A. Nelson, W. B. Epperson and J. Christopher-Hennings (2002). "Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples." J Clin Microbiol **40**(1): 287-291.
- Fecteau, M. E.** and R. H. Whitlock (2011). "Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 547-557, v.

- Feller, M.**, K. Huwiler, R. Stephan, E. Altpeter, A. Shang, H. Furrer, G. E. Pfyffer, T. Jemmi, A. Baumgartner and M. Egger (2007). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis." Lancet Infect Dis **7**(9): 607-613.
- Fernandez-Botran, R.**, V. M. Sanders, T. R. Mosmann and E. S. Vitetta (1988). "Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells." J Exp Med **168**(2): 543-558.
- Ferreira, R.**, L. S. Fonseca and W. Lilenbaum (2002). "Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil." Lett Appl Microbiol **35**(3): 173-175.
- Fiorentino, D. F.**, A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard and A. O'Garra (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol **147**(11): 3815-3822.
- Fleischer, B.** (1994). "CD26: a surface protease involved in T-cell activation." Immunol Today **15**(4): 180-184.
- Florou, M.**, L. Leontides, P. Kostoulas, C. Billinis and M. Sofia (2009). "Strain-specific sensitivity estimates of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis culture in Greek sheep and goats." Zoonoses Public Health **56**(1): 49-52.
- Florou, M.**, L. Leontides, P. Kostoulas, C. Billinis, M. Sofia, I. Kyriazakis and F. Lykotrafitis (2008). "Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats." Epidemiol Infect **136**(5): 644-652.
- Flynn, J. L.** and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Flynn, J. L.**, M. M. Goldstein, K. J. Triebold, J. Sypek, S. Wolf and B. R. Bloom (1995). "IL-12 increases resistance of BALB/c mice to Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **155**(5): 2515-2524.
- Frossling, J.**, H. Wahlstrom, E. C. Agren, A. Cameron, A. Lindberg and S. Sternberg Lewerin (2013). "Surveillance system sensitivities and probability of freedom from Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in Swedish cattle." Prev Vet Med **108**(1): 47-62.
- Garcia, S.**, J. DiSanto and B. Stockinger (1999). "Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation." Immunity **11**(2): 163-171.
- Gilardoni, L. R.**, F. A. Paolicchi and S. L. Mundo (2012). "Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests." Rev Argent Microbiol **44**(3): 201-215.
- Gillan, S.**, R. O'Brien, A. D. Hughes and J. F. Griffin (2010). "Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." Clin Vaccine Immunol **17**(1): 108-117.
- Gilmour, N. J. L.**, K. W. Angus and B. Mitchell (1977). "Intestinal infection and host response to oral administration of *Mycobacterium johnei* in sheep." Veterinary Microbiology **2**(3): 223-235.
- Gilot, P.** and C. Cocito (1993). "Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle." FEMS Microbiol Lett **110**(3): 307-311.
- Gilot, P.**, M. De Kesel, M. Coene and C. Cocito (1992). "Induction of cellular immune reactions by A36, an antigen complex of Mycobacterium paratuberculosis: comparison of A36 and johnin components." Scand J Immunol **36**(6): 811-821.
- Glanemann, B.**, L. E. Hoelzle, K. Bogli-Stuber, T. Jemmi and M. M. Wittenbrink (2004). "Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Swiss dairy cattle by culture and serology." Schweiz Arch Tierheilkd **146**(9): 409-415.

- Gonda, M. G.**, Y. M. Chang, G. E. Shook, M. T. Collins and B. W. Kirkpatrick (2007). "Effect of Mycobacterium paratuberculosis infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins." Prev Vet Med **80**(2-3): 103-119.
- Goni, R.**, P. Garcia and S. Foissac (2009). "The qPCR data statistical analysis." Integromics White Paper: 1-9.
- Gonzalez, J.**, M. V. Geijo, C. Garcia-Pariente, A. Verna, J. M. Corpa, L. E. Reyes, M. C. Ferreras, R. A. Juste, J. F. Garcia Marin and V. Perez (2005). "Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle." J Comp Pathol **133**(2-3): 184-196.
- Gormley, E.**, M. B. Doyle, K. McGill, E. Costello, M. Good and J. D. Collins (2004). "The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of Mycobacterium bovis infection in cattle." Vet Immunol Immunopathol **102**(4): 413-420.
- Gorrell, M. D.**, V. Gysbers and G. W. McCaughan (2001). "CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes." Scand J Immunol **54**(3): 249-264.
- Grant, I. R.**, M. T. Rowe, L. Dundee and E. Hitchings (2001). "Mycobacterium avium ssp paratuberculosis: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products." International Journal of Dairy Technology **54**(1): 2-13.
- Green, E. P.**, M. L. Tizard, M. T. Moss, J. Thompson, D. J. Winterbourne, J. J. McFadden and J. Hermon-Taylor (1989). "Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis." Nucleic Acids Res **17**(22): 9063-9073.
- Grotendorst, G. R.**, G. Smale and D. Pencev (1989). "Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils." J Cell Physiol **140**(2): 396-402.
- Gumber, S.**, G. Eamens and R. J. Whittington (2006). "Evaluation of a Pourquier ELISA kit in relation to agar gel immunodiffusion (AGID) test for assessment of the humoral immune response in sheep and goats with and without Mycobacterium paratuberculosis infection." Vet Microbiol **115**(1-3): 91-101.
- Gurung, R. B.**, D. J. Begg, A. C. Purdie, K. de Silva, J. P. Bannantine and R. J. Whittington (2014). "Lymphoproliferative and gamma interferon responses to stress-regulated Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis recombinant proteins." Clin Vaccine Immunol **21**(6): 831-837.
- Gwozdz, J. M.**, M. P. Reichel, A. Murray, W. Manktelow, D. M. West and K. G. Thompson (1997). "Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction." Vet Microbiol **57**(2-3): 233-244.
- Gwozdz, J. M.**, K. G. Thompson, A. Murray, M. P. Reichel, B. W. Manktelow and D. M. West (2000). "Comparison of three serological tests and an interferon-gamma assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep." Aust Vet J **78**(11): 779-783.
- Hacker, U.**, K. Huttner and M. Konow (2004). "[Investigation of serological prevalence and risk factors of paratuberculosis in dairy farms in the state of Mecklenburg-Westpommern, Germany]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **117**(3-4): 140-144.
- Harris, N. B.** and R. G. Barletta (2001). "Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine." Clin Microbiol Rev **14**(3): 489-512.
- Hartnell, G. F.** and L. D. Satter (1979). "Determination of rumen fill, retention time and ruminal turnover rates of ingesta at different stages of lactation in dairy cows." J Anim Sci **48**(2): 381-392.
- Hasonova, L.** and I. Pavlik (2006). "Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review." Veterinarni Medicina **51**(5): 193-211.

- Heufler, C.**, F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R. M. Steinman, N. Romani and G. Schuler (1996). "Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells." Eur J Immunol **26**(3): 659-668.
- Hines, M. E.**, J. M. Kreeger and A. J. Herron (1995). "Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis." Lab Anim Sci **45**(4): 334-351.
- Hines, M. E.**, J. R. Stabel, R. W. Sweeney, F. Griffin, A. M. Talaat, D. Bakker, G. Benedictus, W. C. Davis, G. W. de Lisle, I. A. Gardner, R. A. Juste, V. Kapur, A. Koets, J. McNair, G. Pruitt and R. H. Whitlock (2007). "Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines." Vet Microbiol **122**(3-4): 197-222.
- Hirsch, C. S.**, T. Yoneda, L. Averill, J. J. Ellner and Z. Toossi (1994). "Enhancement of intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis in human monocytes by transforming growth factor-beta 1." J Infect Dis **170**(5): 1229-1237.
- Hope, J. C.**, P. Sopp and C. J. Howard (2002). "NK-like CD8(+) cells in immunologically naive neonatal calves that respond to dendritic cells infected with Mycobacterium bovis BCG." J Leukoc Biol **71**(2): 184-194.
- Hoshino, T.**, H. Yagita, J. R. Ortaldo, R. H. Wiltout and H. A. Young (2000). "In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4+ T cells." Eur J Immunol **30**(7): 1998-2006.
- Hosono, O.**, K. Ohnuma, N. H. Dang and C. Morimoto (2003). "CD26: a key molecule in immune regulation and autoimmune diseases." Mod Rheumatol **13**(3): 199-204.
- Huda, A.**, G. Jungersen and P. Lind (2004). "Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." Vet Microbiol **104**(1-2): 43-53.
- Huda, A.**, P. Lind, A. B. Christoffersen and G. Jungersen (2003). "Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN-gamma) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle." Vet Immunol Immunopathol **94**(3-4): 95-103.
- Hughes, T. K.**, T. A. Kaspar and D. H. Coppenhaver (1988). "Synergy of antiviral actions of TNF and IFN-gamma: evidence for a major role of TNF-induced IFN-beta." Antiviral Res **10**(1-3): 1-9.
- Hughes, V.**, J. P. Bannantine, S. Denham, S. Smith, A. Garcia-Sanchez, J. Sales, M. L. Paustian, K. McLean and K. Stevenson (2008). "Immunogenicity of proteome-determined Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis-specific proteins in sheep with paratuberculosis." Clin Vaccine Immunol **15**(12): 1824-1833.
- Hughes, V.**, S. Denham, J. P. Bannantine, F. Chianini, K. Kerr, L. May, J. McLuckie, M. Nath and K. Stevenson (2013). "Interferon gamma responses to proteome-determined specific recombinant proteins: potential as diagnostic markers for ovine Johne's disease." Vet Immunol Immunopathol **155**(3): 197-204.
- Ikonomopoulos, J.**, C. Balaskas, B. Kantzoura, E. Fragiadaki, I. Pavlik, M. Bartos, J. C. Lukas and M. Gazouli (2007). "Comparative evaluation of positive tests to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture." Vet J **174**(2): 337-343.
- Ikushima, H.**, Y. Munakata, S. Iwata, K. Ohnuma, S. Kobayashi, N. H. Dang and C. Morimoto (2002). "Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor." Cell Immunol **215**(1): 106-110.
- Imirzalioglu, C.**, H. Dahmen, T. Hain, A. Billion, C. Kuenne, T. Chakraborty and E. Domann (2011). "Highly specific and quick detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis

in feces and gut tissue of cattle and humans by multiple real-time PCR assays." J Clin Microbiol **49**(5): 1843-1852.

Jacobs, B. K., E. Goetghebeur and L. Clement (2014). "Impact of variance components on reliability of absolute quantification using digital PCR." BMC Bioinformatics **15**: 283.

Johne, H. A. and L. Frothingham (1895). "Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind." Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin und vergleichende Pathologie. **21**: 438-455.

Jorgensen, J. B. (1982). "An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces." Acta Vet Scand **23**(3): 325-335.

Joss, A., M. Akdis, A. Faith, K. Blaser and C. A. Akdis (2000). "IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway." Eur J Immunol **30**(6): 1683-1690.

Jungersen, G., A. Huda, J. J. Hansen and P. Lind (2002). "Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 453-460.

Jungersen, G., H. Mikkelsen and S. N. Grell (2012). "Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **148**(1-2): 48-54.

Juste, R. A. (2012). "Slow infection control by vaccination: paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **148**(1-2): 190-196.

Juste, R. A., J. F. Garcia Marin, B. Peris, C. S. Saez de Ocariz and J. J. Badiola (1994). "Experimental infection of vaccinated and non-vaccinated lambs with *Mycobacterium paratuberculosis*." J Comp Pathol **110**(2): 185-194.

Juste, R. A., J. C. Marco, C. Saez de Ocariz and J. J. Aduriz (1991). "Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*." Vet Microbiol **28**(4): 385-390.

Kalis, C. H., M. T. Collins, J. W. Hesselink and H. W. Barkema (2003). "Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay." Vet Microbiol **97**(1-2): 73-86.

Kalis, C. H., J. W. Hesselink, E. W. Russchen, H. W. Barkema, M. T. Collins and I. J. Visser (1999). "Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples." J Vet Diagn Invest **11**(4): 345-351.

Kamanaka, M., S. T. Kim, Y. Y. Wan, F. S. Sutterwala, M. Lara-Tejero, J. E. Galan, E. Harhaj and R. A. Flavell (2006). "Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse." Immunity **25**(6): 941-952.

Kanazawa, K., Y. Haga, O. Funakoshi, H. Nakajima, A. Munakata and Y. Yoshida (1999). "Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction." J Gastroenterol **34**(2): 200-206.

Karcher, E. L., D. C. Beitz and J. R. Stabel (2008). "Modulation of cytokine gene expression and secretion during the periparturient period in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Vet Immunol Immunopathol **123**(3-4): 277-288.

Kaser, T., A. Mullebner, R. T. Hartl, S. E. Essler, A. Saalmuller and J. Catharina Duvigneau (2012). "Porcine T-helper and regulatory T cells exhibit versatile mRNA expression capabilities for cytokines and co-stimulatory molecules." Cytokine **60**(2): 400-409.

Kathaperumal, K., V. Kumanan, S. McDonough, L. H. Chen, S. U. Park, M. A. Moreira, B. Akey, J. Huntley, C. F. Chang and Y. F. Chang (2009). "Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Vaccine **27**(1): 123-135.

- Kawakami, K.**, Y. Koguchi, M. H. Qureshi, Y. Kinjo, S. Yara, A. Miyazato, M. Kurimoto, K. Takeda, S. Akira and A. Saito (2000). "Reduced host resistance and Th1 response to *Cryptococcus neoformans* in interleukin-18 deficient mice." FEMS Microbiol Lett **186**(1): 121-126.
- Kehrl, J. H.**, L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med **163**(5): 1037-1050.
- Kennedy, D. J.** and G. Benedictus (2001). "Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in agricultural species." Rev Sci Tech **20**(1): 151-179.
- Khalifeh, M. S.** and J. R. Stabel (2004). "Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle." Infect Immun **72**(4): 1974-1982.
- Khalifeh, M. S.** and J. R. Stabel (2004). "Upregulation of transforming growth factor-beta and interleukin-10 in cows with clinical Johne's disease." Vet Immunol Immunopathol **99**(1-2): 39-46.
- Kinjo, Y.**, K. Kawakami, K. Uezu, S. Yara, K. Miyagi, Y. Koguchi, T. Hoshino, M. Okamoto, Y. Kawase, K. Yokota, K. Yoshino, K. Takeda, S. Akira and A. Saito (2002). "Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis*: a comparative study with IL-12p40." J Immunol **169**(1): 323-329.
- Klinkenberg, D.** and A. Koets (2015). "The long subclinical phase of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infections explained without adaptive immunity." Vet Res **46**: 63.
- Kobayashi, M.**, L. Fitz, M. Ryan, R. M. Hewick, S. C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia and G. Trinchieri (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 827-845.
- Koch, F.**, U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani and G. Schuler (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." J Exp Med **184**(2): 741-746.
- Koets, A.**, V. Rutten, A. Hoek, F. van Mil, K. Muller, D. Bakker, E. Gruys and W. van Eden (2002). "Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4(+) T cells, increased frequency of gamma delta T cells, and related changes in T-cell function." Infect Immun **70**(7): 3856-3864.
- Koets, A. P.**, G. Adugna, L. L. Janss, H. J. van Weering, C. H. Kalis, G. H. Wentink, V. P. Rutten and Y. H. Schukken (2000). "Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in dairy cattle." J Dairy Sci **83**(11): 2702-2708.
- Koets, A. P.**, V. P. Rutten, A. Hoek, D. Bakker, F. van Zijderveld, K. E. Muller and W. van Eden (1999). "Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis." Vet Immunol Immunopathol **70**(1-2): 105-115.
- Köhler, H.**, H. Gyra, K. Zimmer, K. G. Drager, B. Burkert, B. Lemser, D. Hausleithner, K. Cubler, W. Klawonn and R. G. Hess (2001). "Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **48**(3): 185-195.
- Köhler, H.**, A. Soschinka, M. Meyer, A. Kather, P. Reinhold and E. Liebler-Tenorio (2015). "Characterization of a caprine model for the subclinical initial phase of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection." BMC Vet Res **11**: 74.

- Kohno, K.**, J. Kataoka, T. Ohtsuki, Y. Suemoto, I. Okamoto, M. Usui, M. Ikeda and M. Kurimoto (1997). "IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12." J Immunol **158**(4): 1541-1550.
- Koo, H. C.**, Y. H. Park, M. J. Hamilton, G. M. Barrington, C. J. Davies, J. B. Kim, J. L. Dahl, W. R. Waters and W. C. Davis (2004). "Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in experimentally infected calves." Infect Immun **72**(12): 6870-6883.
- Körmendy, B.** (1988). "Diagnostic value of mammalian, avian and johnin PPD tuberculin in cattle herds infected by *Mycobacterium paratuberculosis*." Acta Vet Hung **36**(3-4): 177-183.
- Körmendy, B.** (1994). "The effect of vaccination on the prevalence of paratuberculosis in large dairy herds." Vet Microbiol **41**(1-2): 117-125.
- Korou, L. M.**, E. Liandris, M. Gazouli and J. Ikononopoulos (2010). "Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis." Vet Microbiol **144**(3-4): 353-358.
- Kostoulas, P.**, L. Leontides, C. Enoe, C. Billinis, M. Florou and M. Sofia (2006). "Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats." Prev Vet Med **76**(1-2): 56-73.
- Kralik, P.**, R. Pribylova-Dziedzinska, A. Kralova, K. Kovarcik and I. Slana (2014). "Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in a Limousin cattle herd." Vet J **201**(1): 91-94.
- Kreeger, J. M.** and T. G. Snider, 3rd (1992). "Measurement of lymphoblast proliferative capacity of stimulated blood mononuclear cells from cattle with chronic paratuberculosis." Am J Vet Res **53**(3): 392-395.
- Krüger, C.**, H. Köhler and E. M. Liebler-Tenorio (2014). "Sequential Development of Lesions 3, 6, 9, and 12 Months After Experimental Infection of Goat Kids With *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis." Vet Pathol.
- Kruschinski, C.**, T. Skripuletz, S. Bedoui, T. Tschernig, R. Pabst, C. Nassenstein, A. Braun and S. von Horsten (2005). "CD26 (dipeptidyl-peptidase IV)-dependent recruitment of T cells in a rat asthma model." Clin Exp Immunol **139**(1): 17-24.
- Kubin, M.**, J. M. Chow and G. Trinchieri (1994). "Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells." Blood **83**(7): 1847-1855.
- Kuehnelt, M. P.**, R. Goethe, A. Habermann, E. Mueller, M. Rohde, G. Griffiths and P. Valentin-Weigand (2001). "Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria." Cell Microbiol **3**(8): 551-566.
- Kurade, N. P.**, B. N. Tripathi, K. Rajukumar and N. S. Parihar (2004). "Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." Vet Pathol **41**(4): 378-387.
- Lambrecht, R. S.**, J. F. Carriere and M. T. Collins (1988). "A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp." Appl Environ Microbiol **54**(4): 910-916.
- Lankford, C. S.** and D. M. Frucht (2003). "A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity." J Leukoc Biol **73**(1): 49-56.
- Letourneau, S.**, C. Krieg, G. Pantaleo and O. Boyman (2009). "IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets." J Allergy Clin Immunol **123**(4): 758-762.

- Leutenegger, C. M.**, A. M. Alluwaimi, W. L. Smith, L. Perani and J. S. Cullor (2000). "Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction." Vet Immunol Immunopathol **77**(3-4): 275-287.
- Li, L.**, J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal and V. Kapur (2005). "The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12344-12349.
- Lim, J. K.**, J. M. Burns, W. Lu and A. L. DeVico (2005). "Multiple pathways of amino terminal processing produce two truncated variants of RANTES/CCL5." J Leukoc Biol **78**(2): 442-452.
- Lloyd, J. B.**, R. J. Whittington, C. Fitzgibbon and R. Dobson (2001). "Presence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium." Vet Rec **148**(9): 261-263.
- Logar, K.**, R. Kopinc, P. Bandelj, J. Staric, A. Lapanje and M. Ocepek (2012). "Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA." BMC Vet Res **8**: 49.
- Lybeck, K. R.**, M. Lovoll, T. B. Johansen, I. Olsen, A. K. Storset and M. Valheim (2013). "Intestinal strictures, fibrous adhesions and high local interleukin-10 levels in goats infected naturally with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." J Comp Pathol **148**(2-3): 157-172.
- Lybeck, K. R.**, A. K. Storset, B. Djonne, M. Valheim and I. Olsen (2010). "Faecal shedding detected earlier than immune responses in goats naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis." Res Vet Sci **91**(1): 32-39.
- Lybeck, K. R.**, A. K. Storset and I. Olsen (2009). "Neutralization of interleukin-10 from CD14(+) monocytes enhances gamma interferon production in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis-infected goats." Clin Vaccine Immunol **16**(7): 1003-1011.
- Malek, T. R.** (2008). "The biology of interleukin-2." Annu Rev Immunol **26**: 453-479.
- Manetti, R.**, P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri and S. Romagnani (1993). "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." J Exp Med **177**(4): 1199-1204.
- Manning, E. J.** and M. T. Collins (2001). "*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis." Rev Sci Tech **20**(1): 133-150.
- Manning, E. J.**, H. Steinberg, V. Krebs and M. T. Collins (2003). "Diagnostic testing patterns of natural *Mycobacterium paratuberculosis* infection in pygmy goats." Can J Vet Res **67**(3): 213-218.
- McDonald, W. L.**, S. E. Ridge, A. F. Hope and R. J. Condron (1999). "Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle." Aust Vet J **77**(2): 113-119.
- McGregor, H.**, N. K. Dhand, O. P. Dhungyel and R. J. Whittington (2012). "Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model." Prev Vet Med **107**(1-2): 76-84.
- McNab, W. B.**, A. H. Meek, J. R. Duncan, B. W. Brooks, A. A. Van Dreumel, S. W. Martin, K. H. Nielsen, E. A. Sugden and C. Turcotte (1991). "An evaluation of selected screening tests for bovine paratuberculosis." Can J Vet Res **55**(3): 252-259.
- McNees, A. L.**, D. Markesich, N. R. Zayyani and D. Y. Graham (2015). "*Mycobacterium paratuberculosis* as a cause of Crohn's disease." Expert Rev Gastroenterol Hepatol **9**(12): 1523-1534.
- Merkal, R. S.** and B. J. Curran (1974). "Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*." Appl Microbiol **28**(2): 276-279.

- Meyer, M.** (2011). "Klinische und pathologische Befunde nach experimenteller Inokulation von Ziegenlämmern mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*", Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Mikkelsen, H., C. Aagaard, S. S. Nielsen and G. Jungersen** (2011). "Novel antigens for detection of cell mediated immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle." Vet Immunol Immunopathol **143**(1-2): 46-54.
- Mikkelsen, H., C. Aagaard, S. S. Nielsen and G. Jungersen** (2011). "Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential." Vet Microbiol **152**(1-2): 1-20.
- Mikkelsen, H., C. Aagaard, S. S. Nielsen and G. Jungersen** (2012). "Correlation of antigen-specific IFN-gamma responses of fresh blood samples from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected heifers with responses of day-old samples co-cultured with IL-12 or anti-IL-10 antibodies." Vet Immunol Immunopathol **147**(1-2): 69-76.
- Milner, A. R., W. N. Mack, K. J. Coates, J. Hill, I. Gill and P. Sheldrick** (1990). "The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from a field trial in cattle." Vet Microbiol **25**(2-3): 193-198.
- Mitchell, R. M., G. F. Medley, M. T. Collins and Y. H. Schukken** (2012). "A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in experimentally infected calves and cows." Epidemiol Infect **140**(2): 231-246.
- Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann and N. F. Cheville** (1988). "Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves." Vet Pathol **25**(2): 131-137.
- Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita and F. Megraud** (1997). "Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model." J Clin Microbiol **35**(4): 995-998.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra** (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Moreno, C., A. Mehlert and J. Lamb** (1988). "The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation." Clin Exp Immunol **74**(2): 206-210.
- Morimoto, C., Y. Torimoto, G. Levinson, C. E. Rudd, M. Schrieber, N. H. Dang, N. L. Letvin and S. F. Schlossman** (1989). "1F7, a novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells." J Immunol **143**(11): 3430-3439.
- Morin, M.** (1982). "Johne's Disease (Paratuberculosis) in Goats: A Report of Eight Cases in Quebec." Can Vet J **23**(2): 55-58.
- Mortensen, H., S. S. Nielsen and P. Berg** (2004). "Genetic variation and heritability of the antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Danish Holstein cows." J Dairy Sci **87**(7): 2108-2113.
- Mortier, R. A., H. W. Barkema, J. M. Bystrom, O. Illanes, K. Orsel, R. Wolf, G. Atkins and J. De Buck** (2013). "Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture." Vet Res **44**: 94.
- Mosmann, T. R.** (1991). "Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets." Immunol Res **10**(3-4): 183-188.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann and M. Modolell** (1998). "Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation." J Exp Med **187**(12): 2103-2108.

- Munjal, S. K.**, J. Boehmer, M. Beyerbach, K. Strutzberg-Minder and M. Homuth (2004). "Evaluation of a LAM ELISA for diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats." Vet Microbiol **103**(1-2): 107-114.
- Munjal, S. K.**, B. N. Tripathi and O. P. Paliwal (2005). "Progressive immunopathological changes during early stages of experimental infection of goats with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis." Vet Pathol **42**(4): 427-436.
- Munjal, S. K.**, B. N. Tripathi, O. P. Paliwal, J. Boehmer and M. Homuth (2007). "Application of different methods for the diagnosis of experimental paratuberculosis in goats." Zoonoses Public Health **54**(3-4): 140-146.
- Munk, M. E.** and M. Emoto (1995). "Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections." Eur Respir J Suppl **20**: 668s-675s.
- Munoz, E.**, M. V. Blazquez, J. A. Madueno, G. Rubio and J. Pena (1992). "CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation." Immunology **77**(1): 43-50.
- Munoz, M.**, L. Delgado, A. Verna, J. Benavides, C. Garcia-Pariente, M. Fuertes, M. C. Ferreras, J. F. Garcia-Marin and V. Perez (2009). "Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in different types of granulomatous lesions in bovine and ovine paratuberculosis." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **32**(3): 239-252.
- Murray, P. J.** and R. A. Young (1999). "Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice." Infect Immun **67**(6): 3087-3095.
- Muskens, J.**, M. H. Mars, A. R. Elbers, K. Van Maanen and D. Bakker (2003). "The results of using faecal culture as confirmation test of paratuberculosis-seropositive dairy cattle." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **50**(5): 231-234.
- Nakanishi, K.**, T. Yoshimoto, H. Tsutsui and H. Okamura (2001). "Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses." Annu Rev Immunol **19**: 423-474.
- Navarro, J. A.**, G. Ramis, J. Seva, F. J. Pallares and J. Sanchez (1998). "Changes in lymphocyte subsets in the intestine and mesenteric lymph nodes in caprine paratuberculosis." J Comp Pathol **118**(2): 109-121.
- Nielsen, S. S.**, H. Bjerre and N. Toft (2008). "Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy cattle." J Dairy Sci **91**(12): 4610-4615.
- Nielsen, S. S.** and A. K. Ersboll (2006). "Age at occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally infected dairy cows." J Dairy Sci **89**(12): 4557-4566.
- Nielsen, S. S.**, C. Gronbaek, J. F. Agger and H. Houe (2002). "Maximum-likelihood estimation of sensitivity and specificity of ELISAs and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis." Prev Vet Med **53**(3): 191-204.
- Nielsen, S. S.**, B. Kolmos and A. B. Christoffersen (2004). "Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis on two different media." J Appl Microbiol **96**(1): 149-153.
- Nielsen, S. S.** and N. Toft (2006). "Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis." J Dairy Sci **89**(2): 569-579.
- Nielsen, S. S.** and N. Toft (2008). "Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques." Vet Microbiol **129**(3-4): 217-235.
- Nielsen, S. S.** and N. Toft (2009). "A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe." Prev Vet Med **88**(1): 1-14.
- Nielsen, S. S.**, N. Toft and H. Okura (2013). "Dynamics of specific anti-*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis antibody response through age." PLoS One **8**(4): e63009.

- Nisbet, D. I.**, N. J. Gilmour and J. G. Brotherston (1962). "Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. III. Intestinal histopathology." J Comp Pathol **72**: 80-91.
- Nolan, T.**, R. E. Hands and S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." Nat Protoc **1**(3): 1559-1582.
- Norton, S.**, W. O. Johnson, G. Jones and C. Heuer (2010). "Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease (*Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis) in New Zealand dairy cows." J Vet Diagn Invest **22**(3): 341-351.
- O'Brien, R.**, C. G. Mackintosh, D. Bakker, M. Kopečna, I. Pavlik and J. F. Griffin (2006). "Immunological and molecular characterization of susceptibility in relationship to bacterial strain differences in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the red deer (*Cervus elaphus*)." Infect Immun **74**(6): 3530-3537.
- O'Garra, A.** (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." Immunity **8**(3): 275-283.
- O'Garra, A.** and P. Vieira (2007). "T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10." Nat Rev Immunol **7**(6): 425-428.
- Okamura, H.**, K. Nagata, T. Komatsu, T. Tanimoto, Y. Nukata, F. Tanabe, K. Akita, K. Torigoe, T. Okura, S. Fukuda and *et al.* (1995). "A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock." Infect Immun **63**(10): 3966-3972.
- Olsen, I.**, G. Sigurgardottir and B. Djonne (2002). "Paratuberculosis with special reference to cattle. A review." Vet Q **24**(1): 12-28.
- Olsen, I.** and A. K. Storset (2001). "Innate IFN-gamma production in cattle in response to MPP14, a secreted protein from *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis." Scand J Immunol **54**(3): 306-313.
- Oppmann, B.**, R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-725.
- Osterstock, J. B.**, G. T. Fosgate, B. Norby, E. J. Manning, M. T. Collins and A. J. Roussel (2007). "Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis." J Am Vet Med Assoc **230**(6): 896-901.
- Ott, S. L.**, S. J. Wells and B. A. Wagner (1999). "Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations." Prev Vet Med **40**(3-4): 179-192.
- Over, K.**, P. G. Crandall, C. A. O'Bryan and S. C. Ricke (2011). "Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis, Johne's disease, and Crohn's disease: a review." Crit Rev Microbiol **37**(2): 141-156.
- Perez de Val, B.**, M. Nofrarias, S. Lopez-Soria, J. M. Garrido, H. M. Vordermeier, B. Villarreal-Ramos, M. Martin, E. Puentes, R. A. Juste and M. Domingo (2012). "Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection." BMC Vet Res **8**: 191.
- Perez, V.**, J. F. Garcia Marin and J. J. Badiola (1996). "Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep." J Comp Pathol **114**(2): 107-122.
- Perez, V.**, J. Tellechea, J. M. Corpa, M. Gutierrez and J. F. Garcia Marin (1999). "Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis." Am J Vet Res **60**(1): 123-127.

- Pfaffl, M. W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Philpott, M.** (1993). "The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer." Br Vet J **149**(4): 339-369.
- Pithua, P., S. M. Godden, S. J. Wells and M. J. Oakes** (2009). "Efficacy of feeding plasma-derived commercial colostrum replacer for the prevention of transmission of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein calves." J Am Vet Med Assoc **234**(9): 1167-1176.
- Plain, K. M., D. J. Begg, K. de Silva, A. C. Purdie and R. J. Whittington** (2012). "Enhancement of the interferon gamma assay to detect *paratuberculosis* using interleukin-7 and interleukin-12 potentiation." Vet Immunol Immunopathol **149**(1-2): 28-37.
- Plain, K. M., K. de Silva, J. Earl, D. J. Begg, A. C. Purdie and R. J. Whittington** (2011). "Indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan catabolism, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a model for chronic mycobacterial infections." Infect Immun **79**(9): 3821-3832.
- Plain, K. M., I. B. Marsh, A. M. Waldron, F. Galea, A. M. Whittington, V. F. Saunders, D. J. Begg, K. de Silva, A. C. Purdie and R. J. Whittington** (2014). "High-throughput direct fecal PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in sheep and cattle." J Clin Microbiol **52**(3): 745-757.
- Purdie, A. C., K. M. Plain, D. J. Begg, K. de Silva and R. J. Whittington** (2011). "Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep: a review." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **34**(3): 197-208.
- Puren, A. J., G. Fantuzzi, Y. Gu, M. S. Su and C. A. Dinarello** (1998). "Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells." J Clin Invest **101**(3): 711-721.
- Radia, D., K. Bond, G. Limon, S. van Winden and J. Guitian** (2013). "Relationship between periparturient management, prevalence of MAP and preventable economic losses in UK dairy herds." Vet Rec **173**(14): 343.
- Rai, A. K., C. P. Thakur, P. Kumar and D. K. Mitra** (2012). "Impaired expression of CD26 compromises T-cell recruitment in human visceral leishmaniasis." Eur J Immunol **42**(10): 2782-2791.
- Raizman, E. A., L. A. Espejo and S. J. Wells** (2011). "Long-Term Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fecal Samples Obtained from Naturally Infected Cows and Stored at -18 degrees C and -70 degrees C." Vet Med Int **2011**: 341691.
- Reddacliff, L. A. and R. J. Whittington** (2003). "Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Vet Microbiol **96**(3): 247-258.
- Reibman, J., S. Meixler, T. C. Lee, L. I. Gold, B. N. Cronstein, K. A. Haines, S. L. Kolasinski and G. Weissmann** (1991). "Transforming growth factor β 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(15): 6805-6809.
- Ris, D. R., K. L. Hamel and J. M. Ayling** (1987). "Can sheep become infected by grazing pasture contaminated by cattle with Johne's disease?" N Z Vet J **35**(8): 137.
- Ris, D. R., K. L. Hamel and A. M. Weaver** (1988). "Natural transmission of Johne's disease to feral goats." N Z Vet J **36**(2): 98-99.
- Roach, D. R., A. G. Bean, C. Demangel, M. P. France, H. Briscoe and W. J. Britton** (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J Immunol **168**(9): 4620-4627.
- Robbe-Austerman, S.** (2011). "Control of *paratuberculosis* in small ruminants." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 609-620, vii.

- Robbe-Austerman, S.**, I. A. Gardner, B. V. Thomsen, D. G. Morrical, B. M. Martin, M. V. Palmer, C. O. Thoen and C. Ewing (2006). "Sensitivity and specificity of the agar-gel-immunodiffusion test, ELISA and the skin test for detection of paratuberculosis in United States Midwest sheep populations." Vet Res **37**(4): 553-564.
- Robbe-Austerman, S.**, A. C. Krull and J. R. Stabel (2006). "Time delay, temperature effects and assessment of positive controls on whole blood for the gamma interferon ELISA to detect paratuberculosis." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **53**(5): 213-217.
- Robbe-Austerman, S.**, J. R. Stabel and D. G. Morrical (2007). "Skin test and gamma interferon enzyme-linked immunosorbent assay results in sheep exposed to dead *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis organisms." J Vet Diagn Invest **19**(1): 88-90.
- Robbe-Austerman, S.**, J. R. Stabel and M. V. Palmer (2006). "Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative." J Vet Diagn Invest **18**(2): 189-194.
- Robertson, M. J.**, R. J. Soiffer, S. F. Wolf, T. J. Manley, C. Donahue, D. Young, S. H. Herrmann and J. Ritz (1992). "Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF." J Exp Med **175**(3): 779-788.
- Robinson, D.**, K. Shibuya, A. Mui, F. Zonin, E. Murphy, T. Sana, S. B. Hartley, S. Menon, R. Kastelein, F. Bazan and A. O'Garra (1997). "IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB." Immunity **7**(4): 571-581.
- Rook, A. H.**, J. H. Kehrl, L. M. Wakefield, A. B. Roberts, M. B. Sporn, D. B. Burlington, H. C. Lane and A. S. Fauci (1986). "Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness." J Immunol **136**(10): 3916-3920.
- Roque, S.**, C. Nobrega, R. Appelberg and M. Correia-Neves (2007). "IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy." J Immunol **178**(12): 8028-8035.
- Rosenzweig, S. D.** and S. M. Holland (2005). "Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways." Immunol Rev **203**: 38-47.
- Rothel, J. S.**, S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox and P. R. Wood (1992). "The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture." Aust Vet J **69**(1): 1-4.
- Rowe, M. T.** and I. R. Grant (2006). "*Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis and its potential survival tactics." Lett Appl Microbiol **42**(4): 305-311.
- Ruscetti, F. W.** and M. A. Palladino (1991). "Transforming growth factor-beta and the immune system." Prog Growth Factor Res **3**(2): 159-175.
- Salgado, M.**, J. Kruze and M. T. Collins (2007). "Diagnosis of paratuberculosis by fecal culture and ELISA on milk and serum samples in two types of Chilean dairy goat herds." J Vet Diagn Invest **19**(1): 99-102.
- Salgado, M.**, P. Steuer, E. Troncoso and M. T. Collins (2013). "Evaluation of PMS-PCR technology for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis directly from bovine fecal specimens." Vet Microbiol **167**(3-4): 725-728.
- Sanderson, J. D.**, M. T. Moss, M. L. Tizard and J. Hermon-Taylor (1992). "*Mycobacterium* paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue." Gut **33**(7): 890-896.
- Santema, W.**, M. Overdijk, J. Barends, J. Krijgsveld, V. Rutten and A. Koets (2009). "Searching for proteins of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis with diagnostic

potential by comparative qualitative proteomic analysis of mycobacterial tuberculins." Vet Microbiol **138**(1-2): 191-196.

Saunders, B. M. and A. M. Cooper (2000). "Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections." Immunol Cell Biol **78**(4): 334-341.

Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, P. H. Schlesinger and D. G. Russell (1998). "Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages." J Immunol **160**(3): 1290-1296.

Scheel-Toellner, D., E. Richter, K. M. Toellner, N. Reiling, H. H. Wacker, H. D. Flad and J. Gerdes (1995). "CD26 expression in leprosy and other granulomatous diseases correlates with the production of interferon-gamma." Lab Invest **73**(5): 685-690.

Schlaak, J. F., E. Hermann, H. Gallati, K. H. Meyer zum Buschenfelde and B. Fleischer (1994). "Differential effects of IL-10 on proliferation and cytokine production of human gamma/delta and alpha/beta T cells." Scand J Immunol **39**(2): 209-215.

Schmitt, E., P. Hoehn, C. Huels, S. Goedert, N. Palm, E. Rude and T. Germann (1994). "T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta." Eur J Immunol **24**(4): 793-798.

Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.

Schneider, B. E., D. Korbel, K. Hagens, M. Koch, B. Raupach, J. Enders, S. H. Kaufmann, H. W. Mittrucker and U. E. Schaible (2010). "A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis." Eur J Immunol **40**(2): 396-405.

Schönenbrücher, H., A. Abdulmawjood, K. Failing and M. Bulte (2008). "New triplex real-time PCR assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine feces." Appl Environ Microbiol **74**(9): 2751-2758.

Schött, S. (2002). Experience gained in the control of paratuberculosis in the free state of Thuringia. Proceedings 2. Leipziger Tierärztekongress, Leipzig: 154-157.

Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-189.

Scott, M. C., J. P. Bannantine, Y. Kaneko, A. J. Branscum, R. H. Whitlock, Y. Mori, C. A. Speer and S. Eda (2010). "Absorbed EVELISA: a diagnostic test with improved specificity for Johne's disease in cattle." Foodborne Pathog Dis **7**(11): 1291-1296.

Sechi, L. A. and C. T. Dow (2015). "Mycobacterium avium ss. paratuberculosis Zoonosis - The Hundred Year War - Beyond Crohn's Disease." Front Immunol **6**: 96.

Secott, T. E., T. L. Lin and C. C. Wu (2001). "Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis." Infect Immun **69**(4): 2075-2082.

Sedgwick, J. D., D. S. Riminton, J. G. Cyster and H. Korner (2000). "Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement." Immunol Today **21**(3): 110-113.

Seitz, S. E., L. E. Heider, W. D. Heuston, S. Bech-Nielsen, D. M. Rings and L. Spangler (1989). "Bovine fetal infection with Mycobacterium paratuberculosis." J Am Vet Med Assoc **194**(10): 1423-1426.

Serbina, N. V. and J. L. Flynn (2001). "CD8(+) T cells participate in the memory immune response to Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **69**(7): 4320-4328.

Sergeant, E. S., D. J. Marshall, G. J. Eamens, C. Kearns and R. J. Whittington (2003). "Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia." Prev Vet Med **61**(4): 235-248.

- Sevilla, I.**, J. M. Garrido, M. Geijo and R. A. Juste (2007). "Pulsed-field gel electrophoresis profile homogeneity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from cattle and heterogeneity of those from sheep and goats." BMC Microbiol **7**: 18.
- Shin, S. J.**, C. F. Chang, C. D. Chang, S. P. McDonough, B. Thompson, H. S. Yoo and Y. F. Chang (2005). "In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Infect Immun **73**(8): 5074-5085.
- Shu, D.**, S. Subharat, D. N. Wedlock, D. Luo, G. W. de Lisle and B. M. Buddle (2011). "Diverse cytokine profile from mesenteric lymph node cells of cull cows severely affected with Johne's disease." Clin Vaccine Immunol **18**(9): 1467-1476.
- Sibley, L. D.**, S. W. Hunter, P. J. Brennan and J. L. Krahenbuhl (1988). "Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages." Infect Immun **56**(5): 1232-1236.
- Siebenlist, U.**, G. Franzoso and K. Brown (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B." Annu Rev Cell Biol **10**: 405-455.
- Sieling, P. A.** and R. L. Modlin (1994). "Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection." Immunobiology **191**(4-5): 378-387.
- Singh, A. V.**, S. V. Singh, J. S. Sohal and P. K. Singh (2009). "Comparative potential of modified indigenous, indigenous and commercial ELISA kits for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat and sheep." Indian J Exp Biol **47**(5): 379-382.
- Singh, P. K.**, S. V. Singh, V. K. Saxena, M. K. Singh, A. V. Singh and J. S. Sohal (2013). "Expression profiles of different cytokine genes in peripheral blood mononuclear cells of goats infected experimentally with native strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Anim Biotechnol **24**(3): 187-197.
- Singh, P. K.**, S. V. Singh, A. V. Singh and J. S. Sohal (2008). "Evaluation of four methods of DNA recovery from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* present in intestine tissue of goats and comparative sensitivity of IS900 PCR with respect to culture for diagnosis of Johne's disease." Indian J Exp Biol **46**(8): 579-582.
- Smeed, J. A.**, C. A. Watkins, S. M. Rhind and J. Hopkins (2007). "Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep *paratuberculosis*." BMC Vet Res **3**: 18.
- Sockett, D. C.**, D. J. Carr and M. T. Collins (1992). "Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle." Can J Vet Res **56**(2): 148-153.
- Sockett, D. C.**, T. A. Conrad, C. B. Thomas and M. T. Collins (1992). "Evaluation of four serological tests for bovine *paratuberculosis*." J Clin Microbiol **30**(5): 1134-1139.
- Sohal, J. S.**, S. V. Singh, A. V. Singh and P. K. Singh (2010). "Strain diversity within *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*--a review." Indian J Exp Biol **48**(1): 7-16.
- St-Jean, G.** and A. D. Jernigan (1991). "Treatment of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in ruminants." Vet Clin North Am Food Anim Pract **7**(3): 793-804.
- St Georgiev, V.** and J. F. Albright (1993). "Cytokines and their role as growth factors and in regulation of immune responses." Ann N Y Acad Sci **685**: 584-602.
- Stabel, J. R.** (1995). "Temporal effects of tumor necrosis factor-alpha on intracellular survival of *Mycobacterium paratuberculosis*." Vet Immunol Immunopathol **45**(3-4): 321-332.
- Stabel, J. R.** (1996). "Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical *paratuberculosis*." J Vet Diagn Invest **8**(3): 345-350.
- Stabel, J. R.** (2000). "Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*." Am J Vet Res **61**(7): 754-760.

- Stabel, J. R.** (2000). "Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*." Vet Microbiol **77**(3-4): 465-473.
- Stabel, J. R.** and J. P. Bannantine (2005). "Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples." J Clin Microbiol **43**(9): 4744-4750.
- Stabel, J. R.**, K. Kimura and S. Robbe-Austerman (2007). "Augmentation of secreted and intracellular gamma interferon following johnin purified protein derivative sensitization of cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." J Vet Diagn Invest **19**(1): 43-51.
- Stabel, J. R.** and S. Robbe-Austerman (2011). "Early immune markers associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in a neonatal calf model." Clin Vaccine Immunol **18**(3): 393-405.
- Steadham, E. M.**, B. M. Martin and C. O. Thoen (2002). "Production of a *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* purified protein derivative (PPD) and evaluation of potency in guinea pigs." Biologicals **30**(2): 93-95.
- Stevenson, K.** (2015). "Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review." Vet Res **46**: 64.
- Stevenson, K.**, V. M. Hughes, L. de Juan, N. F. Inglis, F. Wright and J. M. Sharp (2002). "Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." J Clin Microbiol **40**(5): 1798-1804.
- Stewart, D. J.**, J. A. Vaughan, P. L. Stiles, P. J. Noske, M. L. Tizard, S. J. Prowse, W. P. Michalski, K. L. Butler and S. L. Jones (2004). "A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies." Vet Microbiol **104**(3-4): 165-178.
- Stewart, D. J.**, J. A. Vaughan, P. L. Stiles, P. J. Noske, M. L. Tizard, S. J. Prowse, W. P. Michalski, K. L. Butler and S. L. Jones (2006). "A long-term study in Angora goats experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies." Vet Microbiol **113**(1-2): 13-24.
- Stewart, D. J.**, J. A. Vaughan, P. L. Stiles, P. J. Noske, M. L. Tizard, S. J. Prowse, W. P. Michalski, K. L. Butler and S. L. Jones (2007). "A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats." Vet Microbiol **122**(1-2): 83-96.
- Storset, A. K.** (2003). "Immunology of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection--immunodiagnostic methods." Acta Vet Scand **44**(3-4): 223-229.
- Storset, A. K.**, I. Berg and B. Djonne (2005). "Evaluation of the gamma interferon test for diagnosis of *paratuberculosis* in goats." Vet Immunol Immunopathol **107**(1-2): 87-94.
- Storset, A. K.**, H. J. Hasvold, M. Valheim, H. Brun-Hansen, G. Berntsen, S. K. Whist, B. Djonne, C. M. Press, G. Holstad and H. J. Larsen (2001). "Subclinical *paratuberculosis* in goats following experimental infection. An immunological and microbiological study." Vet Immunol Immunopathol **80**(3-4): 271-287.
- Subharat, S.**, D. Shu, D. N. Wedlock, M. Price-Carter, G. W. de Lisle, D. Luo, D. M. Collins and B. M. Buddle (2012). "Immune responses associated with progression and control of infection in calves experimentally challenged with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Vet Immunol Immunopathol **149**(3-4): 225-236.
- Sugawara, I.**, H. Yamada, H. Kaneko, S. Mizuno, K. Takeda and S. Akira (1999). "Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice." Infect Immun **67**(5): 2585-2589.

- Sweeney, R. W.** (2011). "Pathogenesis of paratuberculosis." Vet Clin North Am Food Anim Pract **27**(3): 537-546, v.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, C. L. Buckley and P. A. Spencer** (1995). "Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle." J Vet Diagn Invest **7**(4): 488-493.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, A. N. Hamir, A. E. Rosenberger and S. A. Herr** (1992). "Isolation of Mycobacterium paratuberculosis after oral inoculation in uninfected cattle." Am J Vet Res **53**(8): 1312-1314.
- Sweeney, R. W., R. H. Whitlock, S. McAdams and T. Fyock** (2006). "Longitudinal study of ELISA seroreactivity to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in infected cattle and culture-negative herd mates." J Vet Diagn Invest **18**(1): 2-6.
- Tafti, A. K. and K. Rashidi** (2000). "The pathology of goat paratuberculosis: gross and histopathological lesions in the intestines and mesenteric lymph nodes." J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **47**(7): 487-495.
- Tanaka, S., M. Sato, T. Onitsuka, H. Kamata and Y. Yokomizo** (2005). "Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis." Vet Pathol **42**(5): 579-588.
- Tanaka, S., M. Sato, T. Taniguchi and Y. Yokomizo** (1994). "Histopathological and morphometrical comparison of granulomatous lesions in BALB/c and C3H/HeJ mice inoculated with Mycobacterium paratuberculosis." J Comp Pathol **110**(4): 381-388.
- Tanaka, T., J. Kameoka, A. Yaron, S. F. Schlossman and C. Morimoto** (1993). "The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4586-4590.
- Taylor, A. W.** (1953). "Experimental Johne's disease in cattle." J Comp Pathol **63**(4): 355-367.
- Tessema, M. Z., A. P. Koets, V. P. Rutten and E. Gruys** (2001). "How does Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis resist intracellular degradation?" Vet Q **23**(4): 153-162.
- Thorel, M. F.** (1984). "Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species." Ann Rech Vet **15**(3): 405-409.
- Thorel, M. F., M. Krichevsky and V. V. Levy-Frebault** (1990). "Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov." Int J Syst Bacteriol **40**(3): 254-260.
- Thornton, C. G. and S. Passen** (2004). "Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition." J Microbiol Methods **59**(1): 43-52.
- Timms, V. J., M. M. Gehringer, H. M. Mitchell, G. Daskalopoulos and B. A. Neilan** (2011). "How accurately can we detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection?" J Microbiol Methods **85**(1): 1-8.
- Toman, M., M. Faldyna and I. Pavlik** (2003). "Immunological characteristics of cattle with Mycobacterium avium subsp paratuberculosis infection." Veterinarni Medicina **48**(6): 147-154.
- Trinchieri, G.** (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-276.
- Tripathi, B. N., S. Periasamy, O. P. Paliwal and N. Singh** (2006). "Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, johnin and serological tests for diagnosis of naturally occurring paratuberculosis in goats." Vet Microbiol **116**(1-3): 129-137.

Tripp, C. S., S. F. Wolf and E. R. Unanue (1993). "Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3725-3729.

Trowbridge, I. S. and M. L. Thomas (1994). "Cd45 - an Emerging Role as a Protein-Tyrosine-Phosphatase Required for Lymphocyte-Activation and Development." Annual Review of Immunology **12**: 85-116.

Tsunawaki, S., M. Sporn, A. Ding and C. Nathan (1988). "Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta." Nature **334**(6179): 260-262.

Twort, C. (1914). "The experimental production of Johne's disease in some laboratory animals." Veterinary News **11**: 79-81.

Twort, F. W. (1910). "A method for isolating and growing the lepra bacillus of man (preliminary note)." Proceedings of The Royal Society of London(83): 156-158.

Twort, F. W. and G. L. Y. Ingram (1912). "A Method for Isolating and Cultivating the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis, Johne, and some Experiments on the Preparation of a Diagnostic Vaccine for Pseudotuberculous Enteritis of Bovines." Proceedings of The Royal Society of London.

Ushio, S., M. Namba, T. Okura, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura and M. Kurimoto (1996). "Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein." J Immunol **156**(11): 4274-4279.

van der Veen, D., J. M. Oliveira, W. A. van den Berg and L. H. de Graaff (2009). "Analysis of variance components reveals the contribution of sample processing to transcript variation." Appl Environ Microbiol **75**(8): 2414-2422.

van Schaik, G., C. H. Kalis, G. Benedictus, A. A. Dijkhuizen and R. B. Huirne (1996). "Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle." Vet Rec **139**(25): 624-627.

van Weering, H., G. van Schaik, A. van der Meulen, M. Waal, P. Franken and K. van Maanen (2007). "Diagnostic performance of the Pourquier ELISA for detection of antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds." Vet Microbiol **125**(1-2): 49-58.

Vansnick, E., P. de Rijk, F. Vercammen, L. Rigouts, F. Portaels and D. Geysen (2007). "A DNA sequence capture extraction method for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in feces and tissue samples." Vet Microbiol **122**(1-2): 166-171.

Vazquez, P., J. M. Garrido and R. A. Juste (2013). "Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle." PLoS One **8**(5): e64568.

Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean and B. Rocha (2000). "Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo." Nat Immunol **1**(1): 47-53.

Vilcek, J. and T. H. Lee (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions." J Biol Chem **266**(12): 7313-7316.

Wahl, S. M. (1992). "Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure." J Clin Immunol **12**(2): 61-74.

Wahl, S. M., D. A. Hunt, L. M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, A. B. Roberts and M. B. Sporn (1987). "Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5788-5792.

- Wahl, S. M.**, D. A. Hunt, H. L. Wong, S. Dougherty, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, L. Ellingsworth, J. A. Schmidt, G. Hall, A. B. Roberts and *et al.* (1988). "Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation." J Immunol **140**(9): 3026-3032.
- Wahl, S. M.**, N. McCartney-Francis, J. B. Allen, E. B. Dougherty and S. F. Dougherty (1990). "Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta." Ann N Y Acad Sci **593**: 188-196.
- Wallace, D. L.** and P. C. Beverley (1990). "Phenotypic changes associated with activation of CD45RA+ and CD45RO+ T cells." Immunology **69**(3): 460-467.
- Waters, W. R.**, J. M. Miller, M. V. Palmer, J. R. Stabel, D. E. Jones, K. A. Koistinen, E. M. Steadham, M. J. Hamilton, W. C. Davis and J. P. Bannantine (2003). "Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection of calves." Infect Immun **71**(9): 5130-5138.
- Weber, A.**, R. Schafer-Schmidt, D. Fuchs and U. Weigl (2000). "Occurrence of Mycobacterium paratuberculosis in faecal samples of cattle in Bavaria." Tierärztliche Umschau **55**(2): 97-99.
- Wei, X. Q.**, B. P. Leung, H. M. Arthur, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2001). "Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18." J Immunol **166**(1): 517-521.
- Weiss, D. J.**, O. A. Evanson, C. de Souza and M. S. Abrahamsen (2005). "A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to infection by Mycobacterium avium subsp paratuberculosis." Am J Vet Res **66**(4): 721-726.
- Weiss, D. J.**, O. A. Evanson, A. Moritz, M. Q. Deng and M. S. Abrahamsen (2002). "Differential responses of bovine macrophages to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium." Infect Immun **70**(10): 5556-5561.
- Weiss, D. J.**, O. A. Evanson and C. D. Souza (2005). "Expression of interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 associated with susceptibility of cattle to infection with Mycobacterium avium subsp paratuberculosis." Am J Vet Res **66**(7): 1114-1120.
- Welch, G. R.**, H. L. Wong and S. M. Wahl (1990). "Selective induction of Fc gamma RIII on human monocytes by transforming growth factor-beta." J Immunol **144**(9): 3444-3448.
- Whipple, D. L.**, M. V. Palmer, R. E. Slaughter and S. L. Jones (2001). "Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle." J Vet Diagn Invest **13**(2): 117-122.
- White, C. I.**, R. J. Birtles, P. Wigley and P. H. Jones (2010). "Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing." Vet Rec **166**(13): 401-402.
- Whitlock, R. H.** and C. Buergelt (1996). "Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)." Vet Clin North Am Food Anim Pract **12**(2): 345-356.
- Whitlock, R. H.**, S. J. Wells, R. W. Sweeney and J. Van Tiem (2000). "ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method." Vet Microbiol **77**(3-4): 387-398.
- Whittington, R. J.**, S. Fell, D. Walker, S. McAllister, I. Marsh, E. Sergeant, C. A. Taragel, D. J. Marshall and I. J. Links (2000). "Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in flocks of sheep." J Clin Microbiol **38**(7): 2550-2556.
- Whittington, R. J.**, I. Marsh, S. McAllister, M. J. Turner, D. J. Marshall and C. A. Fraser (1999). "Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from sheep." J Clin Microbiol **37**(4): 1077-1083.

- Whittington, R. J.**, I. B. Marsh and L. A. Reddacliff (2005). "Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment." Appl Environ Microbiol **71**(9): 5304-5308.
- Whittington, R. J.**, D. J. Marshall, P. J. Nicholls, I. B. Marsh and L. A. Reddacliff (2004). "Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment." Appl Environ Microbiol **70**(5): 2989-3004.
- Whittington, R. J.** and E. S. Sergeant (2001). "Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations." Aust Vet J **79**(4): 267-278.
- Whittington, R. J.** and P. A. Windsor (2009). "In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis." Vet J **179**(1): 60-69.
- Windsor, P. A.** and R. J. Whittington (2010). "Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease." Vet J **184**(1): 37-44.
- Wolf, S.**, D. Seiburth, B. Perussia, J. Yetzadale, A. Dandrea and G. Trinchieri (1992). "Cell Sources of Natural-Killer-Cell Stimulatory Factor (Nksf/IL-12) Transcripts and Subunit Expression." Faseb Journal **6**(4): A1335-A1335.
- Wong, P.** and E. G. Pamer (2003). "CD8 T cell responses to infectious pathogens." Annu Rev Immunol **21**: 29-70.
- Woo, S. R.**, J. A. Heintz, R. Albrecht, R. G. Barletta and C. J. Czuprynski (2007). "Life and death in bovine monocytes: the fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Microb Pathog **43**(2-3): 106-113.
- Wood, P. R.**, L. A. Corner, J. S. Rothel, C. Baldock, S. L. Jones, D. B. Cousins, B. S. McCormick, B. R. Francis, J. Creeper and N. E. Tweddle (1991). "Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis." Aust Vet J **68**(9): 286-290.
- Wu, C. W.**, M. Livesey, S. K. Schmoller, E. J. Manning, H. Steinberg, W. C. Davis, M. J. Hamilton and A. M. Talaat (2007). "Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves." Infect Immun **75**(5): 2110-2119.
- Wynne, J. W.**, B. J. Shiell, M. L. Colgrave, J. A. Vaughan, G. Beddome and W. P. Michalski (2012). "Production and proteomic characterisation of purified protein derivative from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Proteome Sci **10**(1): 22.
- Yamamura, M.**, K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom and R. L. Modlin (1991). "Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions." Science **254**(5029): 277-279.
- Yokomizo, Y.**, H. Yugi and R. S. Merkal (1985). "A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis." Nihon Juigaku Zasshi **47**(1): 111-119.
- Yoshimoto, T.**, H. Tsutsui, K. Tominaga, K. Hoshino, H. Okamura, S. Akira, W. E. Paul and K. Nakanishi (1999). "IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13962-13966.
- Zhang, N.** and M. J. Bevan (2011). "CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system." Immunity **35**(2): 161-168.
- Zhang, T.**, K. Kawakami, M. H. Qureshi, H. Okamura, M. Kurimoto and A. Saito (1997). "Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells." Infect Immun **65**(9): 3594-3599.

Zhou, P., C. Streutker, R. Borojevic, Y. Wang and K. Croitoru (2004). "IL-10 modulates intestinal damage and epithelial cell apoptosis in T cell-mediated enteropathy." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(3): G599-604.

Zuniga, J., D. Torres-Garcia, T. Santos-Mendoza, T. S. Rodriguez-Reyna, J. Granados and E. J. Yunis (2012). "Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis." Clin Dev Immunol **2012**: 193923.

Zur Lage, S., R. Goethe, A. Darji, P. Valentin-Weigand and S. Weiss (2003). "Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Mycobacterium avium subspecies avium." Immunology **108**(1): 62-69.

Zurbrick, B. G. and C. J. Czuprynski (1987). "Ingestion and intracellular growth of Mycobacterium paratuberculosis within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages." Infect Immun **55**(7): 1588-1593.

10 Anhang

10.1 Übersicht über verwendete Geräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Lösungen

Tab. 54: Verwendete Geräte.

Gerät / Modell	Firma
7500 Real-Time PCR-System	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Analysenwaage, z.B. Sartorius Präzisions-Laborwaage LA2200S	Sartorius AG, Göttingen
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
Heraeus Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
IKA® MS2 Minishaker zum Durchmischen von Lösungen	IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen
Kühlständer PCR-Cooler (0,2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlständer z.B. IsoPack und Iso Rack Set für 1,5-2 ml Gefäße, -21 °C	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer z. B. RCTbasic IKAMAG® safety control	IKA®-Werke GmbH & CO.KG, Staufen
Mehrkanalpipette Eppendorf Research pro 8-Kanal, variabel, (50-1200 µl, 20-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroplattenphotometer Spectra Fluor	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim
pH-Meter, z.B. inoLab pH Level 2	WTW GmbH, Weilheim
Plattenwaschgerät Skan Washer 300 Version B	Skatron Instruments, Lier, Norwegen
Präzisionspipetten Eppendorf Research (0,1-2,5µl; 0,5-10µl, 10-100µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Goettingen
Vakuumabsaugvorrichtung, z.B. aus der Vacusafe-Reihe	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Zellzähler Beckman Coulter Z2 Cell and Particle Counter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg

Tab. 55: Verwendete Software.

Software	Bezugsquelle
7500 Software v2.0.4	Life Technologies GmbH, Darmstadt
BD FACSDiva™ Software v6.1.3	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
IBM® SPSS® Statistics Version 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
LinRegPCR Version 11.1.	Academic Medical Centre, Amsterdam, NL
Microsoft Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Word 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
STATGRAPHICS Centurion XVI.1	UMEX GmbH Dresden, Dresden

Tab. 56: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
0,2 ml Mikroreaktionsgefäße: z.B. PCR Tubes 0,2 ml (Flat Cap)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen	82-0620-A
1,5 ml Mikroreaktionsgefäße: z.B. Eppendorf Safe-Lock Tubes™	Fa. Eppendorf AG, Hamburg	0030123328
20 G <i>Butterfly</i> Kanülen: Sangocan® V 20 G gelb 120 lang	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nürnberg-Elsenroth	09599140
20 G Kanülen: z.B. BD Microlance™ 3	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg	90280
50 ml Röhrchen: z.B. PP-Test tubes 50ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	227261
Abdeckfolien <i>MicroAmp™, Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt	4311971
Einmalspritzen, steril, 24 ml	Henry Schein VET GmbH, Hamburg	9003305
Einwegspritzen, steril, 2ml: z.B. Injekt® Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	4606027 V
Klebefolien für Microwell™ Platten, Nunc™	VWR International GmbH, Darmstadt	732-2610
Membranadapter <i>Sangocan® IN</i>	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nürnberg-Elsenroth	09599509
Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen, V-Boden	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	651160
Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen, Flachboden	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	655101
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen und Abdeckplatte, Flachboden	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen	662160
Zellkulturplatte <i>MaxiSorp™</i> mit 96 Vertiefungen	VWR International GmbH, Darmstadt	735-0199
Zellkulturplatte <i>Nunclon™</i> mit 96 Vertiefungen und Deckel, Rundboden	Fisher Scientific GmbH, Schwerte	10344311
Pipettenspitzen mit Filter, steril: z.B. <i>TipOne®</i> (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Starlab GmbH, Hamburg	S1121-3810 S1120-1840 S1120-8810 S1126-7810
Pipettenspitzen, unsteril: z.B. <i>epT.I.P.S</i> (20-200 µl, 20-300 µl, 50-1250 µl)	Eppendorf AG, Hamburg	0030000870 0030000897 0030000935
Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen für real-time PCR-Reaktionen: <i>MicroAmp® Optical 96- Well Reaction Plate</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt	N8010560

Tab. 57: Verwendete Reagenzien und Lösungen.

Reagenzien und Lösungen	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
β-Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	28625
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	A9418
Concanavalin A, Typ VI, lyophilisiert; CAS: 11028-71-0	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	C2010-1G
DEPC-behandeltes Wasser	hausteigene Herstellung	
Flüssigmedium <i>RPMI-1640</i> mit L-Glutamin und Phenolrot, steril	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	E15-885
Fötale Kälberserum, steril	Life Technologies GmbH, Darmstadt	10270-106
H ₂ SO ₄ , 98 %; CAS: 7664-93-9	Merck KGaA, Darmstadt	112080
Heparin, zellkulturgetestet	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H-3149
Hepes-Puffer, steril	Biochrom AG, Berlin	L 1613
Lipopolysaccharid (LPS) von E.coli 026:B6, zellkulturgetestet	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	L2654- 1MG
Lymphozytenseparationsmedium: <i>LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium</i>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	J15-004
Penicillin / Streptomycin-Lösung, steril	Biochrom AG, Berlin	A 2212
Primer, nach Sequenz hergestellt	Jena Bioscience GmbH, Jena	
<i>Random Hexamere</i>	Jena Bioscience GmbH, Jena	PM-301L
Rekombinantes bovines IFN-γ	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	PBP001
Rekombinantes bovines IL-10	Moredun Research Institute, Sean Wattegedera, Penicuik, UK	
RLT-Puffer aus dem RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden	74106
RNasin® Plus RNase-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim	N2615
Streptavidin-Horse-Radish- Peroxidase-Konjugat	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	710005
<i>TMB Chromogen Solution (for ELISA)</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt	00-2023

10.2 Übersicht über verwendeten Inokulationsstamm, verwendete Antigene, Antikörper, Kits und Mastermixe

Tab. 58: Verwendete/r Antigene und Inokulationsstamm.

Antigene / Inokulationsstamm	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
BLAg	Tim Bull, St. George`s Hospital, London, UK	
Geflügeltuberkulin PPD	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen	25500
<i>Johnin Purified Protein Derivative</i> , 0,5% Phenol (w/v), für die intradermale Injektion, (1,5mg/ml)	ID-DLO Lelystad, Niederlande	7231436
MAP 1365, MAP 0268c, MAP 3651c ¹	Karen Stevenson, Valerie Hughes; Moredun Research Institute Edinburgh, UK	
MAP-Stamm JII-1961	Isoliert am FLI Jena aus dem Ileozäkal- Lymphknoten eines Rindes	Probennr. 03A 1961

(¹) Für die Verwendung dieser rekombinanten MAP-Proteine zur Restimulation von Zellen des peripheren Blutes oder der Haut mit dem Zweck der Entwicklung einer zellvermittelten Immunantwort ist ein Patent angemeldet (WO 2009/144478 A9).

Tab. 59: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Maus- α -bovin-IFN- γ für den IFN- γ -ELISA	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA2112, Klon CC330
Maus- α -bovin-IFN- γ -Biotin für den IFN- γ -ELISA	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA1783B, Klon CC302
Maus- α -bovin-IL-10 für den IL-10-ELISA	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA2110, Klon CC318
Maus- α -bovin-IL-10-Biotin für den IL-10-ELISA	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA2111B, Klon CC320
Maus- α -bovin-IL-10 / IL-10-Block für die Stimulation	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA2111EL, Klon CC320
Maus-IgG1-negativ-Kontroll-Antikörper / Kontrollantikörper für die Stimulation	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim	MCA1209EL

Tab. 60: Verwendete Kits und Mastermixe.

Kits und Mastermixe	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
ID Screen® Paratuberculosis Indirect	ID Vet, Grabels, Frankreich	PARAS-4P
<i>Omniscript® Reverse Transcriptase Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden	205113
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen GmbH, Hilden	79254
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden	74106
SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt	4309155

10.3 Übersicht über verwendete Puffer und Medien

10.3.1 Puffer und Medien für die Vorbereitung des Inokulums, für die PBMC-Isolation und die Zellkultur

Die zur Herstellung der Puffer verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad oder mindestens rein. Sie wurden von Merck KGaA (Darmstadt) oder neo Lab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg) bezogen. Die Bezugsquellen der Inhaltsstoffe des Zellkulturmediums und des bovinen Serumalbumins finden sich in Tab. 57.

Phosphatgepufferte Salzlösung, abgekürzt: PBS (pH 7,4)

8,0 g	NaCl
3,63 g	Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O
0,24 g	KH ₂ PO ₄
0,20 g	KCl

- ad 1000 ml destilliertes Wasser, lat. *aqua destillata* (Aqua dest.)
- Sterilfiltration durch Membranfilter (Porengröße 0,2 µm)
- Aufbewahrung bei Raumtemperatur

Hanks` Puffer ohne Phenolrot, frei von Ca²⁺ und Mg²⁺ (pH 7,2-7,4)

0,40 g	KCl
0,06 g	KH ₂ PO ₄
8,00 g	NaCl
0,35 g	NaHCO ₃
0,121 g	Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O
1,00 g	D-Glucose

- ad 1000 ml Aqua dest.
- Sterilfiltration durch Membranfilter (Porengröße 0,2 µm)
- Aufbewahrung bei 5°C ± 3°C

Zellkulturmedium

Flüssigmedium RPMI 1640 mit stabilem Glutamin und Phenolrot, mit 10% Fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration: Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 ng/ml) und 10 mM Hepes-Puffer

- Aufbewahrung bei 5°C ± 3°C

10.3.2 Puffer für den IFN- γ - bzw. den IL-10-ELISAPhosphatgepufferte Salzlösung (pH 7,4)

Siehe oben. Sterilfiltration nicht nötig.

Beschichtungspuffer (pH 9,5 – 9,8)

2,15 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$

1,45 g NaHCO_3

- ad 500 ml Aqua dest.
- instabil, keine Aufbewahrung möglich

ELISA-Waschpuffer (pH 7,4)

0,5 ml Tween 20

- ad 1000 ml PBS
- Aufbewahrung bei 4°C, vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen

Blockungspuffer (pH 7,4)

5,0 g bovines Serumalbumin

- ad 1000 ml PBS
- Aufbewahrung bei – 20 °C, vor Gebrauch auf Raumtemperatur anwärmen

Reagenzienverdünnungspuffer (pH 7,4)

5,0 g bovines Serumalbumin

0,5 ml Tween 20

- ad 1000 ml PBS
- Aufbewahrung bei -20 °C, vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen

10.4 Beprobungsplan

Tab. 61: Beprobungsplan. Dargestellt sind die an den jeweiligen Daten untersuchten Kontroll- und Versuchstiere und ihre Zugehörigkeit zu den Versuchsgruppen. (†) kennzeichnet dabei jeweils die letzte Beprobung eines Tieres vor dem Ausscheiden aus dem Versuch.

BT	Datum	Versuchsgruppe	Tiernummern	Anmerkungen
1	26.04.11	K1	29, 30	
		K2	32	
		V1	1, 2, 3	
		V2	4, 6, 7	
		V3	5	
	03.05.11	K1	31	
		K2	33, 34	
		V1	15, 16, 17, 18	
		V2	19, 20†, 21	(1)
	10.05.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V2	10	
		V3	8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	17.05.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	
2	24.05.11	K1	29, 30	
		K2	32	
		V1	1, 2, 3	
		V2	4, 6, 7	
		V3	5	
	31.05.11	K1	31	
		K2	33, 34	
		V1	15, 16, 17, 18	
		V2	19, 21	
	07.06.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V2	10	
		V3	8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	14.06.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	

(1) Zwei Tiere haben vorzeitig den Versuch verlassen. Das Tier 24 ist bereits am 03.04.11, vor Beginn der Blutentnahmen, verendet. Das Tier 20 wurde am 11.05.11 aus Tierschutzgründen euthanasiert und der Sektion zugeführt. In keinem der beiden Fälle konnte MAP ursächlich für die schlechte Verfassung der Tiere zugeordnet werden.

Fortsetzung Tab. 61:

BT	Datum	Versuchsgruppe	Tiernummern	Anmerkungen
3	21.06.11	K1	29, 30	(2)
		K2	32	
		V1	1†, 2†, 3†	
		V2	4, 6, 7	
		V3	5	
	28.06.11	K1	31	
		K2	33, 34	
		V1	15†, 16†, 17†, 18†	
		V2	19, 21	
	05.07.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V2	10	
		V3	8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	12.07.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	
4	19.07.11	K1	29†, 30†	
		K2	32	
		V2	4, 6, 7	
		V3	5	
	26.07.11	K1	31†	
		K2	33, 34	
		V2	19, 21	
	02.08.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V2	10	
		V3	8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	09.08.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	

(2) Die Blutentnahme von Tier 17 wurde wegen des Sektionstermins am 27.06.11 um einen Tag vorgezogen.

Fortsetzung Tab. 61:

BT	Datum	Versuchsgruppe	Tiernummern	Anmerkungen
5	23.08.11	K2	32, 33, 34	(3)
		V2	4, 6, 7, 19, 21	
		V3	5	
	30.08.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V2	10	
		V3	8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	06.09.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	
6	20.09.11	K2	32, 33, 34	(4)
		V2	4†, 6†, 7†, 10†, 19†, 21†	
	27.09.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V3	5, 8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	04.10.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	
7	11.10.11	K2	32†, 33†, 34†	
	25.10.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V3	5, 8, 9	
		V4	11, 12, 13, 14	
	01.11.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22, 23, 25	
		V4	26, 27, 28	
8	22.11.11	K3	35, 36	
		K4	38, 39, 40	
		V3	5†, 8†, 9†	
		V4	11, 12, 13, 14	
	29.11.11	K3	37	
		K4	41, 42, 43, 44	
		V3	22†, 23†, 25†	
		V4	26, 27, 28	

(3) Ab diesem Zeitpunkt wurden die noch im Versuch verbliebenen Tiere aus den ersten beiden Wochen des BT in einer Woche zusammengefasst.

(4) Die Versuchstiere mit den Nummern 5 und 10 wurden im Beprobungsplan und innerhalb der Versuchsgruppen gegeneinander vertauscht. Dies war nötig, da das Tier 10 zu einer Gefahr für das mit ihm umgehende Personal wurde und somit früher der Sektion zugeführt werden musste. In dieser Schrift finden nur die von da an gültigen Zuordnungen Erwähnung.

Fortsetzung Tab. 61:

BT	Datum	Versuchsgruppe	Tiernummern	Anmerkungen
9	20.12.11	K3	35†, 36†, 37†	(5)
		K4	38, 39, 40, 41, 42, 43, 44	
		V4	11, 12, 13, 14, 26, 27, 28	
10	17.01.12	K4	38, 39, 40	(6)
		V4	11†, 12, 13, 14	
	24.01.12	K4	41, 42, 43, 44	
		V4	26, 27, 28	
11	14.02.12	K4	38, 39, 40	
		V4	12, 13, 14	
	21.02.12	K4	41, 42, 43, 44	
		V4	26, 27, 28	
12	13.03.12	K4	38, 39, 40	
		V4	12, 13, 14	
	20.03.12	K4	41, 42, 43, 44	
		V4	26, 27, 28	
13	10.04.12	K4	38†, 39†, 40†	(7)
		V4	12†, 13†, 14†, 26†	
	17.04.12	K4	41†, 42†, 43†, 44†	
		V4	27†, 28†	

(5) Zu diesem Zeitpunkt wurden von allen im Versuch verbliebenen Tieren Blutproben genommen.

(6) Tier 11 wurde frühzeitig der Sektion zugeführt, da das Tier zu einer Gefahr für das mit ihm umgehende Personal wurde.

(7) Die Blutentnahme von Tier 26 wurde wegen des Sektionstermins am 16.04.12 um eine Woche vorgezogen.

10.5 Den Ergebnisteil ergänzende Tabellen

10.5.1 IL-10-Test

Tab. 62: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen. Stimuliert wurde mit APPD (125 I.E./ml), JPPD (4 µg/ml), MAP 1365 (5 µg/ml), und MAP 0268c (5 µg/ml). Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		APPD vs JPPD	APPD vs MAP 1365	APPD vs MAP 0268c	MAP 1365 vs JPPD	MAP 0268c vs JPPD	MAP 0268c vs MAP 1365
Kontrolltiere	BT						
	2	,016					
	4	,469					
	6	,469					
	8	,313	,297	<u>,031</u>	,047	<u>,031</u>	,078
	10	,125	,125	,625	<u>,047</u>	,578	,109
	12	,297	,219	,438	,297	,094	1,000
Versuchstiere	2	,047					
	4	,016					
	6	,156					
	8	1,000	,219	,938	,219	,813	,234
	10	,750	,500	,500	<u>,031</u>	,156	,109
	12	,219	,313	,063	,156	,063	<u>,031</u>

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios des erstgenannten Stimulationsansatzes signifikant höher als die des zweitgenannten Stimulationsansatzes. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

10.5.2 Genexpressionsanalyse

Tab. 63: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen der Mediumkontrolle und den Stimulationsansätzen. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

Inkubation	Stimulans	BT	Kontrolltiere					Versuchstiere				
			IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
1 h	JPPD (4 μ g/ml)	3	,031	,375	,375	,078	,047	,438	,813	,375	,781	,469
		5	,031	,375	,047	,219	,938	,016	,047	,078	,031	,016
		7	,938	,375	,375	,141	,281	,328	,297	,656	,297	,578
		9	,938	,578	,813	,375	,031	,297	,578	,031	,297	,672
		11	,500	,813	,109	,938	,297	,688	1,000	,688	,844	,438
		13	,063	,563	,313	,219	1,000	,688	,313	,625	,438	1,000
	APPD (125 I.E./ml)	3	,578	,578	,219	,016	,016	,813	,297	,688	,984	,016
		5	,578	,047	,813	,031	,016	,016	,047	,578	,016	,016
		7	,813	,047	,469	,078	,297	,688	,109	,297	,031	,297
		9	,438	,563	1,000	,438	,063	,688	,375	,297	,281	,156
		11	1,000	,063	,438	,063	,094	,438	,844	,156	,688	1,000
		13	,156	,063	,313	,063	,156	,813	,625	,813	,625	,313
24 h	JPPD (4 μ g/ml)	3	,469	,109	,375	,031	,219	,813	,016	,578	,031	,031
		5	,031	,016	,016	,047	,078	,813	,016	,688	,313	,016
		7	1,000	,016	,813	,297	,297	,938	,016	,156	,375	,047
		9	1,000	,063	,313	,438	,219	,813	,016	,578	,781	,016
		11	,031	,016	,016	,469	,031	,563	,031	,438	,844	,063
		13	,438	,313	,313	,219	,563	,313	,063	,625	1,000	,063
	APPD (125 I.E./ml)	3	,688	,016	,375	,016	,813	,109	,016	,688	,109	,016
		5	,031	,016	,328	,078	,219	,375	,031	,156	,219	,016
		7	,219	,016	,578	,469	,297	,219	,016	,469	,078	,156
		9	,156	,031	,219	,750	,156	,438	,031	,313	,438	,031
		11	,016	,016	,016	,125	,219	,094	,031	,063	,438	,063
		13	,031	,031	,844	,563	,688	,188	,063	,438	,438	,063

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der stimulierten PBMC signifikant höher als die der Mediumkontrollen. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 64: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den mit JPPD (4 μ g/ml) bzw. mit APPD (125 I.E./ml) stimulierten PBMC. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		Kontrolltiere					Versuchstiere				
	BT	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
1 h Stimulation	3	,219	,938	,109	<u>,031</u>	<u>,031</u>	,688	,219	,469	,375	,297
	5	<u>,031</u>	,469	,078	,234	,156	,719	,109	<u>,016</u>	,219	<u>,016</u>
	7	,938	,688	,109	,813	<u>,016</u>	,219	,813	,297	,266	,688
	9	,063	,313	,094	,313	,844	,078	,969	,578	,375	,688
	11	,094	1,000	,156	,063	,750	,563	,563	,313	,563	,219
	13	,844	,094	,563	,438	<u>,031</u>	,313	,813	1,000	1,000	,438
24 h Stimulation	3	,375	<u>,016</u>	,156	<u>,016</u>	,078	,156	,156	,219	1,000	<u>,031</u>
	5	,469	,109	,469	,219	,406	,219	<u>,016</u>	,078	,094	<u>,047</u>
	7	<u>,047</u>	,109	,813	,578	,813	,219	,156	,813	,063	<u>,016</u>
	9	<u>,031</u>	,094	,563	,313	,438	<u>,031</u>	,438	,563	,219	<u>,031</u>
	11	,109	,219	,578	,469	,141	,156	1,000	1,000	,063	,438
	13	<u>,031</u>	,563	,094	,063	,313	,125	,438	,813	,625	,313

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Δ CT-Werte der mit JPPD stimulierten PBMC signifikant höher als die der mit APPD stimulierten PBMC. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 65: p-Werte beim Vergleich der Ratios für verschiedene Zytokine zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

Stimulans	BT	1 h Inkubationszeit					24 h Inkubationszeit				
		IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α	IL-10	IL-12	IL-18	TGF- β	TNF- α
JPPD (4 μ g/ml)	3	,620	,805	,535	,620	,902	,735	,019	,219	,175	,029
	5	1,000	1,000	,620	,318	,165	,318	,017	,073	,535	,001
	7	,805	,902	,456	,620	,318	,902	,007	,535	1,000	,259
	9	,535	,456	,128	,805	,128	,945	,138	,836	,534	,005
	11	,534	,836	,101	,534	,628	,073	,534	,051	,628	,628
	13	,429	,931	,329	,931	1,000	,329	,017	1,000	,429	,009
APPD (125 I.E./ml)	3	,805	,535	,710	,383	,383	,274	,176	,833	,929	,019
	5	,038	,318	,710	,209	,026	,902	,710	,097	,710	,001
	7	1,000	,209	1,000	,902	,710	,535	,710	,535	,383	,259
	9	,366	,366	,234	1,000	,836	,394	,937	,180	,310	,589
	11	,699	,310	,093	1,000	,240	,138	,005	,001	,945	,836
	13	,329	,429	,662	,931	,931	,429	,017	,792	,329	,017
ConA (10 μ g/ml)	3	,101	,731	,295	1,000	,628	,136	,274	,175	,559	,273
	5	,165	,318	,902	,318	,128	,259	,710	,383	,097	,902
	7	,535	,318	,620	,456	,209	,097	,097	,805	1,000	,805
	9	,366	,234	,051	,445	1,000	,394	,065	,699	,937	,699
	11	,310	,589	,394	,937	,699	,836	,836	,628	,628	1,000
	13	,329	,537	,429	,429	,030	,548	,222	,690	,421	,841
LPS (1 μ g/ml)	3	,295	,445	,731	,945	,731	,336	,648	,737	,831	,476
	5	,805	,097	,710	,805	,456	,535	,383	,456	,805	,318
	7	,383	,053	,805	,902	,902	,366	,138	,836	,945	,836
	9	,366	,589	,818	,310	,818	,628	,181	,138	,589	,234
	11	,485	,310	,394	,937	,818	,945	,181	,234	,445	,731
	13	1,000	1,000	,792	,662	,792	,082	,177	,662	,247	,429

IL-12 = IL-12p40.

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die Ratios der Versuchstiere signifikant höher als die der Kontrolltiere. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

10.5.3 Quantifizierung der Aktivierungsmolekül-Expression

Tab. 66 A/B: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den Versuchsgruppen. A: Versuchstiere; B: Kontrolltiere. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

A

				p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen den Versuchsgruppen			
		BT	CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		
Testgruppe 1	Testgruppe 2		CD25	CD26	CD25	CD26	
Mediumkontrolle	V1	V2	3	,699	,589	,937	,699
	V1	V3	3	,818	,937	,818	,937
	V2	V3	3	,818	,818	,937	,589
			4	,905	,714	,548	,714
			5	1,000	<u>,026</u>	,818	,937
			6	<u>,002</u>	<u>,002</u>	<u>,002</u>	<u>,002</u>
	V3	V4	7	,792	,931	,247	,247
			8	,257	,257	,171	,610
JPPD (4 µg/ml)	V1	V2	3	,699	,818	1,000	,699
	V1	V3	3	1,000	1,000	,699	,485
	V2	V3	3	,310	,937	,310	,699
			4	,548	1,000	,714	,905
			5	1,000	,699	,589	,699
			6	,818	,937	,699	,394
	V3	V4	7	,931	,429	,537	,662
			8	,914	,762	,914	,114
ConA (1,5 µg/ml)	V1	V2	3	,240	,310	,394	,132
	V1	V3	3	,310	,132	,240	,240
	V2	V3	3	<u>,004</u>	<u>,026</u>	<u>,015</u>	<u>,041</u>
			4	,548	,548	,714	,905
			5	,818	,485	<u>,041</u>	,818
			6	1,000	<u>,002</u>	,937	<u>,002</u>
	V3	V4	7	,931	,126	1,000	,571
			8	,762	,257	,610	,114

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die MdFI-Werte der Testgruppe 2 signifikant höher als die der Testgruppe 1. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 66: (Fortsetzung)**B**

			p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen den Versuchsgruppen				
			CD4 ⁺ CD45RO ⁺		CD8 ⁺ CD45RO ⁺		
Testgruppe 1	Testgruppe 2	BT	CD25	CD26	CD25	CD26	
Mediumkontrolle	K1	K2	3	,400	,700	,700	1,000
			4	,100	,200	,100	,200
	K1	K3	3	,700	1,000	1,000	,700
			4	,400	,400	,200	,200
	K2	K3	3	1,000	1,000	,700	,700
			4	,800	1,000	,800	,800
			5	1,000	,700	1,000	,400
			6	,100	,100	,100	,100
		7	,700	,700	,400	,700	
	K2	K4	7	1,000	,629	,229	,057
K3	K4	7	,229	,629	,229	,400	
		8	1,000	,517	,183	,517	
JPPD (4 µg/ml)	K1	K2	3	1,000	,100	,700	,100
			4	,700	,400	,200	,700
	K1	K3	3	1,000	,200	,200	,400
			4	,800	,400	,200	,200
	K2	K3	3	,700	,400	,400	,100
			4	,200	,800	,200	,800
			5	,700	,700	,100	,100
			6	,200	,200	,100	,200
		7	1,000	1,000	,400	1,000	
	K2	K4	7	,229	,400	,114	,057
K3	K4	7	,400	,400	,629	,629	
		8	1,000	,517	,833	,517	
ConA (1,5 µg/ml)	K1	K2	3	1,000	1,000	,700	1,000
			4	,200	,700	,700	,400
	K1	K3	3	1,000	,100	1,000	,200
			4	,800	,800	,800	,200
	K2	K3	3	1,000	,100	1,000	,100
			4	,800	1,000	,800	,400
			5	1,000	,700	1,000	,200
			6	,700	,100	,200	,100
		7	,200	,200	,400	,400	
	K2	K4	7	,229	,114	,114	,114
K3	K4	7	,857	,571	,400	,857	
		8	,833	,383	,667	,267	

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die MdFI-Werte der Testgruppe 2 signifikant höher als die der Testgruppe 1. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

Tab. 67: p-Werte beim Vergleich zwischen den MdFI-Werten für den Nachweis von CD25 und den MdFI-Werten für den Nachweis von CD26. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Wilcoxon-Test).

		p-Werte beim Vergleich zwischen MdFI Werten für den Nachweis von CD25 und für CD26					
		CD4 ⁺ CD45RO ⁺			CD8 ⁺ CD45RO ⁺		
		Medium- kontrolle	ConA (1,5 µg/ml)	JPPD (4 µg/ml)	Medium- kontrolle	ConA (1,5 µg/ml)	JPPD (4 µg/ml)
Kontrolltiere	BT						
	3	,043	,004	,004	,027	,004	,004
	4	,148	,008	,016	,109	,008	,016
	5	,063	,031	,063	,844	,031	,031
	6	,219	,031	,313	,688	,031	,563
	7	,131	,002	,006	<u>,004</u>	,002	,064
	8	,010	,002	,002	,625	,002	,020
	10	,016	,016	,016	<u>,047</u>	,016	,156
	11	,250	,250	,250	,500	,250	,500
	12	,250	,250	,250	,250	,250	,500
	13	,125	,125	,125	,625	,125	,125
Versuchstiere	3	,005	,000	,000	,005	,000	,000
	4	,039	,004	,004	,020	,004	,008
	5	,077	,000	,000	,064	,000	,001
	6	,157	,000	,005	,016	,000	,005
	7	,966	,001	,024	,966	,001	,007
	8	,492	,002	,004	<u>,049</u>	,002	,002
	10	1,000	,031	,094	,094	,031	,063
	11	1,000	,250	,500	,250	,250	,500
	12	,500	,250	,250	,250	,250	,250
	13	,125	,125	,625	1,000	,125	,125

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 signifikant höher als die für den Nachweis von CD26. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

10.5.4 Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern

Tab. 68 A/B: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios im IFN- γ -Test (A) bzw. der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 (B) zwischen PBMC der Kurz- und der Dauerausscheider. Dargestellt ist die exakte Signifikanz (zweiseitig; Mann-Whitney-U-Test).

A

BT	Anzahl untersuchter Tiere (n)		p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios zwischen Kurz- und Dauerausscheidern			
	Kurz-ausscheider	Dauer-ausscheider	Medium-kontrolle	JPPD 4 μ g/ml	APPD 125 I.E./ml	ConA 20 μ g/ml
1	7	13	,877	,473	,862	,211
2	8	13	<u>,005</u>	,043	,030	,037
3	8	13	,916	,697	,697	,804
4	6	10	,313	,689	,875	,875
5	6	10	,792	<u>,022</u>	<u>,031</u>	<u>,016</u>
6	6	10	<u>,042</u>	<u>,031</u>	<u>,001</u>	<u>,031</u>
7	2	9	,436	,327	,436	,727
8	2	9	,727	,218	,473	,145
9	1	5	,333	,333	1,000	,667
10	1	5	,333	,667	1,000	,333
11	1	4	1,000	1,000	,400	,400
12	1	4	,800	,800	1,000	,400
13	1	4	,800	,400	,800	,400

B

BT	Anzahl untersuchter Tiere (n)		p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte zwischen Kurz- und Dauerausscheidern			
	Kurz-ausscheider	Dauer-ausscheider	CD4 ⁺ CD45 ⁺		CD8 ⁺ CD45 ⁺	
			CD25	CD26	CD25	CD26
Mediumkontrolle	3	7	,955	,281	1,000	,536
	4	4	,343	,486	,686	,486
	5	5	,690	,310	1,000	,841
	6	5	,095	,095	,151	,222
	7	1	,889	,667	,667	,889
	8	1	,889	,889	,444	,444
	10	1	1,000	,400	,400	,800
JPPD (4 μ g/ml)	12	1	,667	1,000	1,000	1,000
	3	7	,867	1,000	,397	1,000
	4	4	1,000	,886	,686	1,000
	5	5	,421	,690	,841	1,000
	6	5	,222	,421	,310	,310
	7	1	,444	,667	,444	,667
	8	1	,889	,667	,889	,222
	10	1	,800	,800	1,000	,800
	12	1	,667	1,000	,667	,667

Grau hinterlegt sind Werte innerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($p \leq 0,05$). Soweit nicht anders gekennzeichnet, sind die S/P-Ratios der Kurzausscheider signifikant höher als die der Dauerausscheider. Unterstrichen sind Fälle, in denen das Gegenteil der Fall ist.

11 Abbildungsverzeichnis

11.1 Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchablaufs.	37
Abb. 2: Schematische Darstellung der Tiergruppeneinteilung.	39
Abb. 3: Identifizierung der Lymphozyten anhand ihrer Größe und Granularität.	61
Abb. 4: Anlegen der Grenzen des <i>gate P5</i> an die Zell- bzw. Sekundärantikörper-kontrolle.	62
Abb. 5: Schematische Darstellung der Charakterisierung von Teilgruppen.	67
Abb. 6: IFN- γ -Freisetzung der Mediumkontrolle und von JPPD-stimulierten PBMC bei verschiedenen Gruppen von Versuchstieren in Abhängigkeit vom BT.	78
Abb. 7: IFN- γ -Freisetzung der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT.	79
Abb. 8: IFN- γ -Freisetzung von mit JPPD, APPD bzw. MAP 3651c stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT. Kontrolltiere und Versuchstiere.	84
Abb. 9: IFN- γ -Freisetzung von JPPD- bzw. MAP 3651c-stimulierten PBMC und der Mediumkontrolle einzelner Versuchstiere in Abhängigkeit vom BT.	85/86
Abb. 10: IL-10-Freisetzung der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT.	93
Abb. 11: IL-10-Freisetzung von der Mediumkontrolle und von LPS-stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	95
Abb. 12: IL-10-Freisetzung der durch JPPD, APPD, MAP 1365, bzw. MAP 0268c stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	98
Abb. 13: Genexpression von IL-10, IL-12p40, IL-18, TGF- β und TNF- α in der Mediumkontrolle (jeweils Inkubation für 1 h bzw. 24 h) in Abhängigkeit vom BT.	107-111
Abb. 14: Genexpression von IL-10, IL-12p40, IL-18, TGF- β und TNF- α der für 24 h mit JPPD bzw. APPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	119-123
Abb. 15: Expression von CD26 auf unstimulierten CD4 ⁺ Gedächtniszellen von Kontroll- und Versuchstieren in einem Streudiagramm.	126
Abb. 16: Expression von CD25 auf CD4 ⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT.	129
Abb. 17: Expression von CD25 auf CD8 ⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT.	130
Abb. 18: Expression von CD26 auf CD4 ⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT.	131
Abb. 19: Expression von CD26 auf CD8 ⁺ Gedächtniszellen in der Mediumkontrolle bzw. nach Stimulation mit ConA in Abhängigkeit vom BT.	132

Abb. 20: Expression von CD25 auf CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Gedächtniszellen nach Stimulation mit JPPD in Abhängigkeit vom BT.	135
Abb. 21: Expression von CD26 auf CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Gedächtniszellen nach Stimulation mit JPPD in Abhängigkeit vom BT.	136
Abb. 22: IFN- γ -Freisetzung der mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	143
Abb. 23: IFN- γ -Freisetzung der mit APPD bzw. ConA stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	145
Abb. 24: Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten CD4 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	146
Abb. 25: Expression von CD25 bzw. CD26 auf unstimulierten CD8 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	147
Abb. 26: Expression von CD25 bzw. CD26 auf mit JPPD stimulierten CD4 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	148
Abb. 27: Expression von CD25 bzw. CD26 auf mit JPPD stimulierten CD8 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	149
Abb. 28: IFN- γ -Freisetzung der mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	150
Abb. 29: IL-10-Freisetzung der mit JPPD bzw. APPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	153
Abb. 30: Genexpression von IL-18 in der Mediumkontrolle in Abhängigkeit vom BT.	154
Abb. 31: Genexpression von IL-18 in für 1 h bzw. 24 h mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	155
Abb. 32: Genexpression von IL-10 und IL-12p40 in mit JPPD stimulierten PBMC in Abhängigkeit vom BT.	156
Abb. 33: Expression von CD25 auf mit JPPD stimulierten CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	157
Abb. 34: Expression von CD26 auf mit JPPD stimulierten CD4 ⁺ bzw. CD8 ⁺ Gedächtniszellen in Abhängigkeit vom BT.	158
Abb. 35: Zeitstrahl der Befunde bei den Versuchstieren.	160
Abb. 36: Gemeinsame Darstellung der zeitlichen Verläufe der Freisetzung von IFN- γ (S/P-Ratio) und der Genexpression von IL-12p40 und TNF- α (Δ CT) von mit JPPD (4 μ g/ml) stimulierten PBMC (Versuchstiere).	161

11.2 Tabellen

Tab. 1: Einteilung der Tiere in Versuchsgruppen (VGr) sowie tierbezogene Daten.	40
Tab. 2: Ermittelte Koloniebildende Einheiten (KBE) pro mg BFM bzw. KBE pro verabreichter Inokulationsdosis.	42
Tab. 3: Stimulationsansätze, Inkubationszeiten und verwendete Konzentrationen.	48
Tab. 4: Anzahl und Versuchsgruppen-Zugehörigkeit der mittels Durchflusszytometrie untersuchten Tiere.	50
Tab. 5: Antikörper für die Immundekoration.	51
Tab. 6: Zusammensetzung der Mastermixe für die reverse Transkription.	55
Tab. 7: Verwendete Primer mit Zielgen, <i>Accessionnumbers</i> , Sequenzen, Endkonzentrationen der Primer im PCR-Ansatz und Referenzen.	56
Tab. 8: Temperaturstadien während der real-time PCR und Schmelzkurven-Analyse.	57
Tab. 9: Erwartungswerte für den Höhepunkt der Schmelzkurve.	59
Tab. 10: Gegenüberstellung von Beprobungsturnus, Wochen <i>p.i.</i> und dem Alter der Tiere.	65
Tab. 11: Bewertung der Korrelation anhand des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman.	67
Tab. 12: Kultureller MAP-Nachweis in Kotproben von Versuchstieren.	69
Tab. 13: Nachweis MAP-spezifischer Antikörper im Serum von Versuchstieren.	70
Tab. 14: Richtig-Positiv-Rate beim kulturellen MAP-Nachweis in Kotproben bzw. beim Nachweis der MAP-spezifischen Antikörperreaktion in Abhängigkeit vom BT.	71
Tab. 15 : Kultureller Nachweis von Mykobakterien in Proben aus dem Darmtrakt und aus darm-assoziiertem Lymphgewebe bei Kontroll- und Versuchstieren.	73
Tab. 16 : Kultureller Nachweis von Mykobakterien in Proben von nicht darm-assoziierten Lokalisationen bei Kontroll- und Versuchstieren.	74
Tab. 17: Einflüsse der Plattenchargen, Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der S/P-Ratios der internen Kontrolle im IFN- γ -ELISA.	76
Tab. 18: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen Tieren, deren Rangordnung vor Probenahme beeinflusst bzw. Tieren, deren Rangordnung vor Probenahme unbeeinflusst war.	77
Tab. 19: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios von Mediumkontrollen für den Nachweis von IFN- γ zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren.	80
Tab. 20: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen mit ConA (20 μ g/ml) stimulierten PBMC und der Mediumkontrolle.	81
Tab. 21: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ nach ConA-Stimulation (20 μ g/ml) zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	81

Tab. 22: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen und der Mediumkontrolle.	82
Tab. 23: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen mit JPPD, APPD bzw. MAP 3651c bei Versuchstieren.	83
Tab. 24: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren.	87
Tab. 25: p-Werte beim Vergleich der SI-Werte für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren. Testung zwischen Tieren eines BT und Testung zwischen altersgleichen Tieren.	88
Tab. 26A/B: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen mit JPPD. A: Kontrolltiere; B: Versuchstiere.	89
Tab. 27: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IFN- γ zwischen den Stimulationsansätzen mit JPPD und der Mediumkontrolle.	90
Tab. 28: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten des IFN- γ -Tests bei Auswertung auf Grundlage von S/P-Ratios bzw. SI-Werten verschiedener Stimulationsansätze.	91
Tab. 29: Einflüsse der Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der S/P-Ratios der internen Kontrolle im IL-10-ELISA.	92
Tab. 30: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios der Mediumkontrolle für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen BT.	94
Tab. 31: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 nach LPS-Stimulation (5 μ g/ml) zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	96
Tab. 32: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 zwischen den Stimulationsansätzen und der Mediumkontrolle.	96
Tab. 33: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 von mit JPPD bzw. mit APPD stimulierten PBMC zwischen verschiedenen BT.	99
Tab. 34: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios bzw. der SI-Werte zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	100
Tab. 35: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten des IL-10-Tests bei Auswertung auf Grundlage von S/P-Ratios bzw. SI-Werten verschiedener Stimulationsansätze.	101
Tab. 36: Einflüsse der Tagesansätze, Einzelplatten und technischen Replikate einer Probe auf die Varianz der CT-Werte der internen Kontrolle in der real-time PCR.	102
Tab. 37A/B: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen Mediumkontrollen und Stimulationsansätzen (A) und zwischen der Stimulation für 1 h und der für 24 h (B).	103/104
Tab. 38: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	104

Tab. 39: p-Werte beim Vergleich der CT-Werte für den Nachweis von GAPDH zwischen verschiedenen BT.	105
Tab. 40: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	106
Tab. 41: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte der Mediumkontrolle für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen Zeitpunkten.	112
Tab. 42: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den für 1 h inkubierten und den für 24 h inkubierten PBMC.	113
Tab. 43: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen der Mediumkontrolle und den mit ConA bzw. LPS stimulierten PBMC.	114
Tab. 44: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	115
Tab. 45: Medianwerte der <i>Ratios</i> untersuchter Zytokine für die Stimulationsansätze mit JPPD und APPD, in Symbolen kodiert dargestellt.	117
Tab. 46: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten bei Auswertung auf Grundlage von Δ CT-Werten und <i>Ratios</i> für den Nachweis von IL-12p40 bzw. TNF- α nach JPPD-Stimulation (4 μ g/ml).	124
Tab. 47: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den Mediumkontrollen der Kontroll- und der Versuchstiere.	127
Tab. 48: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen stimulierten Proben und den Mediumkontrollen.	128
Tab. 49: p-Werte beim Vergleich der MdFI- bzw. MdFI _Q -Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den mit ConA stimulierten PBMC der Kontroll- und der Versuchstiere.	133
Tab. 50: p-Werte beim Vergleich der MdFI- bzw. MdFI _Q -Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den mit JPPD stimulierten PBMC der Kontroll- und der Versuchstiere.	137
Tab. 51: Richtig-Negativ- und Richtig-Positiv-Raten bei Differenzierung auf Grundlage von MdFI- bzw. MdFI _Q -Werten für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Gedächtniszellen nach JPPD-Stimulation (4 μ g/ml).	139
Tab. 52: Einteilung der Versuchstiere in Teilgruppen, basierend auf ihren Befunden hinsichtlich ihrer Ausscheidung von, ihrer Immunantwort auf bzw. ihrer Besiedelung mit MAP.	142
Tab. 53: Spearmans Rho beim Vergleich verschiedener Parameter der zellulären Immunität, nach JPPD-Stimulation und innerhalb der Versuchstiere.	162
Tab. 54: Verwendete Geräte.	235
Tab. 55: Verwendete Software.	235
Tab. 56: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	236
Tab. 57: Verwendete Reagenzien und Lösungen.	237
Tab. 58: Verwendete/r Antigene und Inokulationsstamm.	238

Tab. 59: Verwendete Antikörper.	238
Tab. 60: Verwendete Kits und Mastermixe.	238
Tab. 61: Beprobungsplan.	241-244
Tab. 62: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios für den Nachweis von IL-10 zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen.	245
Tab. 63: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen der Mediumkontrolle und den Stimulationsansätzen.	246
Tab. 64: p-Werte beim Vergleich der Δ CT-Werte für den Nachweis von verschiedenen Zytokinen zwischen den mit JPPD (4 μ g/ml) bzw. mit APPD (125 I.E./ml) stimulierten PBMC.	247
Tab. 65: p-Werte beim Vergleich der Ratios für verschiedene Zytokine zwischen den Kontroll- und den Versuchstieren.	248
Tab. 66 A/B: p-Werte beim Vergleich der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 zwischen den Versuchsgruppen. A: Versuchstiere; B: Kontrolltiere.	249/250
Tab. 67: p-Werte beim Vergleich zwischen den MdFI-Werten für den Nachweis von CD25 und den MdFI-Werten für den Nachweis von CD26.	251
Tab. 68 A/B: p-Werte beim Vergleich der S/P-Ratios im IFN- γ -Test (A) bzw. der MdFI-Werte für den Nachweis von CD25 bzw. CD26 (B) zwischen PBMC der Kurz- und der Dauer- ausscheider.	252

Danksagungen

Zuallererst gilt mein Dank den Förderern des Forschungsprojekts, die dieses erst in diesem Umfang möglich gemacht haben. Die Unterstützung durch die Tierseuchenkassen von Thüringen, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg sowie durch die H. Wilhelm Schaumann Stiftung war essentiell für die Durchführung der Studie sowie für die sorgfältige Datenanalyse und Ausarbeitung dieser Dissertationsschrift.

Mein besonderer Dank gilt aber auch denen, die mich bei der Bearbeitung dieses Projekts betreut und angeleitet haben: Frau Dr. Heike Köhler und Herr Prof. Dr. Christian Menge standen mir während der gesamten Entstehung dieser Dissertationsschrift als wertvolle Ratgeber zur Seite. Ich danke ihnen sehr für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die fruchtbaren, fachlichen Diskussionen, ihre Unterstützung für meine Ideen und für jede persönliche Ermunterung diese und meinen Weg zu verfolgen.

Ebenfalls für den fachlichen Austausch danken möchte ich Frau Dr. Sabine Hammer vom Institut für Immunologie der veterinärmedizinischen Universität Wien, die mir hilfreiche Literatur zur Verfügung stellte und damit dazu beitrug, die Auswertung der real-time PCR zu optimieren.

Die Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift wäre weiterhin in dieser Form nicht möglich gewesen ohne die Betreuung der Tiere durch die Mitarbeiter der tierexperimentellen Einheit des Friedrich-Loeffler-Instituts, sowie durch Frau Dr. Heike Köhler und Frau Sina Fischer. Für die Charakterisierung des Krankheitsverlaufs wesentliche Daten wurden dankenswerterweise von Frau Sandy Werner (Durchführung und Auswertung der kulturellen Anzucht von MAP aus Organproben) und Frau Beate Burkert (Durchführung und Auswertung des Nachweises MAP-spezifischer Serum-Antikörper mittels ELISA) erhoben. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Katharina Kerner, die die Untersuchungen am Durchflusszytometer vorgenommen hat und mir bei Fragen bezüglich der Auswertung gerne bei Seite stand, sowie Frau Nancy Hertig, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unter meiner Anleitung einen Teil der Proben für die real-time PCR aufbereitet und für diese auch die real-time PCR durchgeführt hat.

Aber auch den anderen KollegInnen des Friedrich-Loeffler-Instituts gebührt mein Dank für so manches aufbauende Gespräch, bzw. für jeden guten Ratschlag. Dies gilt in besonderem Maße für Katharina Sobotta, Steffi Wilsky, Katharina Kerner und Carola Ostermann.

Nicht zuletzt sei meiner Familie und meinen Freunden gedankt. Eure Geduld mit mir und euer wertvolles Feedback zu meiner Arbeit haben nicht unwesentlich dazu beigetragen, dass diese Dissertationsschrift nun in dieser Form vor euch liegt.

Danke.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.