

**Effekte von verschiedenen Futterzusatzstoffen
auf eine porcine Darmepithelzelllinie (IPEC-J2)
sowie
auf das Immunsystem von Ferkeln nach einer PRRSV Impfung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Speiser

Diplom Trophologin
aus Memmingen, Deutschland

Berlin 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 2011 bis Juli 2014 am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek und im Oktober 2012 am Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe der Vetmeduni Vienna in Wien unter Anleitung von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Armin Saalmüller durchgeführt.

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hans-Joachim Pflüger

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek

Disputation am: 15. 12. 2014

WIDMUNG

In Erinnerung an meinen Großvater

Josef Gutmann

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an

... Herrn Professor Dr. Zentek und Herrn Professor Dr. Melzig für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Tierernährung und am Institut für Pharmazie durchzuführen.

... Frau P. Huck, Frau K. Fiedler und Frau M. Eitingen für ihre umfangreiche Hilfe und Unterstützung während meiner Zellkultur- und Fütterungsversuche sowie für die Beantwortung jeglicher labortechnischer Fragen.

... das gesamte Team des Instituts für Tierernährung der Freien Universität Berlin, insbesondere Herrn Professor Dr. K. Männer, Frau Dr. L. Tedin, Frau Dr. C. Krämer, Frau C. Schmidt, Frau I. Bebert, Herrn F. Spitzer, Frau E. Schulze, Frau Dr. C. Villodre und im besonderen Frau Dr. B. Martinez für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Fütterungsversuchen.

... Frau Dr. A. Mader für die moralische und vor allem umfangreiche Hilfe bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Danke Anne, du bist großartig!

... Herrn Dr. L. Richter und Frau C. Schuh vom TGD Bayern e.V. für die Organisation der Blutproben.

... Herrn Professor Dr. A. Saalmüller und Frau M. Stadler für die herzliche Aufnahme an der Vetmed Uni Vienna und das Erlernen der ELISpot Methode insbesondere aller weiteren hilfreichen Ratschläge.

... Herrn K. Stadler von der Firma Boehringer Ingelheim Veterinary Research Center GmbH & Co. KG für die Bereitstellung des Impfstoffes und die Auswertung der Proben sowie den Firmen BIOMIN Holding GmbH und Veracus GmbH für die Bereitstellung der Futterzusatzstoffe.

DANKSAGUNG

... das COMET (Competence Centers for Excellent Technologies) Förderungsprojekt insbesondere dem K-Projekt für die finanzielle Unterstützung und die vielen dazugewonnenen und wertvollen Erfahrungen.

...all meiner großartigen Freunde für die Unterstützung jeglicher Lebenssituationen, sei es persönlich oder am Telefon.

... meiner Familie. Ohne eure moralische Unterstützung und kleinen „Fausthiebe“ während meines gesamten Studiums einschließlich Doktorarbeitszeit, hätte ich es nicht geschafft. Danke für Euer Durchhaltevermögen und den Glauben an meine Person.

... an eine ganz bestimmte Person.

Danke für deine Gelassenheit, Unterstützung sowie deine aufbauenden und liebevollen Worte. Alleine schaffen wir so einiges, doch gemeinsam schaffen wir alles. Danke!

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Bedeutung von Futterzusatzstoffen und anderen Substanzen als Ersatz für antibiotische Leistungsförderer zur Sicherung der Schweinegesundheit	2
2.1.1. Schweinehaltung als Wirtschaftsfaktor	2
2.1.2. Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung	2
2.2. Einsatz von natürlichen Futterzusatzstoffen als Ersatz für antibiotische Leistungsförderer und deren Wirkung auf die Schweinegesundheit	3
2.2.1. Antimikrobielle Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen	3
2.2.2. Ernährungsphysiologische Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen	6
2.2.3. Immunstimulierende Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen	8
2.3. <i>Escherichia coli</i> als Durchfallerreger beim Schwein	10
2.4. Darmassoziiertes Immunsystem des Ferkels	12
2.4.1. Aufbau des Immunsystems	12
2.4.2. Immunphänotypische Einteilung der Zellen	15
2.5. Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom (PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)	19
2.5.1. Ätiologie und Pathogenese des PRRS	19
2.5.2. Immunreaktion auf eine PRRSV Infektion	20
2.5.3. PRRSV Impfung	22
2.6. IPEC-J2 Zellen	24
2.6.1. Morphologie, Gen- und Proteinexpression	24
2.6.2. Verwendung als Infektionsmodell	30
2.7. Ziel der Arbeit	32

INHALTSVERZEICHNIS

3.	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1.	<i>In vitro</i> Untersuchungen	33
3.1.1.	Einfluss der Testsubstanzen auf den TEER	39
3.1.2.	Einfluss der Testsubstanzen auf die Interaktion zwischen <i>E. coli</i> und dem TEER einer IPEC-J2 Zelllinie	40
3.2.	Fütterungsversuch	41
3.2.1.	Tierexperimentelle Methoden	41
3.2.2.	Futtermitteluntersuchung	45
3.2.3.	Bestimmung der Rohnährstoffe (Weender Analyse)	46
3.2.4.	Mineralstoffbestimmung	47
3.2.5.	Versuchsdurchführung	48
3.2.6.	Immunologische Methoden	50
3.3.	Statistische Auswertung	62
4.	ERGEBNISSE	63
4.1.	<i>In vitro</i> Untersuchungen	63
4.1.1.	Einfluss auf die Interaktion zwischen einem enterotoxischen <i>E. coli</i> Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie mittels Bestimmung des TEER	63
4.1.2.	Einfluss von Extrakten auf den Transepithelialen Elektrischen Widerstand (TEER) einer IPEC-J2 Zelllinie	64
4.1.3.	Einfluss der Testsubstrate (6 und 24h Einwirkzeit) auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enterotoxischen <i>E. coli</i> Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie mit Bestimmung des TEER	66
4.2.	Fütterungsversuch	67
4.2.1.	Leistungsparameter	67
4.2.2.	Hämatologische und immunologische Parameter	69
5.	DISKUSSION	76
5.1.	Kritik der Methoden	76
5.1.1.	<i>In vitro</i> Untersuchungen	76
5.1.2.	<i>In vivo</i> Untersuchungen	81

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.	<i>In vitro</i> Untersuchungen	83
5.2.1.	Einfluss der biologischen Substanzen auf die Adhäsion eines enteropathogen <i>E. coli</i> Stammes auf eine IPEC-J2 Zelllinie	83
5.3.	Fütterungsversuch	88
5.3.1.	Hämatologische und immunologische Parameter	90
6.	PERSPEKTIVE	94
7.	ZUSAMMENFASSUNG	95
8.	SUMMARY	97
	LITERATURVERZEICHNIS	99
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	129
	TABELLENVERZEICHNIS	132
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	137
	ANHANG	140
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	145

EINLEITUNG

1. EINLEITUNG

Die frühe Absetzphase von der Muttersau stellt in der Entwicklung von Ferkeln eine kritische Zeit dar, die sich stark auf das tierische Allgemeinbefinden auswirken kann. Neben Veränderungen in der Gruppierung und im räumlichen Bereich müssen sich Ferkel mit neuen hygienischen Umweltfaktoren auseinandersetzen. Auch an eine Futterumstellung, die für eine Veränderung des Verdauungsprozesses sorgt, müssen sich die Tiere adaptieren (Lallés et al., 2007; Pluske et al., 1997; Stokes et al., 2004).

Durch den Muttermilchentzug fehlen immunologische Schutzfaktoren, deren Mangel das noch nicht vollständig entwickelte Immunsystem schwer ausgleichen kann (Stokes et al., 2004). Demgemäß gewinnt die Suche nach Futterzusatzstoffen mit protektiver Wirkung zunehmend an Bedeutung.

In den letzten Jahren wurden Probiotika, Präbiotika und zahlreiche natürliche Substanzen untersucht, bei deren Einsatz neben antimikrobiellen und immunmodulierenden auch metabolische Effekte beobachtet wurden. Auch eine antiadhäsive Wirkung gegen pathogene Bakterienstämme wie *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte in einer porzinen Epithelzelllinie festgestellt werden (Mader, 2011).

Neben gastrointestinalen Infektionskrankheiten können respiratorische Erkrankungen bei der Aufzucht und Mast von Schweinen zu großen wirtschaftlichen Einbußen führen (Thacker, 2001). Ein wichtiger Auslöser für Atemwegerkrankungen und Reproduktionsstörungen ist das Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), zu dessen Vorbeugung häufig eine Impfung der Ferkel im Alter von 3 Wochen durchgeführt wird (Elicker und Sipos, 2009; Martinez et al., 2009; Palzer et al., 2007).

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Futtermittelinhaltsstoffe einen Einfluss auf Immunreaktionen, zum Beispiel gegenüber Rotaviren beim Ferkel, besitzen (Hester et al., 2013). Ob Futtermittelinhaltsstoffe einen Einfluss auf die PRRSV Immunisierung haben, wurde dahingegen in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die Adhäsion pathogener *E. coli* an porzinen Darmepithelzellen untersucht. Desweiteren wurde in einem Fütterungsversuch getestet, ob verschiedene Futterzusätze nach einer PRRSV Impfung einen Effekt auf das Immunsystem von Absetzferkeln bewirken.

LITERATUR

2. LITERATUR

2.1. Bedeutung von Futterzusatzstoffen und anderen Substanzen als Ersatz für antibiotische Leistungsförderer zur Sicherung der Schweinegesundheit

2.1.1. Schweinehaltung als Wirtschaftsfaktor

Deutschland ist mit einem Marktanteil von fast 20% der größte Schweinefleischproduzent in der EU (GermanMeat, 2011). Im weltweiten Vergleich liegt es hinter China und den USA auf Platz 3. Die Fleischerzeugung ist in Deutschland ein äußerst wichtiger Wirtschaftsfaktor. Vor allem in ländlichen Regionen ist die deutsche Fleischerzeugungskette ein wichtiger Arbeitgeber. Am Umsatz der Ernährungsindustrie belegt die Fleischbranche den größten Anteil. Rund 60% der Erlöse stammen aus dem Verkauf von Erzeugnissen tierischer Herkunft, wobei das Schwein der Hauptfleischlieferant ist (GermanMeat, 2011).

Große Verluste und Kosten in der Ferkelaufzucht oder Mast entstehen durch Erkrankungen inklusive der damit einhergehenden Leistungsdepressionen und assoziierten Probleme. Die medizinische Behandlung dieser Krankheiten führt zu hohen Ausgaben in der Schweinefleischproduktion. Eine Investition in eine optimierte Fütterung könnte sich positiv auf die Futtermittelverwertung oder verminderte Tageszunahmen auswirken, damit die Gesundheit stabilisieren und eventuell krankheitsbedingte Behandlungskosten senken (Hörügel, 2004; Sundrum, 2004).

Insbesondere mit dem EU-weiten Verbot, antibiotische Leistungsförderer in der Tierernährung einzusetzen, wurde es immer bedeutender, geeignete Futtermittel und Futterzusatzstoffe zu finden, die sich positiv auf die Tiergesundheit und Leistung auswirken (VO (EG) Nr. 1831/2003).

2.1.2. Antibiotikaeinsatz in der Tierhaltung

Als Antibiotika werden Stoffe bezeichnet, die die Vermehrung von Bakterien eingrenzen (bakteriostatische Wirkung) oder diese abtöten (bakterizide Wirkung).

Die früher zugelassenen antibiotischen Leistungsförderer stehen im Verdacht, an der Entstehung von Antibiotikaresistenzen beteiligt zu sein (Domig, 2005). Übertragbare Resistenzen kennzeichnen sich dadurch aus, dass resistenzkodierende Plasmide von einer

LITERATUR

Bakterienzelle zur anderen übertragen werden (Casewell et al., 2003). Regelmäßig tritt dieser Fall bei *E. coli* und Salmonellen auf (Gomes-Neves et al., 2014; Mazurek et al., 2013). Neben der Resistenzentwicklung im Tier verbirgt sich in der Übertragung von Resistenzfaktoren auf humanpathogene und zoonotische Erreger eine weitere Gefahr (Aidara-Kane, 2012; Feuerpfeil, 1999; Kümmerer, 2004). Viele Krankheitserreger weisen multiple Resistenzen auf (Lipsitch und Samore, 2002; Smith et al., 2010). Eine einheitliche Meinung über den Zusammenhang zwischen der Verwendung von Antibiotika in der Tierhaltung und der zunehmenden Entwicklung und Verbreitung von multiresistenten und human-pathogenen Bakterien wird in der Literatur diskutiert (Ge et al., 2013; Glenn et al., 2013; M'Ikanatha et al., 2010). Die Tatsache, dass Resistenzen bei nicht genetisch verwandten Mikroorganismen vorhanden sind, konnte belegt werden (McDermott et al., 2003). Diese Feststellung ist nicht zuletzt ausschlaggebend dafür, dass eine Suche nach Alternativen immer bedeutsamer wird (AGES, 2011; Thacker, 2013).

2.2. Einsatz von natürlichen Futterzusatzstoffen als Ersatz für antibiotische Leistungsförderer und deren Wirkung auf die Schweinegesundheit

2.2.1. Antimikrobielle Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen

Im Mittelpunkt zahlreicher Forschungsbestrebungen stehen in der Natur vorkommende und naturbelassene Substanzen (Gallois et al., 2009; Heo et al., 2013). Es handelt sich beispielsweise um phyto gene Zusatzstoffe, ätherische Öle oder auch Pro- und Präbiotika. Pflanzen und daraus hergestellte Extrakte werden schon seit Jahrhunderten beim Menschen in der Gewürz- und Kräuterheilkunde eingesetzt (Cimanga et al., 2002; Wallace, 2004). Einige Untersuchungen haben ergeben, dass in der Tierernährung verwendete Pflanzenbestandteile antimikrobielle, antivirale und antioxidative Eigenschaften besitzen (Cowan, 1999; Dorman und Deans, 2000; García et al., 2003; Aruoma et al., 1996). Zu den Wirkstoffgruppen der phyto genen Zusatzstoffe zählen Bitterstoffe, Gerbstoffe, Schleimstoffe, ätherische Öle, Farbstoffe, Scharfstoffe, Saponine und Alkaloide (Abreu et al., 2012). So besitzen beispielsweise die in Thymian und Oregano vorkommenden sekundären Pflanzenstoffe ein antioxidatives Potential, das gegen enteropathogene Stämme wie *E. coli*, *Salmonella* spp. und *Clostridium perfringens* wirkt (Duarte et al., 2007; Dubreuil, 2013; Pei et al., 2009; Saei-Dehkordi et al., 2012). Auch Phenolderivaten, wie

LITERATUR

Carvacrol, Thymol, Eugenol sowie dem Monoterpen Citronellal, werden antimikrobielle Wirkungen zugeschrieben (Didry et al., 1994). Diese Inhaltsstoffe sollen die Zerstörung der Bakterienzellmembran herbeiführen, die Flagellinsynthese unterbinden oder auch die Blockade der Adhesinrezeptoren erwirken (Taylor, 2013; Burt et al., 2007; Radulovic et al., 2013). Zudem konnten eingesetzte proteolytische Enzyme, die aus dem Saft und dem Stamm der Ananas extrahiert wurden, Ferkel vor Durchfällen während der Entwöhnungsphase schützen (Chandler und Mynott, 1998). Die orale Verabreichung dieser Proteasen zeigte, dass die ETEC-Anbindung an das Dünndarmepithel dosisabhängig gehemmt werden konnte (Mynott et al., 1996).

Eine Supplementation mit Bromelain, einem proteolytisches Extrakt aus dem Ananasstamm, zeigte in einem *in vivo* Versuch, dass nach einer oralen Gabe von K88-positiven enterotoxischen *E. coli* (ETEC) bei 21 Tage alten Ferkeln die Diarrhöehäufigkeit verringert wurde. Während des Versuches wurden 0, 12,5 und 125 mg Endopeptidase über einen Zeitraum von 10 Tagen gefüttert. Danach erfolgte eine tägliche ETEC-Infektion (5×10^{10} Bakterien/Injektion) über einen Zeitraum von 7 Tagen. Mit beiden Bromelaingaben konnte die Erkrankungshäufigkeit der Absetzferkel gesenkt werden. Daneben konnte bei Ferkeln mit einer Bromelainfütterung im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine signifikante Gewichtszunahme festgestellt werden. Man geht davon aus, dass Bromelain die Rezeptoren, die für die Bindung der Pathogene erforderlich sind, inhibieren kann (Chandler und Mynott, 1998). Bromelain kann somit temporär vor ETEC induziertem Durchfall schützen und somit als Prophylaxe angesehen werden (Chandler und Mynott, 1998; Mynott et al., 1996).

Durch die Zufütterung von Rinderkolostrum konnten Wachstumsstörungen und die Durchfalldauer bei abgesetzten Ferkeln reduziert werden (Huguet et al., 2012). Die im Rinderkolostrum enthaltenen antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Laktoferrin, Lysozym und Laktoperoxidase konnten das Wachstum verschiedener pathogener Bakterien nachweislich eindämmen (Solomons, 2002). Ebenso interferierten die im Rinderkolostrum vorhandenen Oligosaccharide und Glycoproteine mit der bakteriellen Adhäsion an Epithelzellen (Gopal und Gill, 2000).

Ein lysierter Hefebestandteil von *Saccharomyces cerevisiae* konnte über die Blockade des F4-Rezeptors eine ETEC-Anbindung an das Epithel *in vitro* verhindern (Ganner und Schatzmayr, 2012).

LITERATUR

Neben der antimikrobiellen Wirkung werden biologischen Substanzen und deren Bestandteilen auch antioxidative und immunstimulierende Eigenschaften zugeschrieben. Der Gebrauch von organischen Säuren kann während der Absetzphase bei Ferkeln einen positiven Effekt auf den Gesundheitszustand haben (Heo et al., 2013; Partanen et al., 2001). Diese Supplementation kann die unzureichende Magensäuresekretion bei Ferkeln ausgleichen und den Magen-pH-Wert, der zur Verdauung von Eiweiß und zum Schutz vor Krankheitserregern benötigt wird, absenken (Partanen, 1999; Risley et al., 1992).

Beim Einsatz von getrockneten und gemahlten Kernobststeinen der Kornelkirsche (*Cornus mas* L.) konnte eine erhöhte antioxidative Aktivität im Blut und in der Leber nachgewiesen werden (Celep et al., 2013; Gastol et al., 2013). Zusätzlich zeigte sich bei der Gabe von Pflanzenbestandteilen eine Aktivierung von Immunzellen, die sich durch eine Erhöhung der Phagozytoseaktivität oder durch die Induktion verschiedener Zytokine äußerte (Craig, 1999; Holderness et al., 2008). Aktive Gruppen pflanzlicher Inhaltsstoffe aus Trauben reagierten mit Oberflächenrezeptoren (Pathogen associated molecular pattern) von Pathogenen. Dabei unterstützen diese die Immunantwort, indem sie die $\gamma\delta$ T-Zell-Effektor- und Suppressor-Zell-Funktion verstärkten und gleichzeitig die Heilung von geschädigtem Gewebe sowie die Neutralisation von freien Radikalen förderten (Percival, 2009). In Studien war es möglich, unspezifische sowie auch spezifische Reaktionen des Immunsystems zu induzieren. Beispielsweise konnte ein Extrakt aus dem Blatt von *Acanthospermum hispidum* *in vitro* kostimulatorische Effekte auf T-Lymphozyten des Schweineimmunsystems ausüben. In dieser Studie führte dieser Extrakt *in vitro* zu einer Proliferation von CD8⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen, basierend auf einem IL-2 abhängigen Mechanismus, der durch CD4 Helfer-Zellen vermittelt wurde (Summerfield und Saalmüller, 1998). Vor allem für die Entwicklung und Reifung des juvenilen Immunsystems können solche natürlichen Zusätze in der Tierernährung bedeutsam sein. Innerhalb eines weiteren Fütterungsversuches mit Bockshornklee (*Trigonella foenum graecum* L.) bestätigte sich die immunstimulierende Wirkung einer Supplementation. In diesem Versuch wurden je zehn und elf männliche, kastrierte Absetzferkel (ab dem 21. Lebenstag) innerhalb einer vierwöchigen Versuchsphase einer Kontrolldiät ausgesetzt oder mit Zulage von Bockshornkleesamen gefüttert. Hierbei zeigte sich bei der Blutuntersuchung, dass die Supplementation von Bockshornkleesamen zu einer signifikanten Zunahme der relativen Konzentration der $\gamma\delta$ T-Zell-Population (TCR1⁺CD8 α ⁻) sowie zu einer gleichzeitigen

LITERATUR

Reduktion der antigenpräsentierenden Zellen (MHCII⁺CD5⁺) führte ($P < 0,05$) (Zentek et al., 2013b).

2.2.2. Ernährungsphysiologische Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen

Seit langem werden in der Tierernährung Aromastoffe aus Kräutern und Gewürzen eingesetzt, um den Geruch und Geschmack des Futters zu verbessern und hierdurch die Futteraufnahme zu steigern (Kroismayr, 2008; Platel und Srinivasan, 2004; Srinivasan, 2005). Dafür werden beispielsweise Auszüge von Knoblauch, Ingwer, Zimt und Minze verwendet. Viele dieser phytoenen Substanzen besitzen eine appetitanregende Wirkung, die häufig durch eine vermehrte Speichel-, Magen- und Darmsekretion (Galle, Mukus) erklärt wird. Diese soll zu einer besseren Nährstoffabsorption und einer gesteigerten Enzymaktivität innerhalb des Pankreas (Lipase, Amylase, Protease) und des Dünndarms führen (Platel und Srinivasan, 2004; Srinivasan, 2005). Die Beimischung von Carvacrol, Zimtaldehyd und Capsaicin im Futter für Absetzferkel sorgte während einer Durchfallerkrankung für eine Erhöhung der Futter-Verweildauer im Magen. Die Supplementation von phytoenen Bestandteilen könnte somit zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Verdauungsstörungen führen (Manzanilla et al., 2004). Ähnlich wie beim Einsatz von antibiotischen Leistungsförderern zeigten phytoene Bestandteile und organische Säuren (Partanen und Mroz, 1999; Zentek et al., 2013a) als Futterzusatz eine positive Beeinflussung der gastrointestinalen Mikrobiota und könnten damit präventiv gegen Durchfallerkrankungen eingesetzt werden (Guggenbuhl et al., 2007; Lückstädt, 2005; Manzanilla et al., 2004).

Mithilfe von Lektinen binden sich pathogene Bakterien an die mannosehaltige Strukturen der Epitheloberflächen des Magen-Darm-Traktes. Werden Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, die hohe Konzentrationen an Mannanligosacchariden enthalten (90% des Zellwandtrockengewichts besteht aus α -D-Mannan und β -D-Glukan), können sich diese aufgrund ihrer Molekülstruktur *in vitro* an die Oberflächenrezeptoren bestimmter pathogener Keime, beispielsweise *E. coli* oder *Salmonella* spp., binden (Ganner und Schatzmayr, 2012; Ganner et al., 2013; Ofek et al., 2003). Durch diese Rezeptor-Blockade wird die Pathogenbindung an epitheliale Zellen verhindert und damit die Bakterienkolonisation und die daraus resultierende Infektion im Magen-Darm-Bereich beeinflusst (Baumler et al., 1997). Somit stellen Hefeextrakte und

LITERATUR

deren Zellwandkomponenten eine denkbare Alternative für die Gesundheits- und Leistungsförderung in der Tierhaltung dar (Ganner und Schatzmayr, 2012; Li und Kim, 2014).

Die Supplementation von 40 g/kg gefriergetrocknetem und entfettetem Rinderkolostrum im Starterfutter führte während einer Studie zu einer Verbesserung der Futterraufnahme und der Leistungsparameter. Nach dem Absetzen erzielte die Kolostrumgruppe eine höhere durchschnittliche tägliche Futterraufnahme sowie eine mittlere tägliche Wachstumszunahme. Auch eine verbesserte Fäzeskonsistenz konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Neben einer generellen Verbesserung der Leistungsparameter kann eine Kolostrumgabe zu einer Verringerung des nach dem Absetzen von Ferkeln oft zu beobachtenden Gewichtsabfalls und Durchfallaufkommens führen (Huguet et al., 2012). Ähnliche Beobachtungen konnten in einer weiteren Studie bestätigt werden (Boudry et al., 2008).

Durch die Beimischung organischer Säuren wie z. B. Zitronensäure, Fumarsäure, Propionsäure, Benzoesäure uvm., die primär als Konservierungsstoffe eingesetzt wurden, konnte neben der fungiziden Wirkung beim Einsatz in höheren Dosierungen ein positiver Einfluss auf die Zunahmen und den Futteraufwand beim Schwein gezeigt werden (Eidelburger, 1997; Kirchgessner, 1988). Vor allem während der Absetzphase von Ferkeln zeigte sich die positive Wirkung bei der Zugabe von organischen Säuren auf die Darmgesundheit (Henry et al., 1985; Suryanarayana, 2012). Hierzu zählen eine pH-Wert-Senkung der Magendigesta und die damit in Verbindung stehende, effektivere Proteinhydrolyse durch die Umwandlung von inaktiven Pepsinogen in aktives Pepsin (Suryanarayana, 2012). Zudem erwiesen sich einige organische Säuren, wie beispielsweise Zitronensäure, Fumarsäure, Ameisensäure und Propionsäure, als besonders effektiv im Hinblick auf die Wachstumsleistung bei Aufzuchtsschweinen (Partanen, 1999). Im Durchschnitt steigerten die Ameisensäure und dessen Salz sowie Fumar- und die Zitronensäure die durchschnittlichen Tageszunahmen, während der Futteraufwand der Absetzferkel verringert wurde (Partanen, 1999).

Weitere Effekte von organischen Säuren sind neben einer positiven Beeinflussung der Zusammensetzung der Darmmikrobiota eine Verringerung der mikrobiellen Aktivität sowie eine verbesserte Nährstoffverdaulichkeit (Jensen, 2003). So konnte die Verdaulichkeit von Protein und Energie beispielsweise durch die Zulage von

LITERATUR

Ameisensäure um bis zu 4 bzw. 2% vor allem während des Absetzens verbessert werden (Eckel, 1992).

Werden organische Säuren supplementiert, spielt auch die Darreichungsform (Säure oder deren Salz) und die Dosierung eine große Rolle. Bei der Durchführung von Dosis-Wirkungsstudien stellte man fest, dass organische Säuren stärker wirksam waren als deren Salze (Lückstädt, 2007). Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher organischer Säuren eingesetzt und auf ihre Wachstums- und Überlebensrate von Milchsäurebakterien, coliformen Keimen und *Salmonella* getestet. Dabei konnten die eingesetzten Säuren bezüglich ihres inhibierenden Effektes folgendermaßen eingeteilt werden: Propionsäure < Ameisensäure < Buttersäure < Milchsäure < Fumarsäure < Benzoesäure (Knarreborg, 2002).

2.2.3. Immunstimulierende Effekte von natürlichen Futterzusatzstoffen

In zahlreichen Versuchen wurden Einflüsse von pflanzlichen Stoffen auf das Immunsystem von Tieren untersucht. Saponine oder Auszüge aus ätherischen Ölen bewirkten nach der oralen Applikation von Extrakten aus *Quillaja saponaria* und eines *Ascophyllum nodosum* beim Schwein eine Steigerung der Immunglobulinkonzentration im Serum, nachgewiesen für IgM, IgG und IgA. Gleichzeitig konnte die Konzentration von Haptoglobin und C-reaktivem Protein im Blut gesteigert werden (Kirk et al., 2004; Turner et al., 2002a; Turner et al., 2002b). Bei der Verabreichung einer Mischung aus Carvacrol, Zimtaldehyd, Capsicum und Oleoresin, basierend auf Extrakten aus Samen, Wurzeln, Blättern und Früchten, konnte bei Absetzferkeln neben einer Erhöhung zytotoxischer T-Zellen und myeloider Zellen im Blut auch eine Reduktion der Gesamtzellzahl der B-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden (Manzanilla et al., 2006). Durch die Beimischung von Zuckerrohrextrakt im Schweinefutter wurde eine Stimulation von NK-Zellen erreicht (Lo et al., 2005). In verschiedenen Humanstudien konnte über die Zulage von unterschiedlichen phytoenen Bestandteilen (*Astragalus mongholicus* (Chinesischer Tragant), *Coriolus versicolor* (Schmetterlings-Tramete)) eine Proliferation von T-Zellen und eine erhöhte NK-Zellen Aktivität nachgewiesen werden (Li, 2000). Eine Supplementation eines alkoholischen oder fermentierten *Echinacea* Saftes führte zu einer gesteigerten Phagozytose von Granulozyten bei Mastschweinen. Ebenso konnte die Lymphozytenanzahl im Blut von Schweinen signifikant durch die Zufütterung von

LITERATUR

Echinacea gesteigert werden (Böhmer et al., 2009). Aber nicht nur Stoffgruppen aus dem Bereich der sekundären Pflanzenstoffe besitzen die Fähigkeit, unspezifische zelluläre Abwehrmechanismen, wie etwa die Phagozytoseaktivität und antioxidative Aktivitäten von Leukozyten, stimulieren zu können (Peluso et al., 2013). β -(1,3/1,6)-Glukane aus den Zellwänden von Pflanzen, Pilzen, Hefen und Bakterien können sowohl spezifische als auch unspezifische Mechanismen beeinflussen. Dieses konnte für Makrophagen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beim Schwein gezeigt werden (Sonck et al., 2010). Ebenfalls konnten antimikrobielle, antiarteriosklerotische und antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden (Sonck et al., 2010). Zu diesem Zweck wurden in einer Studie der Effekt von sieben β -Glukanen aus verschiedenen Quellen (Pilze, Hefen, Seegrass, Bakterien oder Algen) auf mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Neutrophile getestet (Sonck et al., 2010). Die höchste Stimulation der Lymphozytenproliferation wurde durch die Verwendung von Curdlan, Zymosan und einem β -Glukan aus *Euglena gracilis in vivo* bei Schweinen gemessen (Sonck et al., 2010). In weiteren Studien mit verschiedenen Polysacchariden, unter anderem mit Mannanen, wurde deren immunstimulierende Wirkung bestätigt (Kogan und Kocher, 2007; Leung et al., 2006; Marciani, 2005). In einer Studie mit 32 Ferkeln wurden β -Glukane aus *Saccharomyces cerevisiae* in Kombination mit Vitamin C eingesetzt. Die erste Gruppe erhielt eine Zufütterung mit β -Glukanen (2,5% im Futter), die zweite Gruppe erhielt eine Zufütterung mit Vitamin C (75 ppm). Der dritten Gruppe wurde eine Kombination aus β -Glukan und Vitamin C verabreicht. Die Versuchsdauer betrug vier Wochen, wobei den Ferkeln zwei Wochen nach dem Entwöhnen eine LPS-Injektion (150 μ g/kg Körpergewicht) verabreicht wurde. Daraufhin wurden Blut-, Darm-, Milz-, Leber- und Lungenproben entnommen und ausgewertet. Hierfür wurde vor allem die Expression der proinflammatorischen Zytokine, Interleukin-(IL-)1 β und Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α), bestimmt (Rahman und McFadden, 2006). Im Ergebnis konnten bei der β -Glukan- und Vitamin C-Supplementierung immunmodulierende Effekte mit Anzeichen auf synergistischen Effekte der Kombination nachgewiesen werden, die sich in einer erhöhten Expression der beiden oben genannten Zytokine zeigte (Eicher et al., 2006).

Bei einer weiteren Untersuchung von Futterzusatzstoffen innerhalb einer Studie über 4 Wochen wurde das Futter von 96 Absetzferkeln mit Rinderkolostrum supplementiert (20 bzw. 10 g/kg im Starter- bzw. Growerfutter). Innerhalb der ersten Versuchswoche konnte dabei eine 25%ige Zunahme an zirkulierendem IgA ($P = 0,03$) im Vergleich zur

LITERATUR

Kontrollgruppe (Boudry et al., 2008) erreicht werden. In einem weiteren Versuch mit 32 Absetzferkeln im Alter von 3 Wochen wurde die Wirkung von sprühgetrocknetem Rinder- und Schweineplasma sowie sprühgetrocknetem Rinderkolostrum (je 7,5% im Futter) einschließlich Kontrolle untersucht. Hierbei konnte nur eine entwöhnungsbedingte Erhöhung der intestinalen *Lamina propria* CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten-Populationen beobachtet werden ($P < 0,05$) (King et al., 2008). Im Gegensatz dazu ergab eine Zulage von 5%igem Rinderkolostrum bei 12 und 14 Tage alten Ferkeln eine Erhöhung derselbigen T-Lymphozyten-Population um 28% und 37% ($P < 0,05$) (King, 2008).

2.3. *Escherichia coli* als Durchfallerreger beim Schwein

Bakterielle Erreger sind Hauptauslöser für infektiöse Magen-Darm-Erkrankungen beim Schwein. Zu diesen gehören verschiedene Serovare von *E. coli* (Holt, 1994). Beim Genus *Escherichia* handelt es sich um gramnegative, fakultativ anaerobe, häufig peritrich begeißelte Stäbchen (Holt, 1994). Apathogene Stämme sind normale Bewohner des Magen-Darm-Traktes. Pathogene *E. coli* Stämme hingegen können intestinale, aber auch extraintestinale Erkrankungen auslösen. Saug- und Absetzferkel sind besonders gefährdet (Bruins et al., 2006; Ruan et al., 2013), insbesondere aufgrund ihrer besonderen immunologischen Situation (Svendsen und Larsen, 1977). Ältere Tiere können klinisch unauffällige Träger sein und bilden oftmals ein Erregerreservoir. Die Übertragung pathogener *E. coli* Bakterien findet meist oral über Fäzes oder über die Umgebung statt. Eine Übersicht zu den durch *E. coli* bedingten Erkrankungen gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über *E. coli* bedingte Erkrankungen bei Schweinen (Hörmansdorfer, 2012)

Bezeichnung	Pathogenitätsmechanismus	Erkrankung
Intestinale (darmassoziierte) Erkrankungen		
ETEC	Hitzelabiles (LT) Enterotoxin	wässrige Durchfälle v. a. bei
Enterotoxische <i>E. coli</i>	Hitzestabiles (ST) Enterotoxin α -Hämolyisin	Jungtieren
EPEC	Adhäsionsmechanismen	Durchfälle
Enteropathogene <i>E. coli</i>	Adhäsionsmechanismen	

LITERATUR

Bezeichnung	Pathogenitätsmechanismus	Erkrankung
STEC Shigatoxin bildende <i>E. coli</i>	Shigatoxine Stx 1 und Stx 2 Enterohämolysin Adhäsionsmechanismen	Durchfälle
EDEC Edema Disease <i>E. coli</i>	Shigatoxin Stx 2e α -Hämolysin Adhäsionsmechanismen	Ödemkrankheit der Absetzferkel mit generalisierten Gefäßschäden und Ödembildung
Extraintestinale (nicht darmassoziierte) Erkrankungen		
UPEC	Toxine	Blasen- und Nierenbeckenentzündung
Uropathogene <i>E. coli</i>	Adhäsionsmechanismen	Harnwegsinfektionen

Zwei wesentliche Pathogenitätsmechanismen werden ETEC-Stämmen zugeschrieben. Nach der oralen Aufnahme heften sich diese mithilfe ihrer haarförmigen bakteriellen Oberflächenstrukturen (Pili, Fimbrien) an die Rezeptoren der Darmschleimhaut an, wodurch der Kontakt mit dem Darmepithel gewährleistet wird (Nagy und Fekete, 1999). Es folgt eine Vermehrung unter Bildung von hitzestabilem (ST) oder hitzelabilem (LT) Enterotoxin. Durch Hemmung der Wasser-, Elektrolyt- und Nährstoffresorption sowie Induktion von Flüssigkeitssekretion manifestiert sich das klinische Durchfallbild (Dubreuil, 2012). Der dadurch entstehende Flüssigkeitsverlust verursacht eine Störung der Homöostase und resultiert oft in Exsikkose der erkrankten Tiere, die folglich häufig an Entkräftung und Dehydrierung sterben (Bosworth et al., 1996).

VTEC/STEC *E. coli*, die zu den enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) gezählt werden, sind für Durchfallerkrankungen bei neugeborenen und abgesetzten Ferkeln sowie für die Ödemkrankheit verantwortlich. VTEC besitzen neben ähnlichen Anheftungsmechanismen wie ETEC auch die Fähigkeit, ein Toxin produzieren zu können. Dieses Toxin (Shigatoxin/Verotoxin) verändert im Organismus die Durchlässigkeit der Gefäßwände, was die Ödemkrankheit auslöst (Gannon et al., 1988). Gekennzeichnet ist das klinische Erscheinungsbild durch die sogenannte Ödemform, die mit schweren neurologischen Ausfallerscheinungen (Ataxien, Krämpfe) und einer starken Ödembildung auftritt. Die Ödemkrankheit kann ohne vorausgehende Erkrankungsmerkmale zum Verenden der Tiere führen. Ist das zentrale Nervensystem betroffen, führt dies sofort zum Tod (Smith et al., 2014).

LITERATUR

Neben der Ödemkrankheit sind STEC an einem Durchfallkomplex beteiligt, der bevorzugt bei Absetzferkeln auftritt (Fairbrother et al., 2005). Die als postweaning diarrhoea (PWD) bekannte Erkrankung stellt bei Absetzferkeln eine häufige Todesursache dar, deren Ursache in einer Kombination verschiedener Faktoren gesehen wird. Dazu gehören das Zusammentreffen von Futterwechsel, eine verringerte Futteraufnahme nach dem Absetzen, unzureichende Hygiene und ein zu frühes Absetzen (Madec et al., 1998). Auslöser hierfür sind meist F18 oder F4 (K88) positive *E. coli.*, die sich an die Darmwand anheften und durchfallauslösende Enterotoxine bilden (van Beers-Schreurs et al., 1992).

Die Symptomenkomplexe der Ödemkrankheit und der PWD können sich im Einzelfall je nach Ausstattung des Erregers überlappen. Einige ETEC-Stämme, die PWD verursachen, können die Enterotoxine Shiga-Toxin 2e (Stx2e) oder Verotoxin 2e (VT2e) bilden (Fairbrother et al., 2005). Zudem befinden sich in den äußeren Zellwänden gramnegativer Bakterien Endotoxine (Lipopolysaccharide (LPS)). Diese werden beim Absterben der Bakterien freigesetzt und führen zusätzlich zur Enterotoxinwirkung zu inflammatorischen Reaktionen (Fieber) (Guessous et al., 2005; Lee et al., 1998).

2.4. Darmassoziiertes Immunsystem des Ferkels

2.4.1. Aufbau des Immunsystems

Im Allgemeinen wird das Abwehrsystem in das spezifische („erworbene“, „adaptierte“) und in das unspezifische, angeborene oder native Immunsystem unterteilt. Das native Immunsystem setzt sich aus zellulären und humoralen Komponenten zusammen. Zum angeborenen zellulären Immunsystem werden die natürlichen Killerzellen (NK), die Monozyten/Makrophagen, die dendritischen Zellen, die Granulozyten und die Mastzellen gezählt (Resch, 2009). Humorale Komponenten des nativen Immunsystems sind das Komplementsystem und verschiedene Zytokine und Chemokine, die von Immunzellen abgesondert werden.

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Spezifität und sein Gedächtnis aus. Dieses wird hauptsächlich durch Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten) und deren spezifische Rezeptoren bestimmt. Die Immunantwort setzt sich aus einer T-Zellen und einer B-Zellen vermittelte humoralen Immunantwort zusammen, die miteinander interagieren (Saalmüller, 2006). T-Lymphozyten können in zwei Untergruppen aufgeteilt

LITERATUR

werden, die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und die CD4⁺ T-Helferzellen (Saalmüller, 2006). Diese Zellen können Antigene erkennen, wenn diese nach der Prozessierung im Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (Major-Histocompatibility-Complex; MHC) präsentiert werden. Dabei findet die Präsentation intrazellulärer Antigene über MHC-I und die von extrazellulären Antigenen über MHC-II statt. Mittels MHC-I werden allen kernhaltigen Körperzellen (außer Erythrozyten) und Thrombozyten, spezielle intrazelluläre Peptide (Antigene) an der Zelloberfläche zytotoxischer CD8⁺ Lymphozyten präsentiert (Saalmüller, 2006).

CD8⁺ Lymphozyten sind MHC-I restringiert. Nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zerstören diese die präsentierende Zielzelle über die Sekretion von verschiedenen Substanzen. z. B. Serinproteasen, Perforin oder Granzym.

Nach einer Antigen- oder Mitogenstimulierung produzieren und sezernieren zytotoxische Zellen Interferon- γ (IFN- γ), wodurch andere Zellen zum Wachstum, zur Differenzierung und zur Proliferation angeregt werden (Marucci et al., 1981; Janeway, 2005; Saalmüller, 2006). Neben den CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten produzieren aber auch CD4⁺ T-Helferzellen Typ 1 (T_H1) Lymphozyten und natürliche Killerzellen, IFN- γ (Bach et al., 1997; Young, 1996). Bekannt ist aber auch, dass IFN- γ (ursprünglich bekannt als Makrophagen aktivierender Faktor) von anderen Zellen wie beispielsweise B-Zellen, NK-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sezerniert wird (Carnaud et al., 1999; Flaishon et al., 2000; Frucht et al., 2001; Gessani and Belardelli, 1998; Harris et al., 2000; Yoshimoto et al., 1998). Die Stimulation mit IFN- γ induziert direkte antimikrobielle Mechanismen sowie die Hochregulierung des Antigenprozessings und der Präsentationswege. Ebenso wird durch IFN- γ die Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK) sowie die B-Zellfunktion wie beispielsweise die Immunglobulin Produktion und der Klassenwechsel von IgM zu IgG, angeregt (Boehm et al., 1997; Finkelman et al., 1988). T-Lymphozyten stellen die Hauptproduktionsquelle von IFN- γ dar (Frucht et al., 2001; Sen, 2001). Die Produktion von IFN- γ wird ihrerseits durch weitere Zytokine kontrolliert, die von APCs gebildet werden. Zu diesen zählen die Interleukine IL-12 und IL-18 (Akira, 2000; Fukao et al., 2000; Golab et al., 2000; Munder et al., 2001).

MHC Klasse II-Moleküle befinden sich auf der Oberfläche spezieller APCs, insbesondere von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Zellen. Diese Moleküle binden extrazelluläre Peptide und präsentieren sich mit diesen an der Oberfläche von APCs. Über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Peptid-Antigen-MHC-II-Komplex werden

LITERATUR

Antigene von CD4⁺ T-Helferzellen erkannt. Durch diese Antigenerkennung erfolgt die Aktivierung von T-Helferzellen, die daraufhin eine Immunantwort (Chemokin- und Zytokinbildung) auslösen (Janeway, 2005). Durch den Aktivierungsprozess von CD4⁺ Lymphozyten werden andere Zellen zur Proliferation, Differenzierung (B-Zellen zu Plasma- und Gedächtniszellen) oder zur Sekretion von Antikörpern angeregt (Humorale Antwort) (Janeway, 2005; Saalmüller, 2006).

Der Darm und das darmassoziierte lymphatische Gewebe („gut associated lymphoid tissue“, GALT) sind wesentliche Bestandteile der Immunabwehr des Körpers und schützen diesen vor fremden Antigenen und Krankheitserregern. Das GALT, das größte Immunorgan im Körper von Menschen und Haustieren, enthält eine Vielzahl von Immunzelltypen aus dem angeborenen und erworbenen Immunsystem (Ruth und Field, 2013). Das größte Lymphozytenarsenal befindet sich in der Schleimhaut des Intestinaltraktes. Das GALT umfasst die Peyerschen Platten (PP), die intraepithelialen Lymphozyten (IEL), die unterhalb des Epithels in der *Lamina propria* befindlichen Immunzellen und die mesenterialen Lymphknoten (MLN) (Ermund et al., 2013; Mowat, 2003; Ruth und Field, 2013).

Das GALT spielt eine wichtige Rolle in der ersten Immunabwehr innerhalb der Schleimhaut. Hier wird das Epithel vor großen Erregern und Partikeln durch eine Muzinschicht geschützt (Turner, 2009). Die IELs befinden sich unter den Epithelzellen (IEC). Beide Zelltypen spielen eine Rolle in der Immunfunktion des Darms. TJ Proteine wie Claudin, Occludin und ZO-1 bestimmen die Permeabilität der Schleimhaut und regulieren den Strom der gelösten Stoffe zwischen den IECs. IECs aktivieren oder unterdrücken IELs via Sekretion antimikrobieller Peptide, Zytokine und Chemokine oder über Antigen-Processing und -Präsentation in Verbindung mit MHC-I und MHC-II-Molekülen auf IELs (Artis, 2008). IELs sind vor allem T-Zellen, besitzen aber unterschiedliche Funktionen peripherer T-Zellen (Kunisawa et al., 2007). Die vorhandenen T-Zellpopulationen variieren je nach Spezies und Krankheitszuständen, wobei die Mehrheit CD8⁺ und CD45RO⁺ sind (Kunisawa et al., 2007).

Die PPs sind lymphatische Aggregate, die den Darm und das Kolon auskleiden. Diese gelten als wichtigste induktive Bereiche der humoralen Immunantwort der Schleimhaut (Bilsborough und Viney, 2002). Die Epithelschicht der PPs beinhalten hochspezialisierte Zellen, die Microfold oder M Zellen genannt werden. Diese Zellen nehmen Antigene aus dem Darminhalt über Endozytose auf und geben diese an das ansässige Immunsystem

LITERATUR

(B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Zellen) ab (Newberry und Lorenz, 2005). Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen wandern von den PP oder des Epithels zu den MLN, um dort naive T-Zellen zu stimulieren (Brandtzaeg, 2011). MLNs wirken als Interphase zwischen dem peripheren Immunsystem und dem Darm. Bei Ratten bestehen MLNs hauptsächlich aus T-Helfer-Zellen (55%). Ebenso beeinhaltet diese zytotoxische T-Zellen (15%), B-Zellen (25%) und dendritische Zellen (5%). Schweine dagegen besitzen leicht unterschiedliche Phänotypen. Davon entsprechen ca. 12% $CD4^+CD8^+$, 25-28% $CD4^+$ (einfach positiv), 27-32% $CD8^+$ (einfach positiv). Der Rest besteht aus B-Zellen und andere APCs (Johnson et al., 2006).

Nach der Antigenexposition in den PPs und MLNs zirkulieren die Immunzellen in der Peripherie und wandern schlussendlich zurück in die *Lamina Propria* (Brandtzaeg, 2009). Die *Lamina Propria* ist die wichtigste Komponente des GALT und besteht neben Bindegewebe hauptsächlich aus IgA sekretierenden Plasmazellen und Effektor T-Zellen (50% T-Helfer und 30% zytotoxische T-Zellen) (McGhee et al., 1992).

Im GALT wird nach der vollständigen Entwicklung des Immunsystems eine große Menge an Antikörpern gebildet. Die ersten Antikörper nimmt das neugeborene Ferkel über die Kolostralmilch auf. Diese Übertragung von maternalen Immunglobulinen ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil während der embryonalen Entwicklung keine Antikörper über die Plazentaschranke gelangen, sodass die Ferkel ohne humorale Antikörper geboren werden (Bandrick et al., 2013). Nach ca. vier Wochen hat das intestinale Immunsystem seine vollständige Funktionsfähigkeit erreicht (Lallés et al., 2007; Sinkora et al., 2005; Sinkora et al., 1998). Die Ausbildung der Lymphozyten im Thymus erfolgt dagegen schon früher (Sinkora et al., 2005).

2.4.2. Immunphänotypische Einteilung der Zellen

Die Einteilung der Lymphozyten erfolgt anhand von Antikörpern. Antikörper, die dasselbe Differenzierungsantigen erkennen, werden zu einem „Cluster of Differentiation“ (CD) zusammengefasst. Je nach Funktionalität exprimieren Zellen verschiedene Antigene (z. B. Rezeptoren), aus denen immunphänotypische Oberflächenmerkmale resultieren. Die Identifizierung erfolgt nach Markierung mittels einfacher oder mehrerer monoklonaler Antikörper, die entsprechende Differenzierungsantigene erkennen (Piriou-Guzylack und

LITERATUR

Salmon, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit wichtigen Differenzierungsantigene sind in der Abbildung 1 dargestellt.

Bei Schweinen sind mehrere Phänotypen von T-Zellen bekannt. Die meisten T-Zellen exprimieren CD2 und CD5, allerdings mit einer hohen Variabilität, wobei in etwa 85% CD2⁺ und 64% CD5⁺ sind. Zudem beinhaltet die Gruppe der T-Lymphozyten je nach Ausprägung des T-Zell-Rezeptors (TCR) zwei Zellpopulationen, die der $\alpha\beta$ - beziehungsweise der $\gamma\delta$ T-Zellen. Porzine $\alpha\beta$ T-Zellen sind vor allem im lymphatischen Gewebe lokalisiert, während $\gamma\delta$ T-Zellen überwiegend im Blut und im Darmepithel von Schweinen vorkommen. Zu den $\alpha\beta$ T-Zellen gehören Lymphozyten, die einfach positiv für CD4 (CD4⁺CD8⁻ T-Zellen, 2-18%) oder CD8 Moleküle (CD4⁻CD8⁺ T-Zellen, 3-20%) sind (Charerntantanakul und Roth, 2006; Saalmüller und Bryant, 1994). Dabei wirken CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen bei antiviralen Antworten und CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen überwiegend bei bakteriellen und parasitären Infektionen mit. Anders als bei $\alpha\beta$ T-Zellen ist die Rolle oder die Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass Schweine einen relativ hohen Anteil (bis zu 50%) an zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen.

Die CD4⁺ T-Zellen agieren als T-Helferzellen. Diese sind in der Lage, nach Antigenkontakt zusätzlich CD8 und MHC-II (Major Histocompatibility Complex) Moleküle zu exprimieren und werden anhand ihrer Zytokinausschüttung in zwei Gruppen eingeteilt: Typ-1 T-Helferzellen (T_H1) mit Sekretion von IFN- γ , IL2 und TNF- α und Typ-2 T-Helferzelle (T_H2) mit der Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Antigenstimulierte Typ-1 T-Zellen aktivieren durch ihre Zytokinausschüttung Makrophagen, die unter anderem CD14⁺ exprimieren. Die Typ-2 T-Zellen interagieren mit B-Lymphozyten mit dem Phänotyp CD21⁺CD2⁻CD5⁺ und regen zur Produktion und Ausschüttung von Antikörpern an (Lackovic et al., 1999; Mosmann et al., 1986). Die CD8⁺ T-Zellen sind MHC-I restringiert und zeigen zytotoxische Funktionen (Acheson and Luccioli, 2004; Saalmüller and Bryant, 1994; Saalmüller et al., 2002). Diese Subpopulation kann in zwei Untergruppen unterteilt werden: CD4⁻CD8^{low} Zellen exprimieren wenig CD8 und sind CD6 negativ, während CD4⁻CD8^{high} Zellen zusätzlich CD6 exprimieren. Während die zytotoxische Funktion der CD4⁻CD8 α T-Zellen bekannt ist, scheint die Funktion von CD4⁻CD8 α ^{low} T-Zellen noch relativ unbekannt (Pauly et al., 1996; Saalmüller und Bryant, 1994). Zytolytische CD4⁻CD8 α ⁺ T-Zellen können anhand weiterer Differenzierungsmerkmale (CD3, CD5 und CD6 positiv) von den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) CD2⁺CD5⁻ (CD3, CD4, CD5, CD6 negativ) unterschieden werden

LITERATUR

(Charerntantanakul und Roth, 2006; Gerner et al., 2009). Zusätzlich gibt es auch T-Zellen, die entweder beide Moleküle (CD4 und CD8) oder keines der beiden Oberflächenmoleküle an ihrer Oberfläche exprimieren (Saalmüller und Bryant, 1994). $CD4^+CD8^+$ gehören zu den Gedächtnis T-Helferzellen, welche einzigartig im porcinen Immunsystem sind. $CD4^-CD8^-$ T-Lymphozyten werden als frühe Thymozyten beschrieben (Gerner et al., 2009).

Die Mehrheit der TCR $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Schwein sind CD2 negativ. Im Darmepithel gibt es aber auch wenige $CD2^+$ Lymphozyten ($CD2^+CD5^+$), die TCR $\gamma\delta$ T-Zellen beinhalten und zu den peripheren T-Lymphozyten gehören (Saalmüller und Bryant, 1994).

In jungen Ferkeln sind diese sogenannten Wächterzellen des angeborenen Immunsystems in der intraepithelialen Zellschicht weit verbreitet. Im Blut steigt die Anzahl von $CD8^+$ Zellen von der Geburt bis zum 19. Lebenstag stetig an. Der höchste Anstieg erfolgt aber in der Phase nach dem Absetzen (Borghetti et al., 2006). Im Hinblick auf die Veränderungen in den T-Zell-Subpopulationen bei neugeborenen Ferkeln und in der weiteren Entwicklung spielen die von T-Lymphozyten produzierten Zytokine eine entscheidende Rolle. Sinkende $CD4^+$ und geringe Anzahlen von $CD8^+$ Zellen stehen im Zusammenhang mit einer geringen $IFN-\gamma$ Produktion. Diese Produktion steht in Verbindung mit der Prägung des Immunsystems. Nach Borghetti (2006) findet die $IFN-\gamma$ Transkription in peripheren Lymphozyten erst ab dem zwölften Lebenstag statt und steigert sich langsam. Diese verzögerte Produktion erklärt den geringen Anteil an zytotoxischen Lymphozyten, einschließlich der $\gamma\delta$ T-Zellen, die erst durch $IFN-\gamma$ aktiviert werden müssen. Bis zum Zeitpunkt des Absetzens ist das Immunsystem der Ferkel demzufolge noch nicht vollständig ausgereift (Metzler-Zebeli und Zebeli, 2013; Whiting und Pasma, 2008). Der maternale Immunschutz, der in der neonatalen Periode über das Kolostrum gewährleistet wird, nimmt kontinuierlich ab. In der Absetzphase ist das Ferkel verschiedenen Stressfaktoren und einem Erregerspektrum ausgesetzt. Besonders für die Phasen vor und nach dem Absetzen wird es daher als wichtig erachtet, Fütterungskonzepte für die Aufrechterhaltung eines funktionsfähigen Immunsystems der Ferkel zu entwickeln (Lallés et al., 2007; Pluske, 2013).

LITERATUR

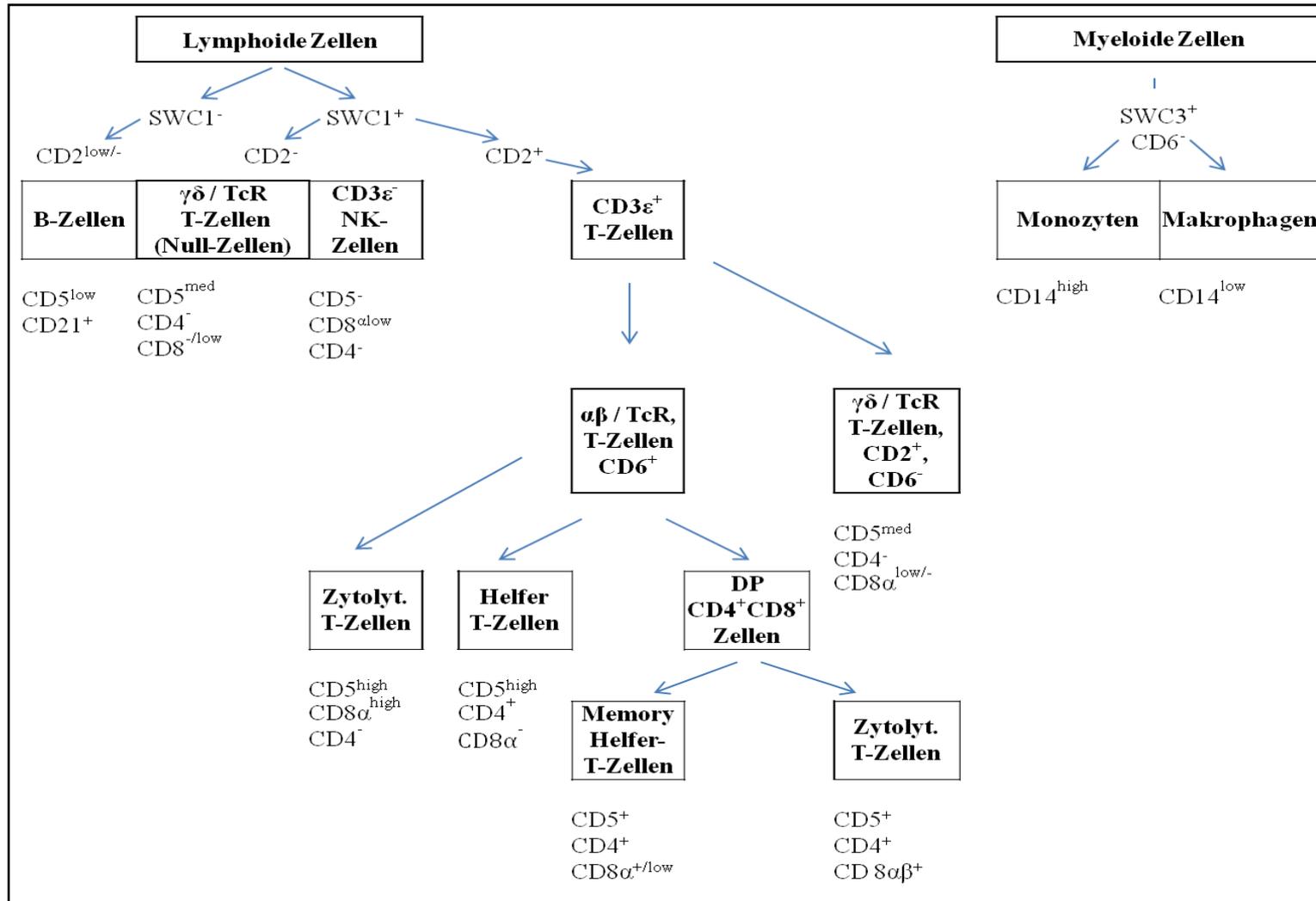


Abbildung 1: Phänotypische Einteilung der porcinen Leukozyten anhand spezifischer Cluster of Differentiation (CD). Variabler Ausdruck; (high) hohe Dichte, Ausdruck; (low) niedrige Dichte, Ausdruck (+) CD/SWC hohe Expression; (-) CD/SWC nicht exprimiert; (+/-) variable Expression nach Piriou-Guzylack und Salmon, 2008

LITERATUR

2.5. Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom (PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome)

2.5.1. Ätiologie und Pathogenese des PRRS

Das Porzine Reproduktive und Respiratorische Syndrom Virus (PRRSV) verursacht erhebliche Probleme in der Schweineproduktion (Neumann et al., 2005; Thanawongnuwech und Suradhat, 2010). Erstmals aufgetreten 1987 in den USA und drei Jahre später in Europa, wird das Virus in zwei Genotypen eingeteilt (Keffaber, 1989; OIF, 1992). Der europäische Genotyp (Typ-1) wird als Lelystad Virus bezeichnet, der nordamerikanische (Typ-2) wird durch den VR2332 Stamm repräsentiert. Beide Genotypen unterscheiden sich deutlich in einigen Bereichen ihrer genetischen Information und besitzen damit eine hohe genetische Variabilität (Magar et al., 1995; Stadejek et al., 2008). Inzwischen betragen die genetischen Abweichungen der PRRS-Viren zum Teil mehr als 20 % vom ursprünglich entdeckten Genotyp. Durch die stetige Änderung bei der Virusvermehrung sind mittlerweile unzählige PRRS-Virusvarianten mit unterschiedlichen Eigenschaften entstanden, die eine gezielte Behandlung (Impfung) erschweren (Schulze, 2011).

Zusätzlich wird PRRSV als „Türöffner“ für sekundäre Begleitinfektionen gesehen, die zu schweren medizinischen und wirtschaftlichen Folgen führen und dementsprechend ein großes Problem darstellen (TopAgrar, 1996).

Bei dem Virus handelt es sich um ein kleines, einzelsträngiges und behülltes RNA Virus der Familie *Arteriviridae*, Genus *Arterivirus*. Der durch die Virusinfektion ausgelöste Krankheitskomplex ist gekennzeichnet durch verlangsamtes Wachstum, verminderte Futtermittelverwertung, Appetitlosigkeit, Fieber, Husten und Atemnot bei Absetzferkeln und Mastschweinen. Des Weiteren führt die Krankheit bei Sauen zu Reproduktionsstörungen (Aborte, Totgeburten, Mumifizierung der Föten) sowie bei Ebern zu einer vorübergehenden Unfruchtbarkeit (Thanawongnuwech und Suradhat, 2010). Ein Merkmal der Krankheit, das aber selten beobachtet wird, sind blau-rot verfärbte Ohren („blue ears“). PRRSV befällt in der Regel zuerst den Atemwegsbereich (Rossow et al., 1994). Es besitzt die Fähigkeit, Lungenmakrophagen zu schädigen. Die Replikation findet dabei vorwiegend in den Alveolarmakrophagen und in den Makrophagen anderer Gewebe statt (Kim et al.,

LITERATUR

2002; Rossow et al., 1995; Rossow et al., 1994). Meist reichen schon geringe Mengen (20-40 Viren) aus, um durch oronasale oder intramuskuläre Applikation eine Infektion zu induzieren (Mengeling et al., 1999; Zimmerman et al., 1997). Nach 12 bis 24 Stunden ist das über die Schleimhäute eingedrungene Virus im Blut nachweisbar. Die Virusreplikation führt innerhalb von 12 Stunden zu einer lytischen Infektion der Wirtszellen und zur Apoptose und Nekrose der Nachbarzellen. Die Inkubationszeit beträgt drei bis sieben Tage. Eine allgemeine Lymphadenitis beginnt etwa zehn bis 14 Tage nach Infektion. Sie ist charakterisiert durch eine folliculäre Hypertrophie und Hyperplasie der Lymphozyten, die mehrere Wochen dauert (Halbur et al., 1995; Kreutz und Ackermann, 1996). Die Läsionen sind bei der respiratorischen Form durch eine interstitielle Pneumonie charakterisiert (Murtaugh et al., 2002). Die interstitielle Pneumonie ist häufig begleitet von bakteriellen Infektionen (Thacker et al., 1999; van Reeth, 1997). Untersuchungen nach experimenteller Infektion mit amerikanischen Genotypen belegen den Beginn makroskopischer Läsionen in der Lunge nach 48 Stunden. Sie sind nach zehn Tagen am deutlichsten und heilen 21 bis 28 Tage post infectionem ab. Darüber hinaus können mehrere Lymphknoten deutlich vergrößert werden. Mikroskopisch ist die Lungenentzündung durch eine multifokale, interstitielle Verdickung durch Makrophagen und nekrotische Zellreste in Alveolen gekennzeichnet. Weniger häufig auftretende mikroskopische Läsionen der PRRSV Infektion sind Myokarditis, Vaskulitis, Enzephalitis und lymphatische Hypertrophie und Hyperplasie. Auch im Gewebe der Fortpflanzungsorgane klinisch erkrankter Sauen, abortierter Feten und totgeborener Ferkel sind selbst während der Virämie nur geringe Erregermengen feststellbar (Murtaugh et al., 2002). Bei akuten oder subakuten PRRSV Infektionen sind das Serum und die Lunge die besten Diagnosematerialien. Persistente PRRSV Infektionen können transplazentar oder intranasal übertragen werden. Diese Übertragungswege erschweren die Eindämmung innerhalb einer Herde und erhalten somit das Virus.

2.5.2. Immunreaktion auf eine PRRSV Infektion

Eine der bemerkenswerten Eigenschaften der PRRSV Infektionen ist die Induktion einer schnellen und starken humoralen Immunantwort (Burton, 2002). Schon 5 bis 7 Tage post infectionem sind IgM-Antikörper gegen eine Vielzahl von viralen Proteinen detektierbar. Am 14. Tag post infectionem erreicht der Antikörper-Titer seinen Höhepunkt, um anschließend innerhalb von 2 bis 3 Wochen wieder auf einen nicht detektierbaren Wert zu

LITERATUR

sinken (Mateu und Diaz, 2008). Darauf folgend findet die Produktion von IgG (beginnend 7 bis 10 Tage post infectionem PI) statt, deren Höhepunkt 2 bis 4 Wochen post infectionem erreicht wird. Die Antikörper, die während der frühen Infektionsperiode gebildet werden, sind nicht in der Lage, PRRSV *in vitro* zu neutralisieren. Es sind sogenannte nicht neutralisierende Antikörper (Yoon et al., 1995). Diese führen zu Infektionsverstärkenden Antikörpern, die zu einer Internalisierung von Viruspartikeln mit nachfolgender Replikation in den Alveolarmakrophagen führen (Yoon et al., 1997). Neutralisierende Antikörper werden erst später zu geringen Titern produziert. Diese sind hauptsächlich gegen die N-terminale Ektodomäne GP5, das primäre Neutralisationsepitop, gerichtet und wirken erst ca. 4 Wochen post infectionem (Virämieende siehe Abbildung 2) (Dea et al., 2000; Lopez, 2004; Meier et al., 2003; Ostrowski et al., 2002; Yoon et al., 1995).

Auch die adaptive Immunantwort gegen das Virus verhält sich ungewöhnlich. Frühe Studien haben gezeigt, dass in den Lungen infizierter Schweine nur eine minimale beziehungsweise keine inflammatorische Zytokinexpression der Typ I Interferone, Interleukin (IL)-1 und TNF- α hervorgerufen werden konnte (van Reeth et al., 1999b). Die Herunterregulierung von Typ-I Interferonen, insbesondere von IFN- α , reduzierte die antivirale Immunantwort und inhibierte somit die angeborene und zellvermittelte Immunantwort (T-Helfer-Typ-1 (T_H1)) (Brassard et al., 2002). Folglich fand die Virusreplikation in der Lunge im Vergleich zu anderen z.B. durch Corona- oder Influenzaviren ausgelösten Erkrankungen teilweise ohne oder mit einer verringerten Zytokinantwort auf die Infektion statt (Albina et al., 1998; Buddaert et al., 1998; van Reeth et al., 1999a). Die zellvermittelte Immunantwort infizierter Schweine trat mit einer Verzögerung von ca. 2 bis 8 Wochen nach der Infektion auf und zeigte sich in Subpopulationen von $CD4^+CD8^-$, zytotoxischen $CD4^-CD8^+$ sowie $CD4^+CD8^+$ Gedächtnis-T-Lymphozyten und einer substantiellen Menge an $\gamma\delta$ T-Zellen (Olin et al., 2005). Kurz nach der Infektion fand in virämischen Schweinen eine Reduktion von myeloiden Zellen, $CD4^-CD8^+$ und $CD4^+CD8^+$ T-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen statt. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme von regulatorischen T-Zellen mit Expression von Foxp3, CD4 und CD25 beobachtet werden. Diese sogenannten regulatorischen T-Zellen gehören zu einer Subpopulation von Immunsuppressor T-Zellen, die an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind (Käser et al., 2008). Erfolgt eine Infektion mit PRRSV, veranlasst das Virus eine erhöhte Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, wie beispielsweise IL-10 und TGF- β , bei gesteigerter Frequenz an Tregs (Dwivedi et al.,

LITERATUR

2011). Die Fähigkeit, die Immunantwort zu modulieren, variiert zwischen den Stämmen und Isolaten. Nach der Infektion mit dem in den USA isolierten PRRSV Stamm erscheinen IFN- γ sezernierende Zellen erst 2 bis 4 Wochen post infectionem, wohingegen die IFN- γ sezernierenden Zellen gegen den EU-Stamm schon 7 Tage post infectionem detektierbar sind (Batista et al., 2004; Diaz et al., 2005, 2006). Zudem werden auch über die verschiedenen Isolate des gleichen PRRSV Stammes nicht nur IFN- α , sondern auch weitere Schlüsselzytokine, wie beispielsweise TNF- α , IL-10 und IL-12, in alveolaren Makrophagen und dendritischen Zellen unterschiedlich induziert oder inhibiert (Lee et al., 2004; Thanawongnuwech et al., 2004). Obwohl der gleiche Genotyp vorherrscht, induzieren die verschiedenen Stämme unterschiedliche Immunreaktionen (Mateu und Diaz, 2008). Die genetische Vielfalt des Virus ist sehr hoch und bereitet bei der Impfstoffentwicklung große Probleme.

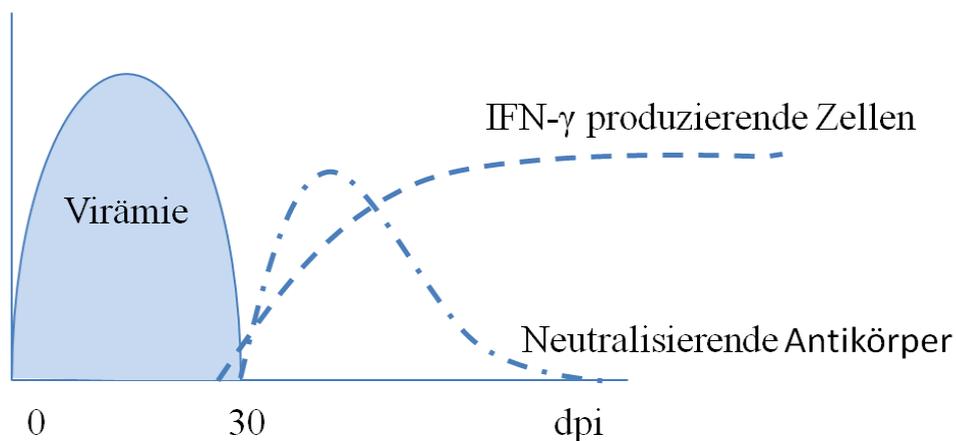


Abbildung 2: Infektion mit PRRSV. Darstellung zeitlicher Verlauf der IFN- γ produzierenden Zellen sowie die Bildung der ersten neutralisierenden Antikörper während der PRRSV Erkrankung nach Lopez (2004)

2.5.3. PRRSV Impfung

Eine Impfung wird als vorbeugende Maßnahme gegen Infektionskrankheiten bzw. deren Erreger, wie beispielsweise das PRRS Virus, eingesetzt. Momentan werden vorwiegend ein attenuiertes Lebend-Virus (modifizierte Lebendvakzine) oder ein Totimpfstoff eingesetzt. Der amerikanische Impfstamm besitzt dabei eine höhere Immunogenität als die europäischen Stämme (Busse, 2001).

Die meisten Impfstoffhersteller verwenden PRRSV MLV Impfstoffe für den Einsatz bei Sauen, Jungsaugen und Ferkeln zur Reduktion der Virämie und klinischer Erkrankungen. In

LITERATUR

der Regel bieten MLV-Impfstoffe einen vollständigen Schutz gegen die klinische Erkrankung homologer Isolate, besitzen aber in der Regel nur eine begrenzte Wirkung gegen heterologe Viren (Mateu and Diaz, 2008). In neuen Studien werden deshalb zur Bekämpfung von genetisch nicht verwandten Stämmen auch DNA-Impfstoffe und rekombinante DNA-Vektor-Impfstoffe verwendet (Kimman et al., 2009; Plana Duran, 2006). Nach der Impfung gegen PRRSV treten etwa zwei Wochen später spezifische Antikörper auf, die ihren Höhepunkt nach etwa 4 Wochen post vaccination erreichen. Die Mehrheit der gebildeten Antikörper besitzt aber keine virusneutralisierende Wirkung (Charerntantanakul, 2012). Die Wirkungsweise der Impfstoffe ähnelt der natürlichen PRRSV Infektion, die ebenfalls mit einer geringen neutralisierenden Antikörperproduktion zusammenhängt. Erst 4 Wochen nach der Infektion treten zu geringen Titern neutralisierende Antikörper auf. Die PRRSV zellvermittelte Immunantwort (CMI) zeigt sich in etwa nach 2 bis 4 Wochen durch eine Lymphozytenblastogenese und eine INF- γ Produktion beziehungsweise durch die Produktion von PRRSV verantwortlichen T-Zell Populationen, die hauptsächlich aus CD4⁺CD8⁺ (Memory-Zellen) und zytotoxischen CD4⁺CD8⁻ bestehen (Charerntantanakul, 2012).

Im Allgemeinen sind die MLV-Impfstoffe wirkungsvoll, weisen aber eine verzögerte humorale und zellvermittelte Immunantwort auf, die deshalb nur einen verzögerten Schutz gewährleisten (Charerntantanakul et al., 2006; Meier et al., 2004).

PRRSV Totimpfstoffe werden vor allem bei Sauen und Jungsauen für die Reduktion von Reproduktionsstörungen oder bei Sauen, Jungsauen, Ebern und Ferkeln zur Verminderung der Reproduktions- und Atemwegerkrankungen empfohlen. Diese Totimpfstoffe sind für ihre Sicherheit bekannt, verleihen aber nur begrenzten Schutz gegen das Virus (Busse, 2001).

Durch die geringe zellvermittelte Antwort und die niedrige neutralisierende Antikörperantwort beim Einsatz einer PRRSV Totimpfung ist diese nicht ausreichend effektiv und hat sich deshalb bei der Prävention von PRRSV Infektionen und Krankheiten als weniger wirkungsvoll als die Lebendimpfung erwiesen (Bassaganya-Riera et al., 2004; Charerntantanakul, 2012; Zimmerman et al., 1997). Bei virusinfizierten Tieren zeigten sich diese Impfstoffe jedoch als wirkungsvoll.

Aufgrund der hohen genetischen Diversität des PRRS Viruses und der damit in Verbindung stehenden, nicht zufriedenstellenden Immunogenität sowie der schlechten Kreuzaktivität der PRRSV Vakzine bleibt die Suche nach geeigneteren PRRSV-

LITERATUR

Impfstoffen in der PRRSV Vakzinenentwicklung weiterhin bestehen. Neutralisierende Antikörper sowie virusspezifische IFN- γ produzierende Zellen spielen bei der Impfstoffentwicklung eine wichtige Rolle (Lopez, 2004; Osorio et al., 2002; Zimmerman et al., 1997). Die Entwicklung von NA-Epitopen wird daher als eine Möglichkeit zur Herstellung eines geeigneten Impfstoffes gesehen. Mithilfe von PRRSV Antikörpern von PRRSV-rekonvaleszenten und hyperimmunen Tieren konnte bereits durch eine passive Immunisierung eine Infektion trächtiger Sauen sowie eine transplazentare Infektion verhindert werden (Osorio et al., 2002).

Da sich möglicherweise die Verwendung von Futterzusatzstoffen bei Schweinen als unterstützend für das Immunsystem erweisen könnte, wurden diese *in vitro* mit verschiedenen Zelllinien untersucht. Eine Zelllinie, die sich zur Untersuchung von Futterzusatzstoffen als geeignet erwies, ist eine intestinale porcine Epithelzelllinie aus dem Jejunum (IPEC-J2) (Pan et al., 2013).

2.6. IPEC-J2 Zellen

2.6.1. Morphologie, Gen- und Proteinexpression

Bei der intestinalen porcinen Epithelzelllinie aus dem Jejunum (IPEC-J2) handelt es sich um nicht transformierte zylinderförmige epitheliale Zellen aus dem porcinen Intestinaltrakt. Sie wurden (Berschneider, 1989) aus dem mittleren Bereich des Jejunums aus einem neugeborenen Ferkel isoliert. Werden diese Zellen auf mit Rattenkollagen beschichteten Snapwell Polyesterfiltern (Transwell[®]) mit einer Porengröße von 0,4 μm kultiviert, so bilden diese vergleichbar mit dem originären Darmgewebe einen einschichtigen, konfluenten Zellverband (Monolayer) aus (Geens und Niewold, 2011; Schierack et al., 2006). Dieser Verband, bestehend aus polarisierten Enterozyten, bildet apikale Mikrovilli und Desmosomen sowie Tight Junctions (TJ) aus. Wie im normalen Jejunum werden die TJ Proteine Claudin-3 und -4 sowie Occludin in der apikolateralen Membran exprimiert (Schierack et al., 2006). Auch das für das intestinale Muzin MUC2 kodierende Gen, konnte an der Zelloberfläche der IPEC-J2 nachgewiesen werden. Becherzellen sind nicht vorhanden (Schierack et al., 2006). Bei der Messung des transepithelial elektrischen Widerstandes (Transepithelial Electrical Resistance, TEER) manifestierten sich hohe Widerstände ($> 1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$), aufgrund derer davon ausgegangen

LITERATUR

werden kann, dass sich ein kontinuierlicher und intakter Zellverband entwickelt (Schierack et al., 2006). Wie im tierischen Gewebe bildet sich eine Glykokalyx aus (Schierack et al., 2006; van der Aa Kühle et al., 2005). Wichtige epitheliale Zellmarker, die in weiteren Untersuchungen innerhalb des IPEC-J2 Epithels nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zelluläre Molekülexpression in IPEC-J2 Zellen (Brosnahan und Brown, 2012)

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
β1-Integrin	+	ND	RT-PCR	Yin et al. (2009) d. n. s. ¹
			RT-PCR	Liu et al. (2010)
Claudin-1	ND	+	IHC, Western Blot	Johnson et al. (2010)
Claudin-3	+	+	IHC	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			Western Blot	Diesing (2011a)
Claudin-4	+	+	IHC	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
Claudin-14	ND	–	IHC	Schierack et al. (2006)
Claudin-16	ND	–	IHC	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR, IHC	Schierack et al. (2006)
Cytokeratin 18	+	+	RT-PCR, IHC	Schierack et al. (2006)
Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)	ND	–	Western Blot	Bauchart-Thevret et al. (2010)
FABP1 (Fettsäure bindendes Protein1)	–	ND	Microarray, RT-PCR	Geens und Niewold (2010)
FABP2/I-FABP (Intestinales Fettsäure bindendes Protein2)	–	–	Microarray, RT-PCR, ELISA	Geens und Niewold (2010)
Gb3 Synthase	+/-	ND	RT-PCR, negativ	Yin et al. (2009) d. n. s.
			RT-PCR, positiv	Liu et al. (2010)

LITERATUR

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
Gb4 Synthase	+	ND	RT-PCR d. n. s	Yin et al. (2009)
Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS)	ND	+	Western Blot	Bauchart-Thevret et al. (2010)
Keratin 8 (KRT8)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
Laminin Rezeptor (37 kDa/67 kDa LRP/LR)	ND	+	Durchflussz., niedrige Expression	Kolodziejczak et al. (2010)
Mammalian Ziel des Rapamycin (mTOR)	ND	+	Western Blot	Bauchart-Thevret et al. (2010)
Mucin 1 (MUC1)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
Mucin 2 (MUC2)	-	ND		Schierack et al. (2006)
Mucin 3 (MUC3)	ND	+	Vorgeschl. durch die Periodsäure-Schiff Reaktion Färbung der Zellmembran ELISA	Schierack et al. (2006) Liu et al. (2010b)
Nucelolin	+/-	ND	RT-PCR, negativ, d. n. s. ¹ RT-PCR, positiv	Yin et al. (2009) Liu et al. (2010a)
Occludin	+	+	IHC RT-PCR IHC	Schierack et al. (2006) Mariani et al. (2009) Johnson et al. (2009)
Osteopontin (OPN)	+	ND	RT-PCR	Skjolaas et al. (2006)
Sulfatide		+	IHC	Albert et al. (2011)
Villin (VIL1)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
Zonula occludens-1 (ZO-1)	ND	+	IHC Western Blot IHC Western Blot IHC	Johnson et al. (2010) Diesing (2011a) Diesing (2011b)

„+“ anwesend; „-“, abwesend; „+/-“, teilweise detektierbar; „ND“ nicht detektierbar

¹Daten werden nicht gezeigt

LITERATUR

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde die Expression verschiedener Immunmoleküle innerhalb der IPEC-J2 Zelllinie untersucht und folgende Immunmoleküle gefunden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Immunmolekülexpression in IPEC-J2 Zellen (Brosnahan und Brown, 2012)

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
CCL2	–	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
CD16b (FCGR3B)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
CD47	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
CD58	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor)	+	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
ICAM1 (Intrazelluläres Adhesions Molekül)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
IFN- γ	–	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
IL-1 α	+	ND	RT-PCR	van der Aa Kühle et al. (2005)
			RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
IL-1 β	+/-	ND	RT-PCR, negativ	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR, negative	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR, positiv	Arce et al. (2010)
			RT-PCR, negativ	Brosnahan and Brown (2012)
IL-2	–	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
				Mariani et al. (2009)
IL-4	–	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)

LITERATUR

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
IL-6	+	+	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			ELISA	Devriendt et al. (2010)
			ELISA	Liu et al. (2010)
			RT-PCR, ELIS	Brosnahan and Brown (2012)
IL-7	+	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
IL-8	+	+	RT-PCR	van der Aa Kuhle et al. (2005)
			RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			ELISA	
			RT-PCR, ELISA	Skjolaas et al. (2007)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			ELISA	Aperce et al. (2010)
			RT-PCR	Arce et al. (2010)
			ELISA	Devriendt et al. (2010)
			ELISA	Liu et al. (2010)
			ELISA	Liu (2010)
		Microarray, RT-PCR	Geens und Niewold (2010)	
IL-10	-	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR	Brosnahan and Brown (2012)
IL-12A (p35)	+/-	ND	RT-PCR, negativ	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR, positive	Mariani et al. (2009)
IL-12B (p40)	+	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
IL-15	-	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR, d. n. s.	Liu et al. (2010c)
IL-18	+	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
IRG6 (Inflammatorisches Antwort Protein6, antiviral)	+	ND	microarray, RT-PCR	Geens und Niewold (2010)

LITERATUR

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein-1)	+/-	ND	RT-PCR, negative RT-PCR, positive flow cytometry	Schierack et al. (2006) Arce et al. (2010)
MHC-I (Haupthistokompatibilitäts Komplex I)	ND	+	flow cytometry	Schierack et al. (2006)
MHC-II (Haupthistokompatibilitäts Komplex II)	ND	-	d. n. s., flow cytometry	Schierack et al. (2006)
MIF (Makrophagen Migration Inhibitions Faktor)	+	ND	RT-PCR,	Skjolaas et al. (2006)
MIP-3 α (CCL20)	+	ND	RT-PCR	Skjolaas et al. (2006)
			RT-PCR	Skjolaas et al. (2007)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
MyD88 (Erstes myeloische Differenzierungsantwort Gen 88)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
NF κ B1 (Nuklear Faktor „Kappa light chain“ Polypeptid Gen Stimulator in B Zellen1)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
NOD1 (Nukleotid-Bindungs- Oligomerisation Domäne containing1)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
pBD-1 (Porzines beta Defensin1)	+	ND	RT-PCR	Sang et al. (2005)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR	Veldhuizen et al. (2009)
pBD-2 (Porzines beta Defensin 2)	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR	Veldhuizen et al. (2009)
pPGRP-L1 (Peptidoglykan Erkennungsprotein-lang1)	+/-	+	RT-PCR, IHC, positiv RT-PCR, negative	Sang et al. (2005) Mariani et al. (2009)

LITERATUR

Molekül	mRNA	Protein	Methode	Referenz
pPGRP-L2 (Peptidoglykan Erkennungsprotein-lang2)	+	+	RT-PCR, IHC	Sang et al. (2005)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
TGF-β1	+/-	ND	RT-PCR, negativ	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR, positive	Mariani et al. (2009)
TGF-β3	+	ND	RT-PCR	Mariani et al. (2009)
TNF-α	+	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)
			RT-PCR	Skjolaas et al. (2007)
			RT-PCR	Mariani et al. (2009)
			RT-PCR	Arce et al. (2010)
TNF-β	-	ND	RT-PCR	Schierack et al. (2006)

„+“ anwesend; „-“, abwesend; „+/-“, teilweise detektierbar; „ND“ nicht detektierbar

Viele dieser in der Tabelle 3 dargestellten Proteine, die in IPEC-J2 Zellen nachgewiesen werden konnten, werden für Immunantworten benötigt. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem natürlichen Epithel des Schweinedarms, insbesondere der Morphologie, sowie der Produktion von Signalstoffen des Immunsystems wird die IPEC-J2 Zelllinie bevorzugt für Studien verwendet, um die Wechselwirkungen zwischen den Epithelzellen in Kombination mit enterischen Pathogenen genauer *in vitro* untersuchen zu können (Kaeffer et al., 1993; Mariani et al., 2009; Sonntag et al., 2005).

2.6.2. Verwendung als Infektionsmodell

Zellkulturen sind beliebte Testsysteme, um verschiedene Einflüsse von Substanzen, Viren und Pathogenen auf das Epithel auf zellulärer und immunmodulatorischer Ebene untersuchen zu können und damit Tierversuche zu umgehen.

Voraussetzung für den Einsatz von *in vitro* Zellkulturmodellen als ein *in vivo* Ersatz ist die funktionelle, morphologische und molekulare Ähnlichkeit mit dem eigentlich zu untersuchenden Originalgewebe.

Durch die Kultivierung von IPEC-J2 auf permeablen Filtern konnte ein detailgetreues Modellsystem für *in vivo* Untersuchungen des Schweinedarms nachgestellt werden, das für Untersuchungen des Darmes mehrfach Verwendung fand (Geens und Niewold, 2011). Nach der Validierung der Zellkultur kann dieses Modell somit verwendet werden, um

LITERATUR

komplexe Wechselwirkungen im Darm genauer zu untersuchen. Um den Einfluss von Substanzen auf das Darmepithel besser einschätzen zu können, wurden Messungen des Transepithelialen Elektrischen Widerstands (TEER) durchgeführt. Mithilfe des TEER-Wertes, der als Schlüsselparameter für die Epithelkonfluenz angesehen wird, konnten Aussagen über die Barriereigenschaften und die Wirkung bestimmter Substanzen auf das Darmepithel getroffen werden (Pan et al., 2013). Während Infektionsversuchen mit Salmonellen (*S. enterica*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*) konnten deren Invasion in die Epithelzellen und die darauffolgende Bakterienreplikation innerhalb intrazellulärer Vakuolen beobachtet werden (Schierack et al., 2006). Bei einer weiteren Untersuchung wurde die IPEC-J2 Zelllinie mit Rotaviren infiziert, um die angeborene Immunantwort gegen Rotaviren und einer Probiotikabehandlung bei nicht transformierten Zellen näher erforschen zu können. Hierbei konnte das eingesetzte Probiotikum (*Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus rhamnosus*) die Virusreplikation nicht eindämmen. Dennoch zeigte sich dieses Modell für weiterführende Studien in Bezug auf Wechselwirkungen zwischen Rotaviren und IPEC-J2 als geeignet, um Mechanismen, die hinter der immunmodulierenden Wirkung von probiotischen Bakterien auf die angeborene Immunantwort stehen, näher untersuchen zu können (Liu et al., 2010). In einer weiteren Studie wurde die Immunantwort einer Infektion verschiedener *Salmonella* Serovare (*S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*) mithilfe der Chemokin- und Zytokin-Expression im Ileum und den jejunalen Epithelzellen im Schwein untersucht. Dabei konnte die Hochregulierung von Interleukin 8 (IL-8) sowie die des Makrophagen-Entzündungsproteins-3 α (MIP-3 α) nachgewiesen werden (Skjolaas et al., 2006). Ein weiterer Versuch zur Interaktion von Pathogenen mit Salmonellen wurde mithilfe des IPEC-J2 Kulturmodells durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf der aktinabhängigen Signalprozesse des Wirtsorganismus, der bei einem Salmonellenbefall auftritt, untersuchen zu können (Brown, 2007). Desweiteren fanden auch Pathogen-Interaktionsversuche mit anderen Bakterienarten statt. So konnte bei der Verwendung von verschiedenen pathogenen *E. coli* Stämmen deren Ausbildung von Attaching- und Effacing-Läsionen beobachtet werden (Schierack et al., 2006). Die mit IPEC-J2 Zellen *in vitro* durchgeführten Studien zeigten, dass IPEC-J2 Zellen eine große Ähnlichkeit zum lebenden Schwein besitzen. Daher ist es möglich, *in vitro* Ergebnisse von Pathogen-Interaktionsversuchen auf *in vivo* Situationen abzuleiten (Geens und Niewold, 2011).

LITERATUR

2.7. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Futterzusätze auf ihre Wirkungsweise *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Folgende Hypothesen waren Grundlage der Versuchsdurchführung:

Die Verwendung von verschiedenen Futterzusätzen (Kolostrum (CM), Ananasstammextrakt (Bromelain (BM)), Hefezellwandextrakt (PV), Thymianextrakt (TY), getrocknete und gemahlene Steinfruchtkerne (DS)) sowie einer Säuremischung (AM) vermindert die Adhäsion von enterotoxischen *E. coli* Stämmen und stabilisiert das Epithel nach einer *in vitro* Infektion mit einem enterotoxinbildenden *E. coli*-Stamm.

Kolostrum (CM), Hefezellwandextrakt (PV), getrocknete und gemahlene Steinfruchtkerne (DS) und ein auf Basis von *Bacillus cereus* var. *Toyoï* hergestelltes Probiotikum (BC) haben einen Effekt auf die Immunreaktion nach einer PRRSV Impfung von Schweinen.

MATERIAL UND METHODEN

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. *In vitro* Untersuchungen

Im Rahmen des ersten Teils der Studie wurden *in vitro* Versuche an einer intestinalen porzinen Epithelzelllinie aus dem Jejunum (IPEC-J2) durchgeführt. Hierbei wurde die Wirkung verschiedener Präparate auf pathogene Mikroorganismen und deren weiteren Einfluss auf eine IPEC-J2 Zellkultur untersucht. Dabei wurden insgesamt sechs verschiedene Extrakte in unterschiedlichen Konzentrationen (1:100 – 1:100000) und Einwirkzeiten (6 h und 24 h) auf die IPEC-J2 Zellen mit oder ohne Zugabe von zwei verschiedenen *Escherichia coli* Stämmen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle getestet. Der Einfluss der Substanzen sowie der *E. coli* Stämme auf die Zellkultur beziehungsweise die Konfluenz des Epithels wurde anhand der Veränderung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes (TEER) bestimmt.

Versuchszelllinie

Die IPEC-J2 Zelllinie wurde ursprünglich von Berschneider beschrieben (Berschneider, 1989). Bis zur Verwendung der Zellen in der Passage 30-50 wurden diese bei -80°C gelagert. Für die Versuchsreihen wurden diese aufgetaut und zu einem Monolayer in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F12 (GIBCO™; Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) mit 10% Schweineserum und 1% Penicillin-Streptomycin (beides Biochrom AG, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die IPEC-J2 Zellen wurden in 175 cm² Cellstar Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C in einem Inkubator (Salvis Lab, Rotkreuz, Schweiz) in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert. Nach Erreichen von 90% Zellkonfluenz wurden die Zellen routinemäßig jeden zweiten bis dritten Tag passagiert oder für das Experiment verwendet. Im Institut für Biochemie wurden unter Dr. Bondzio die Zellen mittels MycoAlert Testkit (Lonza Group AG, Köln, Deutschland) auf Mykoplasmen getestet. Es wurden ausschließlich *Mykoplasma* spp. negativ getestete Zellen verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

Bakterienstämme

Für die TEER-Messung wurden zwei Bakterienstämme verwendet. Für die Positivkontrolle wurde der enterotoxische *E. coli* Stamm Abbotstown (Serotyp: O149:K91:F4ac) von Dr. Karsten Tedin, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm besitzt Virulenzfaktor-Gene für F4ac Fimbrien, hitzestabile Enterotoxine ST-I und ST-II sowie das hitzelabile Enterotoxin LT-1.

Als Kontrolle wurde der nicht pathogene *E. coli* Stamm DSM 2840 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Braunschweig) verwendet. Dieser Stamm bildet keine F4-Fimbrien aus, die zur Anbindung an das porcine Dünndarmepithel benötigt werden.

Die Anzucht beider Stämme erfolgte über Nacht auf einem Schüttler (MaxQ Shaker, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in Luria-Bertani (LB) Medium (Roth: 10 g/500 ml + 0,1% Glucose, pH 7,0) bei 37°C. Anschließend wurden die Bakterienkulturen in 1 ml LB-Medium überimpft. Nach 6 Stunden weiteren Wachstums erfolgte die Ernte der Bakterien mittels Zentrifugation (14,8 x g) für 3 min, Resuspension und Vereinigung in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Nach der Bakterienzählung wurden diese im Verhältnis 3:1 (Bakterien : IPEC-J2) für die *in vitro* Infektionsversuche eingesetzt.

Testmaterialien

Die verwendeten Testmaterialien wurden von den Firmen BIOMIN GmbH (Tulln, Österreich) und VERACUS GmbH (Bremerhaven, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Aus den getrockneten und vermahlenden Probenmaterialien aus Kernobststeinen (Drupe Stone: DS), Bestandteilen von Hefezellwänden (PV), Säurenmischung (Acid Mix: AM), Thymian (TY) der Firma BIOMIN GmbH sowie eines Ananasstammextrakt (BM) und Kolostrum (CM) der Firma VERACUS GmbH wurden jeweils 10% Stammlösungen hergestellt. Dafür wurden vom entsprechenden Ausgangsmaterial je 5 g mit 45 ml Zellkulturmedium, DMEM/Ham's F-12 mit stabilen Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt, das 10% Schweineserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und einen Antibiotikazusatz, bestehend aus 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10.000 µg/ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) enthielt. Das Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer (IKAMAG® RH, Firma Jahnke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) gerührt. Anschließend wurde die

MATERIAL UND METHODEN

wässrige Phase bei 4000 x g für 20 min bei 20°C zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland) und der Überstand mittels Membranpumpe (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) filtriert. Vor der Herstellung der verschiedenen Verdünnungen (1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000) wurde der pH-Wert der einzelnen Extrakte mittels 1 N HCl und 1 N NaOH auf pH 7 eingestellt. Eine Ausnahme stellt dabei das Produkt PV dar. In diesem Fall wurde nicht der Extrakt, sondern eine Suspension einschließlich der darin enthaltenen Hefezellwände hergestellt. Hierfür wurden 0,5 g in 49,5 ml PBS gelöst (1:100 in PBS). Die Suspension wurde mittels Turbo Ultrasonic max (Power Output: max; Interval 0,5; IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland) für 2 min auf maximaler Stufe vermischt, auf pH 7 eingestellt und anschließend steril autoklaviert (15 min, 121°C). Alle weiteren PV-Verdünnungen wurden mit Zellkulturmedium (siehe oben) verdünnt. Bis zur Verwendung (max. 4 Wochen) wurden die Extrakte und die Suspension bei 4°C aufbewahrt.

Kultivierung der IPEC-J2 auf permeablem Filter

Der in einer Kulturflasche herangezüchtete Zellmonolayer wurde nach Erreichen der Konfluenz (3 bis 5 Tage) mittels PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) behandelt. Nach ca. 15-20 Minuten wurden die abgelösten Zellen in ein 50 ml Probenröhrchen transferiert und bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment mit 10 ml Zellkulturmedium, das 1% Penicillin-Streptomycin (Antibiotikazusatz) enthielt (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), resuspendiert und mithilfe einer Zählkammer (C-Chip, Hemocytometer, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gezählt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl:

Mittelwert lebender Zellen x Volumen der Zellsuspension (10 ml) x Verdünnung in Trypanblau (1:10) x Kammerfaktor (10^4) = Ø Lebendzellzahl x 10 x 10 x 10^{04}

Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^5 Zellen/300 µl auf die zuvor mit Rattenschwanzkollagen (BD Biosciences, Bedford, USA) beschichteten permeablen Transwell® Support-Filter (Polystyrene Einlagen, 12 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße, Corning, New York, USA) der 6 Well-Platten (Corning™ Transwell®, New

MATERIAL UND METHODEN

York, USA) ausgesät. Danach wurden die äußeren Kammern der Transwell® Support Einheiten mit 4 ml des Mediums einschließlich Antibiotikazusatz befüllt. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellverbandes auf der permeablen Polycarbonatmembran der Inserts konnte die *in vitro* Transportstudie gestartet werden. Das Medium wurde jeden zweiten Tag während des Versuchszeitraumes (1-2 Wochen) gewechselt.

Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes (TEER)

Grundlagen der TEER-Messung

Epithelien und Endothelien bilden Barrieren, die das interne Milieu von Organen gegenüber der Umgebung aufrechterhalten, indem der Transport von Wasser und gelösten Stoffen reguliert wird. Moleküle können diese Barriere auf zwei Wegen passieren. Zum einen auf dem transzellulären Weg, der die Passage durch die apikale und basolaterale Plasmamembran beinhaltet. Dieser Schritt ist in Bezug auf das zu transportierende Molekül hoch spezifisch. Der zweite Weg führt durch die Zellzwischenräume (parazellulärer Weg) und ermöglicht die Passage von wasserlöslichen Molekülen durch passive Diffusion. Die freie Diffusion wird durch eine parazelluläre Barrierefunktion des Epithels eingeschränkt. Der parazelluläre Weg führt über die „Tight Junctions“ (TJ) zwischen den Zellen sowie über den interzellulären Raum ($R_{\text{para}} = R_{\text{Tj}} + R_{\text{ics}}$). Die Dichtigkeit des Epithels ist gewebsspezifisch und wird durch den elektrischen Widerstand über dem Epithel (Transepithelial Electrical Resistance = TEER) beschrieben (Aruoma et al., 1996; Powell, 1981; Reuss, 1991; van Itallie et al., 2004). Die Höhe des transepithelialen elektrischen Widerstandes wird auf die Epithelfläche bezogen und hat die Einheit Ωcm^2 (Abbildung 1). Beide Barrieren, transzellulär und parazellulär, wirken wie parallel geschaltete Widerstände ($R_{\text{trans}} + R_{\text{para}}$), welche gemeinsam den Gesamtwiderstand der Zelle bilden (R_{med}). Dieser Wert gilt als Maßstab für die Charakterisierung des Epithels bezüglich seiner Durchlässigkeit. Der transzelluläre Widerstand (R_{trans}) ist sehr viel größer als der parazelluläre (R_{para}). Somit kann der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) mit dem R_{para} gleichgesetzt werden, wobei der Widerstand der Gesamtschicht im Wesentlichen von den interzellulären Tight Junctions abhängt (Galla, 1988; Powell, 1981). Je besser diese ausgebildet sind, desto höher ist der TEER-Wert. Der daraus resultierende Widerstandswert spiegelt die Konfluenz und Integrität des Zellmonolayers, also der Barriereigenschaften von Epithelien, wider.

MATERIAL UND METHODEN

Vorbereitung und Durchführung der TEER-Messung

Die Messung des Widerstandes erfolgte mithilfe eines epithelialen Voltohmmeters (EVOM) und einer sterilen Endohm Kammer (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Vor Beginn der Messung wurde die Endohm Kammer mit aufgesetztem Deckel einschließlich integrierter Elektrode für 20 Minuten in 70% Ethanol sterilisiert und anschließend an der Luft getrocknet. Währenddessen wurden alle zu verwendenden Medien im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die zu messende Platte wurde aus dem Brutschrank entnommen und auf die ebene Arbeitsfläche der sterilen Arbeitsbank gebracht. Für die Messung wurden die Inserts mit einer sterilen Pinzette aus den einzelnen Plattenvertiefungen entnommen und in die sterilen mit 4 ml Medium befüllten Messkammern eingelegt. Nach blasenfreiem Aufsetzen des Elektrodendeckels erfolgte die Messung durch Stromanlegung.

Nach Beendigung der Messung wurden die Platten zur weiteren Inkubation in den Brutschrank gestellt. Die Kammer einschließlich des Deckels wurden nach der Messung mit 70% Ethanol sterilisiert, mit destilliertem Wasser gespült und anschließend aufbewahrt. Dokumentiert wurden jeweils der gemessene Widerstand und der Zeitpunkt der Messung.

Folgende Punkte waren bei der Durchführung der Messung zu beachten:

- 1) Um einen korrekten Messwert zu bekommen, sollte die Elektrode während der Messung immer ausreichend tief in das Medium eingetaucht sein.
- 2) Der Deckel mit Elektrode muss exakt auf die Kammer aufgesetzt werden, um einen Kontakt zu den Zellen oder den Wänden der Filtervertiefungen zu verhindern, damit es zu keiner Schädigung der Zellschicht kommen kann.
- 3) Nur eine korrekte Einlage der Inserts ermöglicht die richtige Position der Elektrode ca. 2-3 mm über dem Monolayer.

MATERIAL UND METHODEN

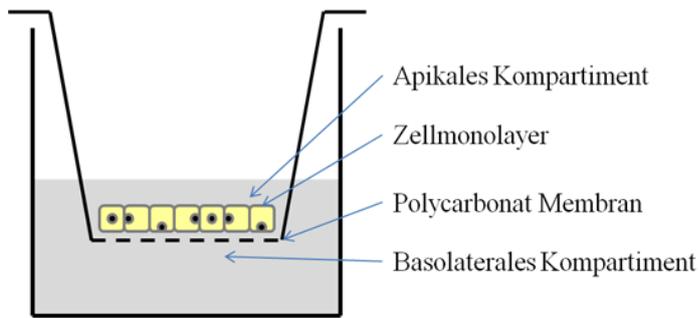


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer einzelnen Transwell-Support-Einheit. Transwell-System (Corning Costar) zur Züchtung und Durchführung von Transportversuchen an künstlichen Epithelien. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind durch die Inserts in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment geteilt. Durch Zugabe der zu untersuchenden Substanz des apikalen Kompartimentes kann der Transport über das Epithel untersucht werden (Günzel et al., 2012)



Abbildung 4: Endohm-Messkammer mit aufgesetztem Deckel inklusiver integrierter Elektrode sowie eingelegtem Insert (WPI, 2006)

Studiendesign

Im Rahmen von drei Studien wurde der Einfluss der Testsubstanzen ohne Infektion und mit einer Einwirkzeit von 6 Stunden bzw. 24 Stunden in Kombination mit einer ETEC-Infektion auf eine IPEC-J2 Zelllinie getestet. Es wurden drei Durchläufe pro Studie durchgeführt, wobei alle Futterzusatzstoffextrakte als Doppelbestimmungen angesetzt wurden (6 Ergebnisse pro Extrakt). Als positive Infektionskontrolle wurden der enterotoxische *E. coli* Stamm Abbotstown und als negative Infektionskontrolle der *E. coli* Stamm DSM 2840 eingesetzt. Als Kontrollmessung der einzelnen Extraktlösungen diente eine separate Platte. Diese wurde nicht mit *E. coli* infiziert (keine Kontamination möglich).

MATERIAL UND METHODEN

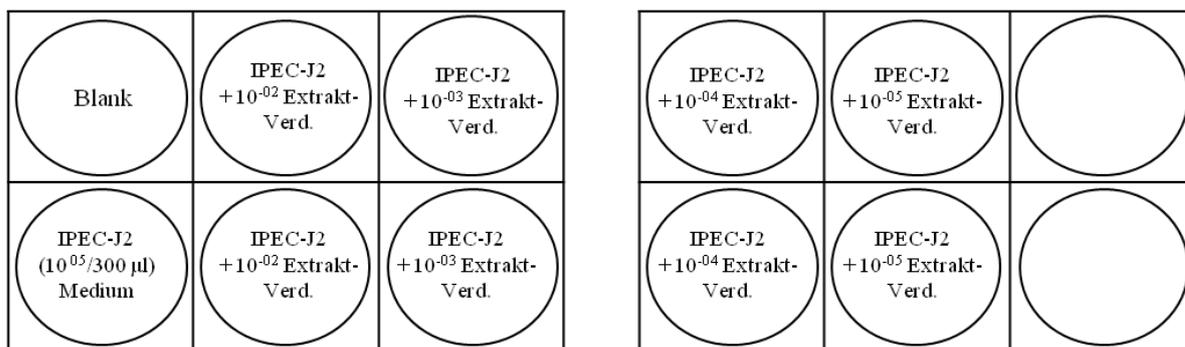


Abbildung 5: Pipettierschema der Extraktverdünnungen (Konzentrationsverdünnung 10^{-02} - 10^{-05} g/l) ohne Infektion mit 10^{05} IPEC-J2/300 µl je Vertiefung. Negativkontrolle als Vergleichswert ohne Zellen mit reinem Kulturmedium ($0-5 \Omega \text{ cm}^2$). IPEC-J2 Medium als Vergleich des Zellwachstums ohne Extrakteinfluss

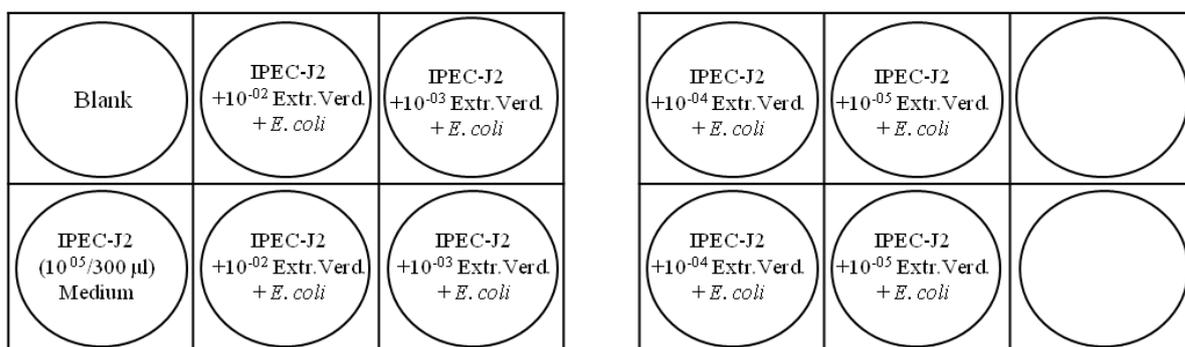


Abbildung 6: Pipettierschema der Extraktverdünnungen (Konzentrationsverdünnung 10^{-02} - 10^{-05} g/l) für die Infektion der Epithelzellen IPEC-J2 (10^{05} IPEC-J2/300 µl je Vertiefung) mit der positiven Kontrolle *E. coli* (Abbotstown) oder Negativkontrolle *E. coli* (DSM 2840) in einem Verhältnis von 1:3 IPEC-J2:*E. coli*

3.1.1. Einfluss der Testsubstanzen auf den TEER

In der ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung der Extrakte auf die intestinalen Epithelzellen untersucht. Beim Erreichen eines Schwellenwertes von mindestens $1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ (Schierack et al., 2006) wurde das Kulturmedium des inneren (apikalen) Kompartimentes der Transwell® Support Einheit (siehe Abbildung 3) durch die verschiedenen Extraktionsverdünnungen (300 µl Extrakt in einer Verdünnung von 10^{-02} - 10^{-05} g/l mit Antibiotikazusatz) ausgetauscht. Danach wurde das Insert zurück in die Platte eingesetzt und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

Der Mediumwechsel des äußeren Kompartiments sowie die TEER-Messung erfolgten jeden zweiten Tag innerhalb der Versuchsdauer von zwei Wochen. Anschließend wurde

MATERIAL UND METHODEN

der Versuch beendet, da sich der TEER-Wert seinem Plateau angenähert hatte und keine Steigerungen mehr innerhalb einer Versuchseinheit erkenntlich waren.

3.1.2. Einfluss der Testsubstanzen auf die Interaktion zwischen *E. coli* und dem TEER einer IPEC-J2 Zelllinie

Für die Infektionsversuche wurden zwei unterschiedliche *E. coli* Stämme verwendet. Als positive Kontrolle wurde der *E. coli* Stamm Abbotstown eingesetzt, der durch seine F4-Fimbrienausbildung befähigt ist, sich an das IPEC-J2 Epithel zu heften. Als negative Kontrolle wurde der *E. coli* Stamm DSM 2840 verwendet, der keine F4-Fimbrien ausbildet und demzufolge keine spezifische Epithelanbindung macht. Die Infektionsversuche wurden wie unter 3.1.1. durchgeführt. Einen Tag, bevor die Futterzusatzstoffe hinzugegeben wurden, wurde das antibiotikahaltige gegen antibiotikafreies Medium ausgetauscht, um die Infektion nicht zu beeinträchtigen. Am folgenden Tag wurden die Testlösungen in ihren Verdünnungen aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 6 Stunden wurde der enterotoxische Stamm (Abbotstown) und der Stamm DSM 2840 in das innere Kompartiment der Platten gegeben. Die Infektion erfolgte mit einer Multiplizität von 3:1 (*E. coli* : IPEC-J2). Der Widerstand wurde 6 h nach Zugabe der Testsubstanzen und 2 h bzw. 24 h nach der Infektion bestimmt. Dieselbe Untersuchung wurde zusätzlich noch mit einer weiteren Einwirkzeit von 24 Stunden durchgeführt. In diesem Fall wurde der Widerstand 24 Stunden nach der Zugabe der Futterzusatzstoffextrakte sowie 2 h, 24 h und 48 h nach der *E. coli* Zugabe (Infektion) gemessen.

Auswertung der Messergebnisse

Zur Beurteilung der Wirkung der einzelnen Extrakte auf die Zellen allein oder zur Beurteilung der präventiven Wirkung der Extrakte in Kombination mit einer *E. coli* Infektion wurde die Erfassung des transepithelialen elektrischen Widerstands genutzt. Hierbei wurde getestet, ob die Extraktkonzentrationen einen Einfluss auf die Zellen hatten beziehungsweise im Infektionsversuch nach der Zugabe von *E. coli* unterschiedliche Widerstandswerte im Vergleich zu den un-supplementierten Kontrollen resultierten. Dabei wurde ein TEER-Abfall als Folge einer *E. coli* Infektion gewertet. Die TEER-Werte der einzelnen Konzentrationsstufen wurden grafisch gegen die Zeit aufgetragen, um die Entwicklung des Widerstandes darzustellen.

MATERIAL UND METHODEN

3.2. Fütterungsversuch

Der Versuch wurde unter dem Aktenzeichen Reg 0356/12 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt.

3.2.1. Tierexperimentelle Methoden

Versuchstiere

Für die *in vivo* Untersuchung von vier verschiedenen Futterzusatzstoffen und zusätzlicher Kontrollgruppe wurden insgesamt 50 Tiere eingesetzt. Dazu wurden 25 männliche und 25 weibliche Ferkel (Hybridzucht: Duroc x Deutsche Landrasse x Piétrain) aus der Zucht des Instituts für Tierernährung, Freie Universität Berlin, im Alter von 21 Tagen verwendet. Tiere aus dem Institut der Tierernährung gelten als PRRSV frei. Für den Versuch wurden nur Ferkel eingesetzt, die von institutseigenen Muttersauen stammten.

Versuchsaufbau und Durchführung

In der Studie wurden Testsubstanzen aus gemahlene Kernobssteinen (DS), Bestandteile von Hefezellwänden (PV) der Firma BIOMIN GmbH aus Tulln, Österreich sowie Toyocerin[®] (BC) mit *Bacillus cereus* var. *Toyo* NCIMB 40112 (Lohmann Animal Health GmbH, Cuxhaven, Deutschland) und Kolostrum (CM) der Firma VERACUS GmbH (Bremerhaven, Deutschland) verwendet und mit einer Kontrollgruppe (CO) im Rahmen eines Fütterungsversuches über die Dauer von ca. sieben Wochen untersucht. Für den Versuch wurden die Ferkel nach Gewicht und Geschlecht randomisiert in 5 Gruppen eingeteilt. Das Startgewicht der drei Wochen alten Ferkel lag bei $8,18 \text{ kg} \pm 1,11 \text{ kg}$. Die 10 Ferkel pro Gruppe wurden zu zweit unter Berücksichtigung der Geschlechterverteilung pro Bucht aufgeteilt. Nach dem Start der Fütterungsperiode (Tag der Einstallung) fand 5 Tage später die erste Wägung statt. Exakt eine Woche nach der Einstallung wurde die erste Blutprobe (Zeitpunkt 0) entnommen und anschließend die PRRS Impfung mit $10^{4,9}$ GKID₅₀*PRRS-Lebendvirus (Stamm ATCC VR 2332; 2 ml des Ingelvac[®]PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) durchgeführt. Insgesamt erfolgten während dieser Studie vier Probenentnahmen im Abstand von 7, 21 und 35 Tagen nach der PRRSV Impfung. Die Leistungsparameter und der Gesundheitsstatus wurden wöchentlich bestimmt. Alle Tiere wurden nach dem Versuchsende zur weiteren Mast abgegeben.

MATERIAL UND METHODEN

Fütterungs- versuch	PRRSV- Impfung	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
		CO	BC	CM	DS	PV
Tag 0		Einstellung, Gesundheitsstatus, Wiegung				
Tag 5		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 7	Tag 0	Erste Blutentnahme und PRRSV-Impfung				
Tag 12		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 14	Tag 7	Zweite Blutentnahme				
Tag 19		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 26		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 28	Tag 21	Dritte Blutentnahme				
Tag 33		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 39		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 40	Tag 35	Vierte Blutentnahme				
Tag 47		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 54		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus				
Tag 61		Wiegung, Gewicht und Futter, Gesundheitsstatus Versuchsende				

Abbildung 7: Aufbau und zeitlicher Ablauf des Fütterungsversuches mit den 5 unterschiedlichen Fütterungsgruppen. Die Gruppe CO entspricht der Kontrolle. Die Gruppe BC erhielt Toyocerin[®], die Gruppe DS gemahlene und getrocknete Steinfruchtkerne, die Gruppe CM bovines Kolostrum und die Versuchsgruppe PV Hefezellwandbestandteile

MATERIAL UND METHODEN

Haltung der Tiere

Die Tiere wurden über den gesamten Versuchszeitraum von 61 Tagen in einem vollklimatisierten Stall in Flatdecks gehalten. Dabei wurde die Wasser- und Futteraufnahme *ad libitum* gewährleistet. Die Fütterung erfolgte über Futterautomaten. Stetige Kontaktaufnahme zu anderen Artgenossen wurde über nebeneinander liegende Zweierboxen ermöglicht. Durch ein Lichtprogramm wurde der Tag- und Nachtrhythmus über eine sechzehnständige Lichtphase dargestellt. Die Raumtemperatur wurde bei 28°C und die Luftfeuchtigkeit konstant bei 65% gehalten, wobei Kontrollen der Parameter im Eingangsbereich (Temperatur) und im hinteren Bereich (Luftfeuchtigkeit) des Stalles erfolgten. Zur Förderung des Spieltriebes wurde ein Plastikball je Bucht eingesetzt.

Versuchsfutter und Fütterung

Innerhalb der Studie erhielten die Tiere zwei verschiedene Ferkelaufzuchtfutter. In den ersten zwei Wochen wurde ein Starterfutter verwendet. Danach wurden die Ferkel mit Ferkelaufzuchtfutter gefüttert. Die Basis der beiden Futtermischungen bildeten Getreide und Sojaextraktionsschrot (Tabelle 4). Die Optimierung der Futterzusammensetzung und die Futtermischung erfolgten am Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin. Die Vorgaben der Zumischung der Futterzusatzstoffe erfolgten durch die in der Studie beteiligten Firmen. Für die Kontrollgruppe wurde eine Basisdiät ohne Futterzusatzstoff eingesetzt. Ein Anteil von 1,08% der Mischung wurde in dieser Gruppe durch Optigrain[®] dargestellt. Die BT-Gruppe erhielt die Basisdiät mit 0,2% BT, die BC-Gruppe die Basisdiät mit dem probiotischen Toyocerin[®] (*B. cereus* var. *Toyoi* NCIMB 40112, Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Deutschland) mit 10⁹ kolonieformenden Einheiten/kg bzw. einer Zumischung von 0,01%. Für die Kolostrumgruppe (CM) wurde getrocknetes Rinderkolostrum in einer Menge von 0,9% hinzugefügt. Die PV-Gruppe erhielt die Basisdiät mit einem Hefeextrakt in einer Dosierung von 0,2%. Die Differenz zwischen der Menge der zugesetzten Testsubstanzen zu 1,08% wurde jeweils mit einer entsprechend adaptierten Menge an Optigrain[®] aufgefüllt. Die Nährstoffzusammensetzung des Futters entsprach den empfohlenen Richtlinien für Ferkelfutter in der entsprechenden Altersstufe (GfE, 2006). Die Futteraufnahme der einzelnen Flatdecks wurde wöchentlich bestimmt. Die letzte Parameterbestimmung fand 39 Tage nach der Einstallung statt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4: Zusammensetzung des Starterfutters und des Ferkelaufzuchtfutters

(in %)	Starterfutter	Ferkelaufzuchtfutter
Optigrain ¹	35,5	-
Gerste	16,1	29,2
Sojaextraktionsschrot	15,3	19,0
Weizen	10,6	33,2
Sprühmagermilchpulver	9,00	-
Mais	7,00	11,0
Kohlensaurer Futterkalk	1,32	1,52
Mineralstoff-Vitamin-Premix ²	1,20	1,20
Monokalziumphosphat	1,10	1,45
Viehsalz	-	0,43
Sojaöl	1,00	1,65
L-Lysin	0,40	0,28
L-Threonin	0,16	-
DL-Methionin	0,15	0,07
L-Tryptophan	0,05	0,02
Optigrain ³ mit Futterzusatz	1,08	1,08

¹Optigrain® (DEUKA, Deutsche Tierernährung, Düsseldorf, Deutschland) ist eine hydrothermisch behandelte Mischung aus Weizen, Gerste und Mais (Deutsche Tiernahrung, Düsseldorf, Deutschland)

²Mineralstoff-Vitamin-Premix (Spezialfutter Neuruppin Ltd., Neuruppin, Deutschland)
 Gehalte je kg: 400.000 IE Vit. A; 40.000 IE Vit. D₃; 8.000 mg Vit. E (α -Tocopherolacetat); 300 mg Vit. K₃; 250 mg Vit. B₁; 250 mg Vit. B₂; 2.500 mg Nicotinsäure, 400 mg Vit. B₆; 2.000 μ g Vit. B₁₂; 25.000 μ g Biotin; 1.000 mg Pantothen säure; 100 mg Folsäure; 80.000 mg Cholinchlorid; 5.000 mg Zn (Zinkoxid); 2.000 mg Fe (Eisencarbonat); 6.000 mg Mn (Manganoxid); 1.200 mg Cu (Kupfersulfat, Pentahydrat); 45 mg I (Calciumjodat); 30 mg Co (Kobalt (II)-sulfat, Heptahydrat); 35 mg Se (Natriumselenit) 130 g Na (Natriumchlorid); 55 g Mg (Magnesiumoxid).

³Optigrain mit den jeweiligen Prüfungsstoffen: CO: + 1,08% Optigrain; DS: 0,2% DS + 0,88% Optigrain; BC: + 0,01% Toyocerin + 1,07% Optigrain; CM: + 0,9% CM + 0,18% Optigrain; PV: + 0,2% PV + 0,88% Optigrain. Die Differenz zu 1,08% wurde jeweils mit Optigrain ergänzt.

MATERIAL UND METHODEN

3.2.2. Futtermitteluntersuchung

Die Nährstoffgehalte der einzelnen Diäten wurden mittels Weender Analyse bestimmt (Naumann and Bassler, 1976). Die Mineralstoffkonzentrationen wurden nach der Veraschung mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) mit dem Messgerät Vario 6 (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) analysiert. Der Phosphoranteil wurde mittels der Molybdat-Vanadat-Methode gemessen.

Die Analysen der Rohnährstoffe und der Mineralstoffgehalte der Futtermischungen sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Analysierte Zusammensetzung der Ferkelstarterfutter

		CO	DS	BC	CM	PV
ME ¹ (berechnet)	MJ/kg	13,3	13,2	13,3	13,4	13,3
Trockensubstanz	g/kg	888	888	887	889	888
Rohprotein	g/kg TS	185	194	185	198	186
Rohfaser	g/kg TS	33,8	37,5	34,3	33,9	34,6
Rohfett	g/kg TS	20,6	21,6	18,5	16,9	20,0
Rohasche	g/kg TS	45,6	52,8	45,8	46,3	49,4
Stärke	g/kg TS	378	331	366	378	384
Kalzium	g/kg TS	7,50	7,82	7,21	7,53	7,24
Phosphor	g/kg TS	5,81	6,53	5,99	6,08	6,28
Natrium	g/kg TS	1,61	2,77	1,50	1,37	1,45
Kalium	g/kg TS	7,62	6,79	6,55	6,26	6,46
Magnesium	g/kg TS	1,90	1,97	1,80	1,69	1,73
Eisen	mg/kg TS	184	220	187	177	167
Mangan	mg/kg TS	73,2	98,1	72,8	73,9	72,5
Kupfer	mg/kg TS	13,3	20,9	13,9	13,5	11,5
Zink	mg/kg TS	70,0	93,4	72,3	74,1	69,1

¹ME (MJ/kg) = 0,021503 x g Rohprotein + 0,032497 x g Rohfett + 0,016309 x g Stärke + 0,014701 x g Organischer Rest – 0,021071 x g Rohfaser

Organischer Rest = Trockensubstanz – (Rohasche + Rohfett + Rohprotein + Rohfaser + Stärke)

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Analysierte Zusammensetzung der Ferkelaufzuchtfutter

		CO	DS	BC	CM	PV
ME ¹ (berechnet)	MJ/kg	12,9	13,5	13,1	13,2	13,3
Trockensubstanz	g/kg	873	875	880	878	880
Rohprotein	g/kg TS	172	170	168	176	177
Rohfaser	g/kg TS	45,0	38,1	42,2	38,9	35,2
Rohfett	g/kg TS	25,7	30,2	29,8	29,2	29,8
Rohasche	g/kg TS	41,0	49,1	46,3	53,2	51,1
Stärke	g/kg TS	398	357	386	378	388
Kalzium	g/kg TS	7,47	6,95	7,81	8,63	8,16
Phosphor	g/kg TS	5,81	6,53	5,87	6,58	6,52
Natrium	g/kg TS	1,69	2,38	1,41	2,29	2,27
Kalium	g/kg TS	5,66	5,81	6,01	6,31	6,17
Magnesium	g/kg TS	1,72	2,03	1,28	1,85	1,81
Eisen	mg/kg TS	213	185	188	257	239
Mangan	mg/kg TS	68,3	72,9	95,5	80,8	86,9
Kupfer	mg/kg TS	19,6	16,6	6,55	12,5	17,0
Zink	mg/kg TS	87,8	76,6	46,5a	85,0	96,6

¹ME (MJ/kg) = 0,021503 x g Rohprotein + 0,032497 x g Rohfett + 0,016309 x g Stärke + 0,014701 x g Organischer Rest – 0,021071 x g Rohfaser

Organischer Rest = Trockensubstanz – (Rohasche + Rohfett + Rohprotein + Rohfaser + Stärke)

3.2.3. Bestimmung der Rohnährstoffe (Weender Analyse)

Trockensubstanz

Jeweils 1-2 g der Futtermittelproben wurden in Wägeschiffchen eingewogen. Anschließend wurden die Proben für vier Stunden bei 105°C mit offenem Deckel getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Proben im Exsikkator auf Zimmertemperatur abgekühlt und mittels Rückwaage deren Trockensubstanz bestimmt.

Rohasche

Der Gehalt der Rohasche wurde durch die Einwaage von 1 g gemahlenem Futter in einem ausgeglühten Tiegel und Veraschung über Nacht bei 600°C in einem Muffelofen bestimmt. Die Rückwaage der Proben erfolgte nach Abkühlung im Exsikkator.

MATERIAL UND METHODEN

Rohprotein

Die Bestimmung des Rohproteins erfolgte über die Messung des Stickstoffgehaltes der einzelnen Proben mittels Makro-Elementaranalysators (Dumas Verfahren).

Rohfett

Der Gehalt des Rohfettes wurde durch eine Extraktion mittels Soxhlet-Apparatur ermittelt. Als Lösungsmittel wurde Petrolether eingesetzt. Nach einer Extraktionszeit von drei Stunden und vollständigem Abdampfen des Lösemittels erfolgte die Rückwaage der Proben und die Berechnung des Rohfettgehaltes.

Rohfaser

Durch Einsatz eines Rohfaser-Analysators wurde der Rohfasergehalt bestimmt. Dabei wurden die Proben in 1,25%iger Schwefelsäure und anschließend mit 1,25% NaOH gekocht, bei 105°C im Trockenschrank getrocknet, gewogen und im Muffelofen bei 500°C verascht. Die Berechnung erfolgte durch die Subtraktion des Rohaschegewichtes vom Trockengewicht der Probe.

Stärke

Die Stärke wurde über einen enzymatischen UV-Test bestimmt. Das Testprinzip basiert auf einer enzymatischen Spaltung von Stärke zu D-Glukose. Durch weitere Umwandlung des Zuckers wird NADPH gebildet. NADPH entspricht proportional der Menge an D-Glukose, die durch die Hydrolyse der Stärke gebildet wird. Die NADPH-Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm.

3.2.4. Mineralstoffbestimmung

Probenvorbereitung

Die Futterproben wurden nach der Veraschung im Muffelofen mit 20 ml destilliertem Wasser und 6 ml HCl (37-38%) versetzt. Anschließend erfolgte eine 50minütige Erhitzung (250°C) der Proben in einem Sandbad. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

MATERIAL UND METHODEN

Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium

Die Mineralstoffgehalte wurden in einer Aschelösung durch Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt.

Phosphor

Zur Bestimmung von Phosphor wurden 500 µl der Probenaschelösung mit 5 ml HNO₃ (134 ml, w = 65%) und 200 µl P-Komplexbildner (Ammoniummolybdat) versetzt. Danach wurde das Volumen der Probenlösung auf 20 ml mit destilliertem Wasser eingestellt. Durch das salpetersaure Milieu bildete der in der Probe enthaltene Phosphor einen Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen und der Phosphorgehalt mittels einer Eichkurve bestimmt werden konnte.

3.2.5. Versuchsdurchführung

Leistungsparameter

Körpermasseentwicklung

Jedes Tier wurde bei der Einstellung und innerhalb des Fütterungszeitraumes einmal wöchentlich gewogen.

Futteraufnahme

Die Ermittlung der Futteraufnahme pro Flatdeck erfolgte wöchentlich. Diese wurde rechnerisch anhand der Differenz aus Futtereinwaage und Rückwaage des verbleibenden Futters im Futterautomat bestimmt.

Futteraufwand

Dieser wurde anhand der mittleren Lebendmassezunahme und der mittleren Futteraufnahme ermittelt.

Blutentnahme

Während des Versuchszeitraumes fanden vier Blutentnahmen statt. Die erste Entnahme erfolgte eine Woche nach der Einstellung der Ferkel durch Punktion der Vena cava cranialis. Die drei weiteren Blutentnahmen erfolgten 7, 14 und 21 Tage nach der PRRSV

MATERIAL UND METHODEN

Impfung (Tag 0, Alter 4 Wochen). Das Blut (21 ml) wurde mittels einer S-Monovette® (Lithium-Heparin, 4,9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen.

PRRSV Immunisierung

Die PRRSV Impfung (4,9 log₁₀ GKID50 PRRS-Virus (Stamm ATCC VR 2332) (2 ml Ingelvac®PRRS MLV, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) der vier Wochen alten Ferkel erfolgte eine Woche nach der Einnistung und nach der ersten Blutentnahme. Den Tieren wurden 2 mL des Impfstoffes intramuskulär verabreicht.

Gewinnung von Probenmaterial

Von jeder Blutprobe wurden 100 µl für die Phänotypisierung der Immunzellen im Durchflusszytometer verwendet. Ein Minimum von 2 ml Heparinblut wurde für die Blutzellzahlbestimmung verwendet (Laboklin, Bad Kissingen, Deutschland). Separat wurde je 1 ml Blut für die Plasmagewinnung bei 800 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Blutplasma wurde bei -80°C gelagert. Das restliche Blut wurde verwendet, um die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) zu gewinnen.

Isolierung, Einfrierung und Lagerung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Die heparinisierten Vollblutproben wurden 1:1 in PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ pro Liter aqua bidest.) verdünnt. Danach wurden die verdünnten Blutproben vorsichtig auf 15 ml Lymphozyten-Separations-Medium (LSM) von Biocoll (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gegeben und in sterile 50 ml konische Zentrifugenröhrchen überführt. Das Volumen wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation (Thermo Scientific, Heraeus™ Megafuge™ 16 R, Bonn, Deutschland) für 30 min bei 500 x g und 20°C, bei denen die PBMC abgetrennt wurden. Die mononukleäre Zellschicht wurde vorsichtig mittels 5 ml Pipette aufgesaugt und in 50 ml mit Eis vorgekühlte Greinerröhrchen transferiert. Es folgte eine zweimalige Waschung der Zellen mit PBS (2,5 x Volumen der Zellschicht) und die nachfolgende Zentrifugation bei 400 g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden anschließend in PBS resuspendiert. Vier ml eines sterilen

MATERIAL UND METHODEN

Lysenpuffers (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ und 0,1 mM EDTA) wurden für 2 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Danach wurde mit PBS gewaschen und bei 300 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml RPMI 1640 inklusive 10% Schweineserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Nach der Zellzählung in einer modifizierten Zählkammer (C-Chip, Hemocytometer, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mittels Trypanblaufärbung wurden die Zellen unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und in ein Gefriermedium (1:10 DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) : RPMI 1640 inklusive 10% Schweineserum (beides Biochrom AG, Berlin, Deutschland) überführt und via Freezing Container (Nalgene, Freezing Container für 1-2 ml Kryotubes, PC, Thermo Fischer Scientific, Deutschland) bei -80°C tiefgefroren und bis zur ELISpot Untersuchung aufbewahrt.

3.2.6. Immunologische Methoden

Hämatologische Untersuchungen

Sofort nach der Blutentnahme mittels S-Monovette® wurden die heparinisierten Blutproben verwendet. Zuerst wurden die Proben für die Phänotypisierung der Lymphozyten entnommen. Danach wurden die Blutproben für die hämatologische Untersuchung sowie die Bestimmung des Differentialblutbildes an die Firma Laboklin (Bad Kissingen) versendet.

Phänotypisierung der Immunzellen im Durchflusszytometer

Je 100 µl des heparinisierten Blutes wurden in FACS-Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe der Antikörper.

MATERIAL UND METHODEN

Prinzip der durchflusszytometrischen Messung und Anwendung in der vorliegenden Studie

Die Durchflusszytometrie oder fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ermöglicht eine quantitative Erfassung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage des Verfahrens ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper an antigene Oberflächenstrukturen von Zellen binden. Die so markierten Zellen werden einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, sodass die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt werden. Nach Passieren des Laserstrahls fallen die Elektronen unter Abgabe von Photonen auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab und die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Fotodetektor registriert. Diese verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist ein gleichzeitiger Einsatz verschiedener Farbstoffe möglich. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die eingesetzten Farbstoffe in der vorliegenden Studie. Neben der Information zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle und Zellsuspension werden anhand der Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellmorphologie ermöglicht. Dabei stellt die gemessene Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter) ein Maß für die Zellgröße und die im 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter) ein Maß für die Granularität der Zellen dar. In der vorliegenden Studie wurde die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse eingesetzt, um mithilfe fluoreszenzfarbstoffmarkierter monoklonaler Antikörper die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu detektieren. Hierfür stand als Analysengerät das Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, USA) zur Verfügung. Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA)

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7: Phänotypisierung der Blutleukozyten (Passlack, 2010)

Phänotyp	Zelltyp
CD2 ⁺ CD5 ⁻	NK-Zellen
CD2 ⁻ CD5 ⁺	B-Zellen und CD2 ⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen
CD2 ⁺ CD5 ⁺	$\alpha\beta$ T-Zellen (gesamt) und CD2 ⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen
CD4 ⁺ CD8 α ⁻	naive T-Helferzellen
CD4 ⁺ CD8 α ⁺	Gedächtnis-T-Helferzellen
CD4 ⁻ CD8 α ⁺	Zytotoxische T-Helferzellen
CD14 ⁺	Makrophagen und Monozyten
CD21 ⁺	B-Zellen

CD = Cluster of Differentiation

Die Antikörper wurden vorverdünnt (Tabelle 8 und Tabelle 9). Hierbei wurden nach der Verdünnung für den primären Antikörper 25 μ l auf 10 μ l Vollblut und für den sekundären Antikörper nach der Verdünnung 50 μ l eingesetzt.

Tabelle 8: Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten primären Antikörper

Primärer Antikörper	Isotyp	Bezeichnung	Hersteller	Vorverdünnung
CD2	IgG2 α	MSA4, α CD2 pig	VMRD	1:500
CD4 α	IgG2 β	Mouse Anti-porcine CD4a-FITC (74-12-4)	Southern Biotechnology Ass.	1:200
CD5	IgG1	α CD5 (9G12)	VMRD	1:500
CD8 α	IgG2 α	Mouse Anti-porcine CD8 α -RPE (76-2-11)	Southern Biotechnology Ass.	1:100
CD14	IgG2 β	α -porcine CD14 (MCA1218)	Serotec	1:50
CD21	IgG1	Mouse Anti-porcine CD21 (BB6-11C9.6)	Southern Biotechnology Ass.	1:200

CD = Cluster of Differentiation

Es wurden monoklonale Antikörper verwendet, die gegen porcine Oberflächenmoleküle gerichtet waren. Für die Markierung von CD4 α und CD8 α wurden direkt konjugierte Antikörper verwendet. Zur Detektion aller anderen primären Antikörper war die Verwendung von sekundären Antikörpern notwendig. Diese waren mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde ein grün

MATERIAL UND METHODEN

fluoreszierendes Molekül Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und ein gelb-rot fluoreszierendes Molekül Phycoerythrin (PE) eingesetzt. Eine Übersicht der eingesetzten Sekundärantikörper ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung des primären Antikörpers

Sekundärer Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Darstellung des primären Antikörpers	Vorverdünnung
Anti Mouse IgG1	FITC	CD5	1:100
Anti Mouse IgG1	PE	CD21	1:200
Anti Mouse IgG2 α	PE	CD2	1:200
Anti Mouse IgG2 β	FITC	CD14	1:100

Zur Phänotypisierung der Immunzellen per Durchflusszytometrie wurden die Antikörper nach Anweisung (siehe Tabelle 8) entsprechend vorverdünnt. Für jedes Tier und jede Färbung wurden 10 μ l Vollblut mit einer sterilen Pipettenspitze auf den Boden eines FACS Röhrchens (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Dabei wurde für jedes Tier eine Negativkontrolle eingeplant (keine Färbung, Kontrolle als Autofluoreszenz). Für jedes Tier wurden 4 Röhrchen verwendet. Dabei wurde ein Röhrchen für die ungefärbte Probe, ein Röhrchen für die Messung von CD2 + CD5, ein Röhrchen für CD14 + CD21 und ein Röhrchen für CD4 α + CD8 α Messung eingesetzt. Zu den 10 μ l Vollblut werden 25 μ l der individuell verdünnten primären Antikörper hinzugefügt und mit einer Eppendorfpipette vermischt. In die ungefärbten Kontrollproben werden 25 μ l PBS hinzugegeben. Anschließend werden die Proben gevortext und für 25 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die nichtgebundenen Antikörper mit 2 ml PBS versetzt und bei 390 x g für 5 Minuten und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle Probenröhrchen wurden gleich behandelt. Anschließend wurde das Zellsediment mit je 50 μ l des sekundären Antikörpers resuspendiert. Für die ungefärbten Proben sowie für CD4 und CD8 wurden 50 μ l PBS hinzugegeben. Alle Proben wurden im Ständer für 30 Sekunden vorgemischt und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.

Ohne Waschung wurde nach der Inkubation auf jede Probe 900 μ l Aqua bidest. hinzugegeben. Danach wurde jedes Röhrchen dreimal für 2-3 Sekunden durchmischt.

MATERIAL UND METHODEN

Anschließend wurden 100 µl 10fach PBS (10 x konzentriert) pro Probe hinzugefügt und gut vermischt. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 390 x g für 5 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch mittels eines 488nm Argon Lasers im FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen.

Auswertung der Messergebnisse der Phänotypisierung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels der Software CellQuest[®]Pro zur Ermittlung des relativen Anteils und der verschiedenen Immunzellpopulationen. Hierfür wurde für die Auswertung ein Streudiagramm verwendet, in dem die morphologischen Parameter Größe (Darstellung im Forward Scatter, FSC-H) und Granularität (Darstellung im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen wurden. Auf diese Weise konnten Lymphozyten von Granulozyten, Monozyten und von Zellresten (Debris) unterschieden werden (Abbildung 8a).

Um Zelldetritus, Erythrozyten und Granulozyten auszuschließen, wurde anhand der morphologischen Kriterien der Zellen eine Region (Gate) um alle detektierten Lymphozyten und Monozyten gelegt (R1, Abbildung 8a). Die Fluoreszenzeigenschaften dieser Zellen wurden anschließend analysiert. Auf diese Weise konnte anhand der Festlegung von Quadranten der relative Anteil an FITC-positiven, PE-positiven sowie FITC- und PE-doppelt-positiven Zellen ermittelt werden (Abbildung 8b).

MATERIAL UND METHODEN

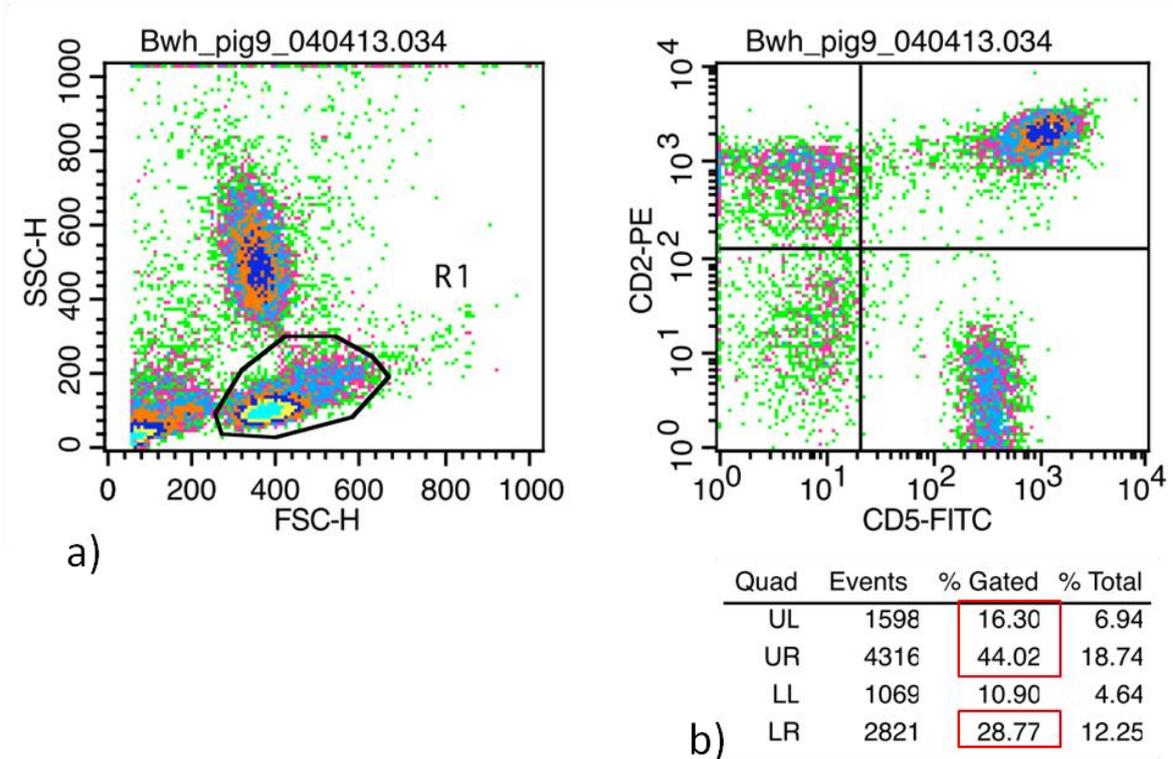


Abbildung 8: Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten im Blut

a) Darstellung der Zellen anhand ihrer Größe (FSC-H) und ihrer Granularität (SSC-H) zur Differenzierung der isolierten PBMC von Zelldetritus, Granulozyten und Erythrozyten. Zusammenfassung der Zellen in einer Region (R1).

b) Darstellung der Quadrantenanalyse der Fluoreszenzeigenschaften der Zellen (R1) nach der Färbung von CD2 mit Phycoerythrin (PE, zu sehen im FL2-H Detektor) und CD5 mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, zu sehen im FL1-H Detektor). Der anti CD2 Antikörper war PE und der anti CD5 Antikörper FITC-markiert, sodass im rechten unteren Quadranten (lower right, LR) die $CD2^-CD5^+$ Zellen (B-Zellen und $CD2^- \gamma\delta$ T-Zellen), im linken oberen Quadranten (upper left, UL) die $CD2^+CD5^-$ Zellen (NK-Zellen) und im rechten oberen Quadranten (upper right, UR) die $CD2^+CD5^+$ Zellen ($\alpha\beta$ T-Zellen (gesamt), $CD2^+ \gamma\delta$ T-Zellen) dargestellt wurden.

MATERIAL UND METHODEN

Bestimmung der PRSSV-spezifischen Immunglobulinkonzentrationen (IgG) im Plasma

Die Antikörpertiterbestimmung gegen PRRSV wurde mittels ELISA in Plasmaproben durchgeführt. Dafür wurden die Blutzellen bei Raumtemperatur mittels Zentrifugation (800 x g, 4°C für 10 min) sedimentiert und das Plasma mittels Pipette abgenommen und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt. Für die Analyse wurden die Plasmaproben an die Firma BioScreen (European Veterinary Disease Management Center GmbH, Hannover, Deutschland) in gefrorenem Zustand versendet. Die Werte wurden als relative optische Dichte dargestellt und übermittelt.

Bestimmung von IFN- γ sezernierenden Zellen mittels ELISpot Assay

Grundlagen des ELISpot Assays

Der ELISpot Assay (Enzyme Linked Immuno Spot Assay), ausgehend von einer Weiterentwicklung des Standard-ELISA-Assays, dient zur Erfassung der Antikörpersekretion von B-Zellen sowie zum Nachweis sezernierter Zytokine (IFN- γ), die von einzelnen Immunzellen (T-Zellen) nach Stimulation mit spezifischen Antigenen an einer Membran immobilisiert werden.

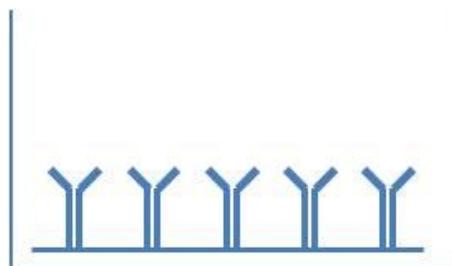
In vorliegendem Versuch erfolgte die Simulation mithilfe eines attenuierten MLV-PRRSV Lebendimpfstoffs.

MATERIAL UND METHODEN

Folgende Schritte umfasste die Durchführung des ELISpot Test:

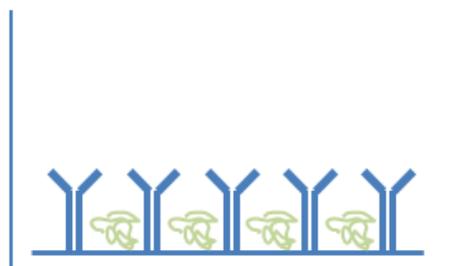
1. Antikörper-Beschichtung:

Die Platte wird mit einem antigenspezifischen Fängerantikörper beschichtet.



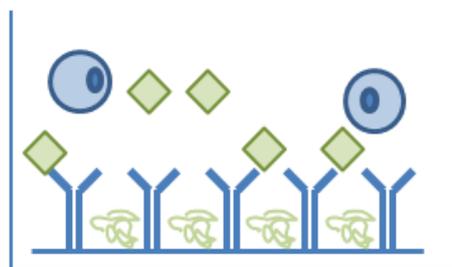
2. Blocken:

Mit Hilfe des Kulturmediums RPMI 1640 + 10% FCS erfolgt das Blocken der ELISpot Platte.



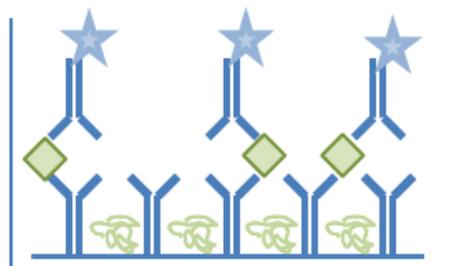
3. Zell-Stimulans und Inkubation:

Die zu untersuchenden Zellen (PBMC) werden zusammen mit entsprechenden Stimuli (Peptid-Antigen: PRRSV Impfstoff Verdünnung oder positive Kontrolle Con A), welche die Zytokinausschüttung bewirken, auf die Platte aufgetragen. Während der Inkubation werden die Zytokine (IFN- γ) durch den immobilisierten Antikörper auf der Platten-Oberfläche eingefangen.



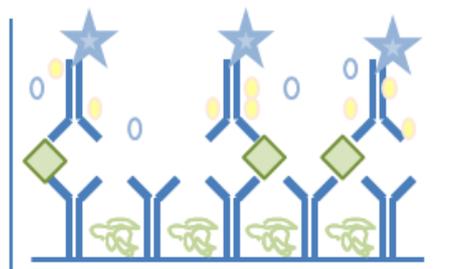
4. Waschen und Detektion:

Nach dem Waschen der Platte erfolgt die Zugabe eines biotinylierten Detektionsantikörpers. Dieser heftet sich an das fixierte Zytokin an.



5. Färbung:

Mit Hilfe eines Avidin-Konjugats und eines farbigen Fällungssubstrates wird das sekretierte Zytokin (IFN- γ) farblich sichtbar gemacht.



MATERIAL UND METHODEN

6. Auswertung:

Nach dem Trocknen werden die IFN- γ Spots mithilfe eines ELISpot Readers ausgewertet. Die Auswertung erfolgt in SFU (Spot Forming Units).



Auswertung des ELISpot Assays:

1) **Spot:**

Jeder einzelne Farbpunkt entspricht einer zytokinsezernierenden Zelle. Die Flecken können mit dem Auge oder unter Verwendung eines automatischen Plattenlesegerätes (Reader) gezählt werden.

2) **Spot-Größe:**

Die Größe des Spots ist ein Hinweis auf die Produktivität pro Zelle und die Avidität der Bindung. Je höher die Avidität der T-Zell-Erkennung, desto höher ist die Produktivität. Dies zeigt sich in großen, gut definierten Spots.

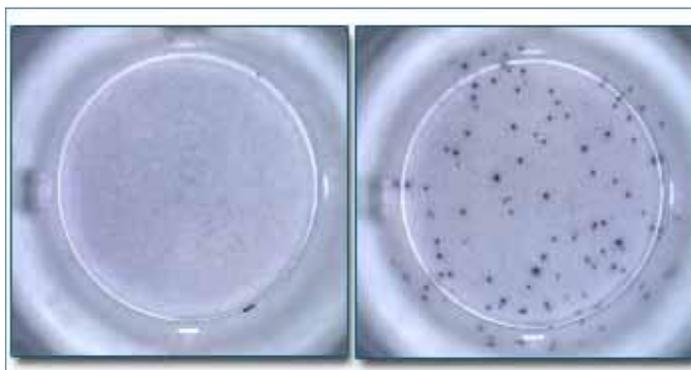


Abbildung 9: Darstellung eines negativen ELISpots (links) im Vergleich zu einem positiven ELISpot (rechts) in der Aufsicht. Jeder einzelne Spot stellt die Anwesenheit einer sekretierenden Zelle dar (AID, 2008)

MATERIAL UND METHODEN

Beispiel ELISpot Daten

Unten dargestellt wird ein typischer Platten-Scan-Readout eines IFN- γ ELISpot-Tests. In diesem Test wurden 3×10^5 Zellen pro Vertiefung ausplattiert und für 48 Stunden stimuliert. Negative Kontrolle mit Medium und positive Kontrolle mit Con A.

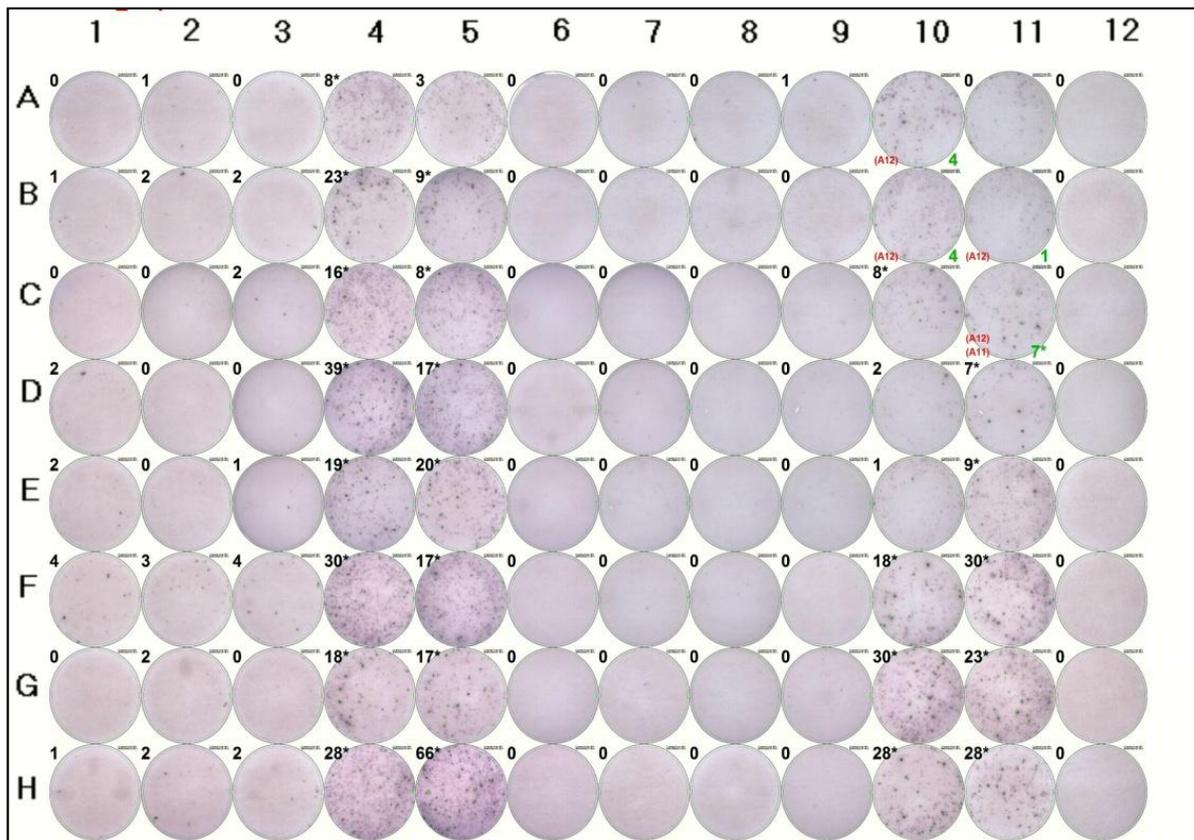


Abbildung 10: ELISpot Readout eines CTL ImmunoSpot[®]S5 (Micro Analyzer, Cleveland, USA). Die Zellen der Reihen 1-3 (A-H) und 6-8 (A-H) wurden mit PRRSV Impfstoff stimuliert. Die Zellen der Reihen 4-5 (A-H) und 10-11 (A-H) wurden mit dem Mitogen Con A (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ u. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Reihe 6 (A-H) und Reihe 12 (A-H) enthielten nur Medium ohne Zellen

Auftauen und Zählen der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC):

In einem 15 ml Plastikreaktionsgefäß wurden 10 ml RPMI 1640 mit 10% FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) sowie 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) vorgelegt und im Wasserbad bei 37°C für 5 min erwärmt. Für das Auftauen der isolierten Lymphozyten wurde das entsprechende Kryogefäß mit eingefrorenen Zellen im auf 37°C vorgeheizten Wasserbad schnell, bis nur noch ein kleiner Eiskristall

MATERIAL UND METHODEN

vorhanden war, aufgetaut. Danach wurde das Zell-Mediumgemisch in ein Greinertuberöhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 10 min mit 300 x g zentrifugiert.

Zum Schluss wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung in einer Neubauer Zählkammer geprüft und sollte über 70% liegen.

Durchführung des ELISpot Assays

Um den ELISpot Assay durchführen zu können, waren mehrere Schritte notwendig. Am ersten Tag wurde die 96-Well ELISpot Platte (Multiscreen Assay System, Millipore, Billerica, MA, USA) mit 35% Ethanol (v/v in H₂O) und je 25 µl pro Vertiefung mit einer Einwirkzeit von einer Minute gereinigt und aufgeraut. Danach wurde das Alkohol-Wassergemisch mithilfe von 150 µl unter dreimaligem Waschen mit sterilem PBS entfernt. Die Platte wurde dann mit 100 µl/Gefäß und auf 10 µg/ml mit PBS verdünnten Coating-Antikörper (mouse anti-swine IFN-γ, Mabtech. Inc., Cincinnati, USA) beschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurde die Coating-Antikörper-Lösung unter dreifachem Waschen mit 200 µl steriler PBS entfernt. Das Blocken der Platte wurde mithilfe von 200 µl des Kulturmediums RPMI-1640 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 10% FCS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Während dieser Zeit erfolgte die Vorbereitung der benötigten Zellstimuli (Ingelvac® PRRS MLV 1:1 RPMI 1640 mit 10% FCS; Con A 3 µg/ml und Con A 5 µg/ml (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), die jeweils als positive Kontrolle eingesetzt wurden. Die aufgetauten Zellen wurden nach dem Zählen auf eine Konzentration von 3×10^5 Zellen/Vertiefung mittels RPMI 1640 und 10 % FCS eingestellt. Das Medium wurde nach der Einwirkzeit entfernt und die vorbereiteten Zellstimuli sowie die Zellverdünnung (100 µl/Vertiefung) aufgetragen und für 40 bis 48 Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (Mettler INCOmed, Deutschland) inkubiert.

MATERIAL UND METHODEN

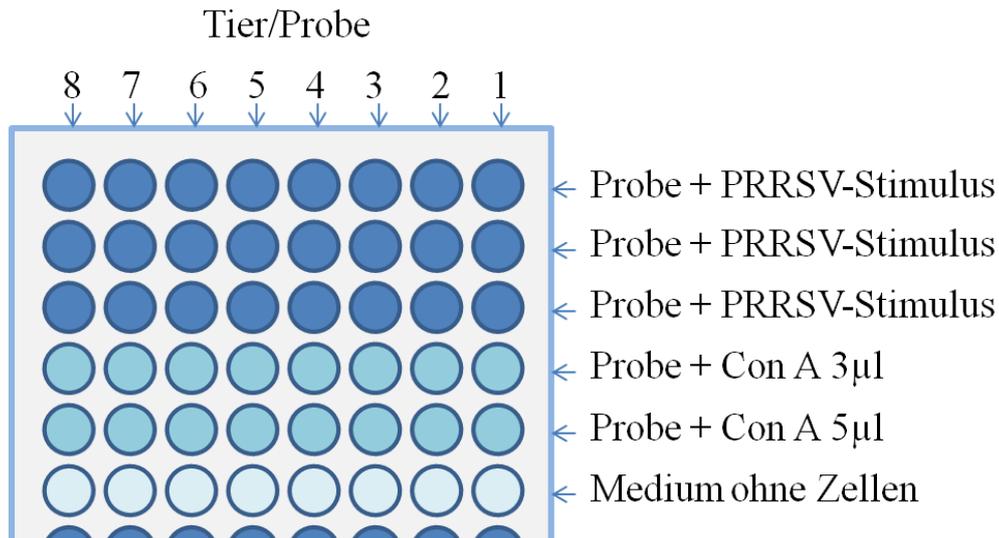


Abbildung 11: Pipettierschema einer halben ELISpot Platte: Endvolumen entsprechend 200 µl, bestehend aus 100 µl Zellstimulus und 100 µl Zellsuspension bzw. 200 µl reines Medium ohne Zellen (Kontrolle). Als positive Stimulans wurde das Mitogen Con A (3µg/ml und 5µg/ml) eingesetzt. Der PRRSV Stimulus wurde mit Kulturmedium 1:1 verdünnt und anschließend auf die Platte aufgetragen (Endkonzentration des Stimulans auf der Platte = 1:4)

Nach der Inkubation wurden die Ansätze dekantiert und zweimal mit Wasser (200 µl) und dreimal mit PBS mit 0,01% Tween20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gewaschen. Danach wurde der Detektionsantikörper (mouse anti-swine IFN-γ, biotinkonjugiert, Mabtech, Inc., Cincinnati, USA) in PBS-Lösung inklusive des Zusatzes von 0,01% Tween20 und 0,1% BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) auf 1 µl/ml verdünnt. Es wurden 100 µl der Antikörperverdünnungslösung zu dem Ansatz pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte viermal mit einer PBS-Lösung mit 0,01% Tween20 gewaschen. Das Streptavidin-Alkaline Phosphatase Konjugat (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) wurde auf 1:2000 mit 0,01% Tween20 in PBS verdünnt und zu 100 µl/Well auf die Platte gegeben und eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Lösung dekantiert und die Platte dreimal mit PBS-Lösung mit 0,01% Tween20 und zweimal mit reiner PBS gewaschen. Die Substratlösung wurde mittels einer BCIP/NDT-Substrat-Tablette (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hergestellt (10 ml Wasser/Tablette). Nach der Substratauflösung und folgender Filtration wurden je 100 µl pro Gefäß für 5 Minuten zur Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln aufgetragen. Gestoppt wurde die Spotentwicklung durch intensives Waschen mittels fließendem Wasser und Abnahme des

MATERIAL UND METHODEN

Plastikbodenschutzes der Platte. Nach der Trocknung wurden die Platten verpackt und an die Firma BioScreen (European Veterinary Disease Management Center GmbH, Deutschland) in Hannover versendet. Dort wurden diese mittels eines ELISpot Readers (CTL ImmunoSpot[®]S5 Micro Analyzer, Cleveland, USA) ausgewertet. Die letzten Arbeitsschritte erfolgten unter nicht sterilen Bedingungen. In allen Fällen wurden unstimulierte Zellen und Con A stimulierte positive Kontrollen eingesetzt.

3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des *in vivo* und *in vitro* Versuches erfolgte mittels SPSS 19.0 (IBM, Somers, NY, USA).

Normalverteilte Daten wurden innerhalb des *in vitro* Infektionsversuches mittels einfaktorieller ANOVA ausgewertet. Dabei wurden die Futterzusatzstoffe als feste Faktoren eingesetzt und über den Post-Hoc Tukey-Test analysiert. Ergebnisse mit einem P -Wert $\leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Die Datenverteilung im *in vivo* Versuch wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test und Lilliefors Korrektur ausgewertet. Das allgemeine lineare Modell von SPSS wurde unter Berücksichtigung der Wiederholungsmessungen (Repeated Measures) innerhalb des *in vivo* Versuches für die Bestimmung der Leistungsparameter verwendet, um die Mittelwerte der einzelnen Gruppen bei Mehrfachbestimmungen untereinander vergleichen zu können. Die einfaktorielle ANOVA wurde auch für die Auswertung der ELISpot Ergebnisse herangezogen. Für alle Ergebnisse wurden P -Werte $\leq 0,05$ als signifikant gewertet. Die experimentelle Einheit war jeweils die Bucht mit zwei Tieren.

ERGEBNISSE

4. ERGEBNISSE

4.1. *In vitro* Untersuchungen

4.1.1. Einfluss auf die Interaktion zwischen einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie mittels Bestimmung des TEER

Bei der Untersuchung von verschiedenen Futterzusatzstoffen auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und der IPEC-J2 Zelllinie wurde die TEER-Messmethode eingesetzt. Für diese Bestimmung wurde das Versuchsdesign neu etabliert und zu Beginn die Funktionsfähigkeit mittels Infektion der IPEC-J2 Zellen mit einem pathogenen und einem nicht pathogenen *E. coli* Stamm getestet. Als positive Infektion wurde der pathogene *E. coli* Stamm Abbotstown eingesetzt, der sich mithilfe seiner F4-Fimbrien an die IPEC-J2 Zellverband anheften kann. Als negative Kontrolle wurde der nicht pathogene *E. coli* Stamm DSM 2840 verwendet. Innerhalb des Vorversuches zeigt sich, dass die TEER-Werte beider Kontrollen bis zum Zeitpunkt der Infektion stetig anstiegen (Abbildung 12). Nach der Infektion war diese Zunahme des TEER-Werts bei Verwendung des Stamms DSM 2840 weiter festzustellen, während die Infektion mit dem pathogenen Stamm einen reduzierten TEER-Wert von $4172 \Omega \text{ cm}^2$ auf $1795 \Omega \text{ cm}^2$ verursachte. Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass der nicht pathogene Stamm DSM 2840 keinen vergleichbaren negativen Einfluss auf die Zelllinie besitzt wie der pathogene Stamm. Dieses Versuchsergebnis bestätigte die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Infektionsmodells (siehe Anhang Tabelle 19). Bei jeder Untersuchung der verschiedenen Futterzusatzstoffe mit oder ohne Infektion wurde immer eine Kontrolle mit den entsprechenden Futterzusätzen ohne Bakterieninfektion mitüberprüft (Kontrolle, ohne Infektion).

ERGEBNISSE

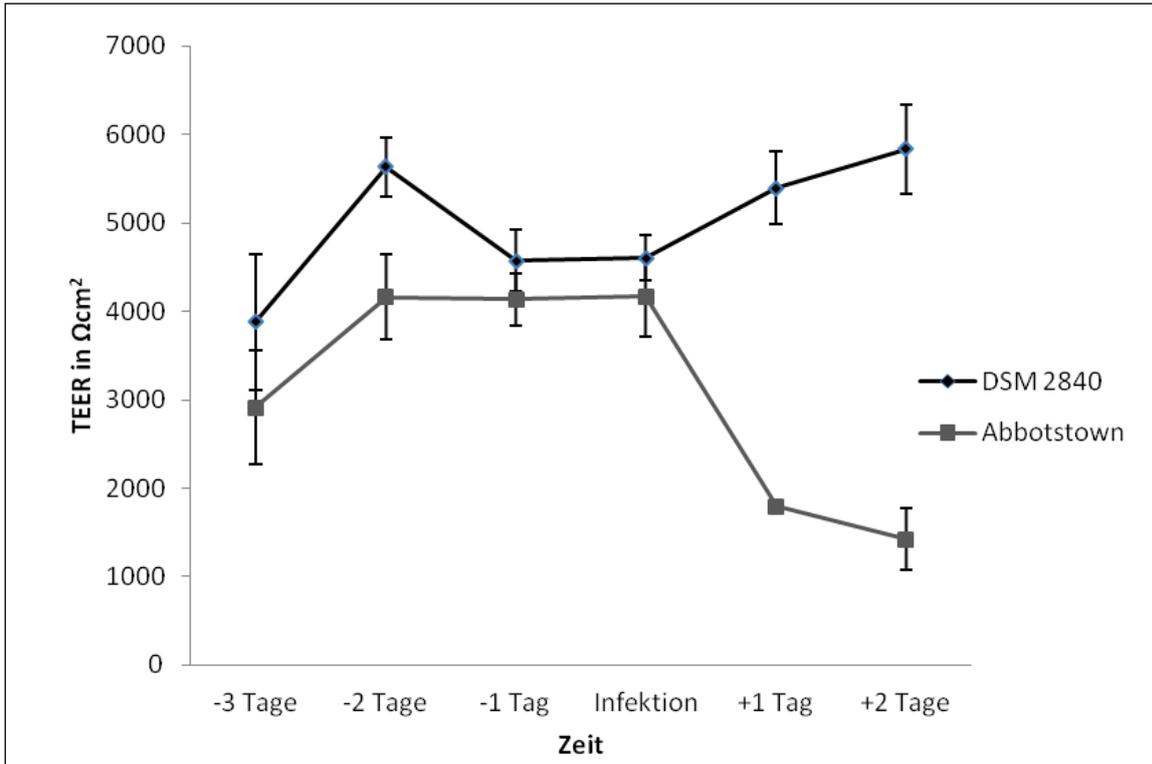


Abbildung 12: Darstellung des TEER Verlaufes einer IPEC-J2 Zelllinie während einer Infektion mit einem F4 positiven *E. coli* Stamm Abbotstown als positive Infektionskontrolle und zum Vergleich mit einem F4 negativem *E. coli* Stamm DSM 2840 als negative Infektionskontrolle (n = 3)

4.1.2. Einfluss von Extrakten auf den Transepithelialen Elektrischen Widerstand (TEER) einer IPEC-J2 Zelllinie

Die Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes von IPEC-J2 Zellen zeigte im Vergleich zur Mediumkontrolle beim Einsatz verschiedener Extrakte (Säuremischung (AM), Ananasstamm (Bromelain (BM)), Kolostrum (CM), Steinfruchtkerne (DS), Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae* (PV) und Thymianextrakt (TY)) unterschiedlicher Konzentrationen (10^{-2} g/l – 10^{-5} g/l) innerhalb einer Versuchsdauer von 15 Tagen keine Effekte ($P > 0,05$) (Tabelle 10).

Während der gesamten Versuchsperiode konnte ein stetiger Widerstandsanstieg bei Inkubation der Zellen mit allen Extraktkonzentrationen, mit Ausnahme des Bromelains, festgestellt werden. Der Transepitheliale Elektrische Widerstand entwickelte sich vergleichsweise einheitlich von Beginn an mit einem Durchschnittswert von $231 \Omega \text{ cm}^2$ bis zu $10000 \Omega \text{ cm}^2$ nach 15 Tagen. Eine Ausnahme bildete der verwendete Bromelainextrakt, bei dessen Verwendung eine Zellschädigung festzustellen war. Innerhalb der gesamten

ERGEBNISSE

Versuchsreihen mit den jeweiligen Extrakt-Konzentrationen 10^{-2} g/l und 10^{-3} g/l konnten keine signifikanten Änderungen festgestellt werden (siehe Anhang Tabelle 20).

Tabelle 10: Mittelwerte des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von nicht infizierten IPEC-J2 Zellen nach der Behandlung verschiedener Extraktverdünnungen mit den Konzentrationen 10^{-2} g/l bis 10^{-5} g/l

Extrakt (n = 3)	Tag				
	3	6	9	12	15
Kontrolle	209	1554	3930	5708	8057
	Extraktverdünnung 10^{-2}				
AM	282	2702	4094	4820	6541
CM	243	3285	5943	7042	9320
DS	223	1946	2528	3353	4792
PV	277	3018	4620	7590	8219
TY	260	3198	5917	8638	10260
SEM²	29	387	617	836	772
P-Wert³	0,977	0,864	0,412	0,229	0,153
	Extraktverdünnung 10^{-3}				
AM	162	2470	4095	5771	7353
CM	173	1934	4611	7775	8666
DS	165	2263	3924	6096	7751
PV	352	2519	3485	5337	6901
TY	192	1704	2545	5529	7292
SEM²	24	418	577	786	702
P-Wert³	0,028*	0,978	0,879	0,941	0,964
	Extraktverdünnung 10^{-4}				
AM	180	1897	2852	4714	6025
CM	195	3396	6400	7251	10175
DS	204	1668	3355	5446	7197
PV	310	2209	3360	5384	7353
TY	205	1815	3514	5539	6895
SEM²	26	348	550	642	691
P-Wert³	0,571	0,706	0,261	0,891	0,434
	Extraktverdünnung 10^{-5}				
AM	183	1651	2748	4486	5335
CM	228	5002	6892	7499	9173
DS	216	2090	4237	6387	6670
PV	392	2441	3216	5020	7646
TY	255	2332	4108	6706	7861
SEM²	31	445	600	757	756
P-Wert³	0,237	0,243	0,218	0,797	0,644

¹AM = Säurenmischung, CM = Kolostrum, DS = Steinfruchtkerne, PV = Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*, TY = Thymianauszüge

²Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

³Vergleich der Mittelwerte innerhalb derselben Spalte bei gleicher Extraktverdünnung

*Signifikanz bei Werten $< 0,05$

ERGEBNISSE

4.1.3. Einfluss der Testsubstrate (6 und 24h Einwirkzeit) auf die zelluläre Interaktion zwischen einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und einer IPEC-J2 Zelllinie mit Bestimmung des TEER

Die Widerstände der zwei unterschiedlichen Versuchsreihen (6 und 24h Einwirkzeit der Extrakte) wurden vor und nach der Infektion mit einem pathogenen *E. coli* Stamm bestimmt. Der transepitheliale elektrische Widerstand erhöhte sich vergleichsweise einheitlich innerhalb aller Gruppen nach der Einwirkzeit von 6h in dem Bereich von $4148 \Omega \text{ cm}^2 - 6822 \Omega \text{ cm}^2$ (Tabelle 21) und mit der Einwirkzeit 24h in dem Bereich von $2643 \Omega \text{ cm}^2 - 3559 \Omega \text{ cm}^2$ (Tabelle 22), gemessen jeweils vor der experimentellen ETEC-Infektion. Bei beiden Versuchsreihen (6 und 24h Einwirkzeit) konnten keine signifikanten Effekte der unterschiedlichen Extraktverdünnungen festgestellt werden. Die Daten nach 6 und 24h Einwirkzeit aller Testsubstanzen (inkl. Bromelain) finden sich im Anhang.

Wie bereits im Vorversuch aufgezeigt werden konnte, verursachte die Infektion mit dem pathogenen *E. coli*-Stamm eine signifikante Widerstandsreduzierung. Dabei sanken die TEER-Werte der infizierten Kontrolle im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrolle auf ca. 55% des Anfangswertes. Bei der Zugabe der Versuchsextrakte konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden, wobei Bromelain von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurde. Die Widerstandswerte sanken infektionsbedingt auf 40 – 62% des Anfangswertes (Tabelle 11). Innerhalb der Messreihe mit Bromelain konnte ein signifikanter Unterschied ($P = 0,03$) im Vergleich zu den anderen Extrakten auf den TEER-Wert festgestellt werden (siehe Anhang Tabelle 21 und Tabelle 22).

ERGEBNISSE

Tabelle 11: Mittelwert des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und nach der 24-stündigen Behandlung mit verschiedenen Extrakten (Verdünnung: 10^{-2} g/l) sowie auftretender TEER Abfall nach der Infektion (ohne Bromelain), Mittelwert \pm Standardabweichung

Extrakt	TEER vor der Infektion $\Omega \times \text{cm}^2$	TEER Abnahme nach der Infektion, % ¹
Kontrolle, nicht infiziert	3360 \pm 792	-
Kontrolle, infiziert	3043 \pm 860	55
AM	3112 \pm 926	55
CM	2279 \pm 1005	62
DS	3009 \pm 1207	54
PV	3151 \pm 1133	40
TY	3559 \pm 1349	47
SEM ²	202	4,3
P-Wert ³	0,993	0,127

¹prozentualer Anteil der nicht infizierten Kontrolle

²Standardfehler des Mittelwertes (SEM mit $n = 3$)

³Vergleich der Mittelwerte innerhalb derselben Spalte

4.2. Fütterungsversuch

4.2.1. Leistungsparameter

Beurteilung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere

Während des Versuchsdurchgangs zeigten alle Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden und eine normale Futteraufnahme. Nach der intramuskulären Vakzinierung gegen PRRSV zeigten die Tiere keine gesundheitlichen Auffälligkeiten.

Die verschiedenen Behandlungen (C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*) hatten keinen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Tiere.

Lebendmasse und Lebendmassezunahme

Die Ferkel wurden anhand ihrer Lebendmasse und ihres Geschlechtes (w / m) gleichmäßig auf fünf Gruppen verteilt. Die Lebendmasse lag in einem Bereich von 5,74 kg bis zu 10,6 kg. Aufgrund dieser großen Gewichtsspannweite wurden innerhalb einer Gruppe

ERGEBNISSE

sowohl leichte als auch schwere Tiere eingesetzt. Damit ergaben sich vergleichbare Gruppendurchschnittswerte (Tabelle 12).

In allen Gruppen kam es innerhalb der ersten fünf Eingewöhnungstage zu minimalen Zunahmen beziehungsweise sogar zu einer leichten Abnahme der Lebendmasse. Erst in der zweiten Versuchsperiode vom Tag 5 bis Tag 12 kam es zu einer Lebendmassezunahme innerhalb der Gruppen im Bereich von 235g/Tag (± 104) bei DS bis zu 337 g/Tag (± 147) bei BC.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Lebendmasse beziehungsweise der mittleren täglichen Lebendmassezunahme festgestellt werden.

Tabelle 12: Mittlere Lebendmassen und mittlere tägliche Lebendmassezunahme der Fütterungsgruppen je Woche innerhalb der 39-tägigen Versuchsperiode, Mittelwert \pm Standardabweichung

n = 5³	Fütterungsgruppen²				
	C	BC	CM	DS	PV
LM in kg					
Versuchsbeginn Tag 0	8,23 $\pm 0,44$	8,51 $\pm 0,70$	7,90 $\pm 0,79$	8,39 $\pm 0,95$	8,06 $\pm 0,57$
Versuchsende Tag 39	23,0 $\pm 1,26$	22,6 $\pm 3,74$	21,0 $\pm 2,16$	21,4 $\pm 3,17$	20,9 $\pm 1,68$
Tägliche Zunahme in g					
Gesamter Versuchszeitraum	378 $\pm 37,9$	360 $\pm 79,8$	337 $\pm 39,2$	333 $\pm 88,9$	330 $\pm 56,3$

¹Periode 1: Tag 0-5; Periode 2: Tag 6-12; Periode 3: Tag 13-19; Periode 4: Tag 20-26; Periode 5: Tag 27-33; Periode 6: Tag 34-39

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Versuchseinheit war ein Flatdeck mit je 2 Ferkeln

Futteraufnahme und Futteraufwand

Die Ermittlung der täglichen Futteraufnahme eines Tieres erfolgte aus den gemittelten Daten der beiden in einem Flatdeck gehaltenen Ferkel. Für die mittlere Futteraufnahme konnten zwischen den Gruppen keine Unterschiede beobachtet werden ($P = 0,945$). Der Futteraufwand wurde aus der wöchentlichen Futteraufnahme und der wöchentlichen Lebendmassezunahme ermittelt. Für den Futteraufwand konnten keine fütterungsbedingten Einflüsse ermittelt werden ($P = 0,119$) (Tabelle 13).

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Durchschnittliche tägliche Futterraufnahme (dFI) und mittlerer Futterraufwand (FA) der Ferkel der verschiedenen Fütterungsgruppen während einer 39-tägigen Versuchsperiode¹ (n=5), Mittelwert ± Standardabweichung

n = 5 ³	Fütterungsgruppen ²				
dFI in g/Tier/Tag	C	BC	CM	DS	PV
Periode 1-6	587 ±78,6	604 ±187	601 ±57,4	616 ±120	560 ±56,3
FA					
Periode 1	-26,2 ±37,4	-0,36 ±3,11	-2,27 ±3,97	-1,56 ±2,91	0,09 ±4,52
Periode 2	0,60 ±0,33	0,61 ±0,46	0,58 ±0,26	-0,18 ±1,87	0,83 ±0,54
Periode 3	1,29 ±1,23	1,02 ±0,76	0,99 ±0,39	1,37 ±0,60	1,07 ±0,45
Periode 4	0,72 ±0,25	0,77 ±0,43	1,03 ±0,59	0,82 ±0,31	0,81 ±0,38
Periode 5	1,70 ±0,12	1,86 ±0,39	1,51 ±0,26	2,00 ±0,28	1,77 ±0,37
Periode 6	1,38 ±0,41	1,53 ±0,40	2,00 ±1,00	1,98 ±0,26	1,77 ±0,41
Periode 1-6	1,55 ±0,12	1,64 ±0,27	1,81 ±0,27	1,88 ±0,17	1,72 ±0,14

¹Periode 1: Tag 0-5; Periode 2: Tag 6-12; Periode 3: Tag 13-19; Periode 4: Tag 20-26; Periode 5: Tag 27-33; Periode 6: Tag 34-39

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Versuchseinheit: Flatdeck mit je 2 Ferkeln

4.2.2. Hämatologische und immunologische Parameter

Hämatologie

Die hämatologischen Parameter und die Auswertung des Differenzialblutbildes der Ferkel über den gesamten Versuchszeitraum sind in Tabelle 14 dargestellt. Das Blutbild der Absetzferkel zeigte keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Für die hämatologischen Parameter konnten an den Tagen 0, 7, 21 und 35 nur zeitabhängige Änderungen der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte sowie für die Gesamtzahl der Leukozyten, Lymphozyten und Basophilen festgestellt werden.

Phänotypisierung der peripheren Blutleukozyten

Die Auswertung der exprimierten Oberflächenmarker der Lymphozyten (Tabelle 15) zeigte teilweise zeitabhängige, aber keine gruppenabhängigen Unterschiede. Die Fraktion der CD4⁻CD8α⁺ Zellen, die zu den klassischen MHC-Klasse-I-restringierten zytotoxischen T-Zellen gehören und CD8⁺γδ-T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) beinhalten, erreichten 21 Tage nach der Impfung den höchsten Wert mit anschließender Abnahme. Die CD2⁺CD5⁻Zellpopulation, welche die NK-Zellen beschreibt (de Bruin et al., 1997; Gerner et al., 2009), verzeichnete in allen Fütterungsgruppen einen stetigen Abfall vom Tag 0 bis

ERGEBNISSE

zum Tag 35 ($P < 0,001$). Die Mehrheit der Lymphozyten (39,4%) bildeten T-Zellen, die CD2 und CD5 co-exprimierten. Diese Fraktion, einschließlich der $\alpha\beta^+$ T-Zellen und CD2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen konnte während des gesamten Versuchszeitraumes ein konstantes Niveau beibehalten ($P = 0,552$). Im Gegensatz dazu kam es im Laufe der Zeit zu einer Abnahme der CD2⁻CD5⁺ Zellen ($P = 0,070$). Die Fraktion der CD4⁺CD8 α^- T-Helfer-Zellen reduzierte sich von 24,4% am Tag 0 bis zum Tag 35 auf 18,8% ($P = 0,001$). Die CD4⁺CD8 α^+ doppelt positiven Zellen, die als antigenerfahrene T-Helfer-Zellen angesehen werden, verzeichneten eine signifikante zeitabhängige Zunahme in allen Gruppen ($P = 0,001$) (Saalmüller et al., 2002). Die relativen Anteile der CD21⁺ Zellen, die B-Zellen beschreiben, zeigten zeitabhängige Effekte ($P < 0,001$), wohingegen die CD14⁺ Monozyten keine zeitabhängige Effekte aufwiesen ($P = 0,470$) (Tabelle 15).

ERGEBNISSE

Tabelle 14: Hämatologische Parameter und weiße Blutzellen der Ferkel an den Tagen 0, 7, 21 und 35 der Versuchsperiode; Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 5)¹

Zeit in Tagen	Gruppe ²	Erythrozyten T/l	Hämatokrit l/l	Hämoglobin g/l	Leukozyten G/l	Lymphozyten G/l	Monozyten G/l	Eosinophile G/l	Basophile G/l
0	C	6,26 \pm 0,51	0,31 \pm 0,03	95,2 \pm 13,7	12,7 \pm 4,95	5,63 \pm 1,82	0,43 \pm 0,17	0,25 \pm 0,12	0,13 \pm 0,10
	BC	6,26 \pm 0,43	0,33 \pm 0,05	103 \pm 16,4	13,9 \pm 3,81	6,23 \pm 1,26	0,42 \pm 0,17	0,27 \pm 0,15	0,20 \pm 0,10
	CM	6,51 \pm 0,62	0,30 \pm 0,02	92,9 \pm 5,78	11,8 \pm 4,05	5,88 \pm 1,73	0,40 \pm 0,17	0,18 \pm 0,04	0,19 \pm 0,12
	DS	6,02 \pm 0,99	0,31 \pm 0,07	93,7 \pm 24,1	12,1 \pm 4,04	6,00 \pm 1,27	0,34 \pm 0,14	0,23 \pm 0,12	0,15 \pm 0,04
	PV	6,41 \pm 0,42	0,31 \pm 0,02	97,5 \pm 5,48	11,5 \pm 2,85	5,61 \pm 1,37	0,30 \pm 0,11	0,20 \pm 0,07	0,16 \pm 0,09
7	C	6,27 \pm 0,51	0,30 \pm 0,03	92,8 \pm 14,8	14,5 \pm 3,34	6,66 \pm 1,78	0,47 \pm 0,14	0,25 \pm 0,12	0,19 \pm 0,11
	BC	6,14 \pm 0,41	0,31 \pm 0,31	100 \pm 16,0	14,9 \pm 2,45	6,89 \pm 0,69	0,48 \pm 0,16	0,29 \pm 0,16	0,21 \pm 0,08
	CM	6,64 \pm 1,01	0,30 \pm 0,07	93,5 \pm 24,0	14,2 \pm 2,46	6,88 \pm 0,69	0,47 \pm 0,09	0,22 \pm 0,12	0,20 \pm 0,04
	DS	6,03 \pm 0,73	0,30 \pm 0,01	93,6 \pm 5,95	13,9 \pm 0,96	6,61 \pm 0,71	0,43 \pm 0,09	0,31 \pm 0,06	0,16 \pm 0,12
	PV	6,40 \pm 0,43	0,31 \pm 0,02	97,2 \pm 5,85	14,4 \pm 1,83	6,53 \pm 0,41	0,34 \pm 0,10	0,24 \pm 0,05	0,19 \pm 0,07
21	C	6,27 \pm 0,44	0,30 \pm 0,04	96,8 \pm 13,0	14,8 \pm 2,95	7,18 \pm 1,43	0,75 \pm 0,19	0,21 \pm 0,07	0,32 \pm 0,19
	BC	6,52 \pm 0,79	0,33 \pm 0,04	105 \pm 13,9	15,3 \pm 1,42	7,21 \pm 0,72	0,72 \pm 0,22	0,26 \pm 0,14	0,33 \pm 0,15
	CM	6,71 \pm 0,88	0,30 \pm 0,03	94,9 \pm 10,6	14,3 \pm 3,09	7,47 \pm 1,55	0,62 \pm 0,13	0,26 \pm 0,07	0,28 \pm 0,14
	DS	6,58 \pm 0,61	0,32 \pm 0,06	101 \pm 22,1	13,3 \pm 2,16	6,30 \pm 1,11	0,61 \pm 0,15	0,17 \pm 0,11	0,24 \pm 0,08
	PV	6,42 \pm 0,92	0,32 \pm 0,03	100 \pm 13,2	16,6 \pm 3,72	6,71 \pm 0,95	0,66 \pm 0,22	0,29 \pm 0,13	0,32 \pm 0,13
35	C	6,30 \pm 0,31	0,32 \pm 0,04	98,1 \pm 11,8	14,8 \pm 2,90	8,48 \pm 3,39	0,71 \pm 0,16	0,23 \pm 0,14	0,27 \pm 0,25
	BC	6,38 \pm 0,82	0,34 \pm 0,04	107 \pm 12,1	12,1 \pm 2,09	7,12 \pm 0,74	0,46 \pm 0,26	0,25 \pm 0,17	0,35 \pm 0,16
	CM	6,55 \pm 0,84	0,33 \pm 0,02	105 \pm 3,74	14,3 \pm 1,04	8,17 \pm 0,61	0,55 \pm 0,17	0,29 \pm 0,02	0,32 \pm 0,17
	DS	6,50 \pm 0,32	0,34 \pm 0,05	106 \pm 14,4	13,6 \pm 0,95	7,75 \pm 1,42	0,59 \pm 0,16	0,20 \pm 0,07	0,29 \pm 0,11
	PV	6,35 \pm 0,61	0,34 \pm 0,04	103 \pm 14,1	13,8 \pm 1,26	7,23 \pm 0,47	0,48 \pm 0,12	0,30 \pm 0,21	0,30 \pm 0,15
SEM ³		0,062	0,004	1,36	0,29	0,15	0,02	0,01	0,014
P-Werte									
Zeit		0,278	0,080	0,250	0,004*	<0,001*	<0,001*	0,415	<0,001*
Gruppe		0,873	0,882	0,843	0,935	0,871	0,388	0,950	0,842
Zeit x Gruppe		0,809	0,975	0,929	0,555	0,847	0,575	0,303	0,989

¹Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkeln (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Standardfehler des Mittelwerts (SEM); *Signifikanz bei Werten < 0,05

ERGEBNISSE

Tabelle 15: Verteilung der Immunzellen im Ferkelblut (Angaben in Prozent (%) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Lymphozyten) am Tag der Impfung (Tag 0) sowie 7, 21 und 35 Tage nach der Impfung innerhalb der Versuchsperiode; Mittelwert \pm Standardabweichung (n=5)¹

Zeit in Tage	Gruppe ²	CD2 ⁺ CD5 ⁻	CD2 ⁺ CD5 ⁺	CD2 ⁻ CD5 ⁺	CD4 ⁺ CD8 α ⁻	CD4 ⁺ CD8 α ⁺	CD4 ⁻ CD8 α ⁺	CD21 ⁺	CD14 ⁺
0	C	21,7 \pm 6,62	36,1 \pm 7,38	20,7 \pm 3,22	22,4 \pm 4,65	3,44 \pm 1,02	22,1 \pm 4,67	16,9 \pm 3,86	13,9 \pm 6,65
	BC	22,7 \pm 6,65	36,3 \pm 7,78	22,2 \pm 3,15	23,1 \pm 7,99	2,85 \pm 0,60	20,6 \pm 3,79	18,1 \pm 3,40	12,0 \pm 4,94
	CM	20,4 \pm 6,36	40,2 \pm 10,4	23,8 \pm 6,93	26,8 \pm 7,37	3,18 \pm 0,60	18,6 \pm 3,93	15,9 \pm 1,49	8,44 \pm 1,70
	DS	21,3 \pm 4,35	37,2 \pm 5,16	22,7 \pm 5,00	24,3 \pm 4,16	3,06 \pm 0,73	20,6 \pm 5,45	15,4 \pm 3,21	11,3 \pm 3,49
	PV	18,2 \pm 3,19	38,6 \pm 6,13	23,4 \pm 3,85	25,6 \pm 6,43	3,17 \pm 0,62	17,3 \pm 1,29	14,5 \pm 3,21	9,62 \pm 2,82
7	C	17,4 \pm 2,24	37,8 \pm 9,44	23,1 \pm 2,78	20,8 \pm 7,06	4,34 \pm 1,62	17,8 \pm 5,29	11,0 \pm 1,28	15,7 \pm 8,56
	BC	17,3 \pm 3,34	39,8 \pm 4,97	24,3 \pm 3,49	24,3 \pm 6,16	4,22 \pm 0,59	19,4 \pm 2,38	10,5 \pm 2,33	14,3 \pm 6,07
	CM	18,3 \pm 1,46	39,7 \pm 7,70	24,5 \pm 6,69	25,8 \pm 5,60	4,78 \pm 1,82	18,9 \pm 1,74	10,6 \pm 2,01	11,4 \pm 2,01
	DS	21,3 \pm 0,93	37,2 \pm 6,28	22,7 \pm 5,32	24,3 \pm 4,11	3,06 \pm 1,05	20,6 \pm 3,31	15,4 \pm 1,50	11,3 \pm 2,26
	PV	17,3 \pm 2,66	37,8 \pm 4,50	26,8 \pm 2,97	23,2 \pm 3,04	3,83 \pm 0,92	17,4 \pm 3,46	9,58 \pm 2,14	12,4 \pm 3,43
21	C	17,2 \pm 3,83	39,8 \pm 6,34	21,0 \pm 4,24	19,4 \pm 6,33	4,50 \pm 0,87	23,5 \pm 5,61	16,2 \pm 2,55	14,2 \pm 5,59
	BC	18,9 \pm 3,39	40,1 \pm 5,59	19,7 \pm 1,98	18,6 \pm 8,06	4,43 \pm 1,32	25,9 \pm 6,90	16,0 \pm 2,78	13,1 \pm 1,83
	CM	20,6 \pm 4,49	38,5 \pm 7,92	20,6 \pm 5,66	18,7 \pm 10,7	3,86 \pm 1,10	18,0 \pm 5,90	14,1 \pm 5,67	19,1 \pm 17,0
	DS	17,9 \pm 4,39	40,1 \pm 4,81	23,0 \pm 3,82	21,3 \pm 6,17	3,99 \pm 1,17	24,4 \pm 6,34	15,0 \pm 2,23	11,6 \pm 1,20
	PV	17,5 \pm 4,10	38,3 \pm 3,12	21,6 \pm 6,91	19,1 \pm 5,25	3,89 \pm 0,71	23,9 \pm 4,54	13,2 \pm 2,19	13,5 \pm 6,61
35	C	16,5 \pm 4,80	39,0 \pm 8,66	24,2 \pm 5,81	15,5 \pm 7,20	5,99 \pm 4,76	21,3 \pm 8,55	15,8 \pm 4,79	22,8 \pm 26,8
	BC	15,8 \pm 4,68	35,9 \pm 1,21	24,4 \pm 3,90	17,9 \pm 2,61	4,39 \pm 0,34	19,2 \pm 2,82	15,5 \pm 5,10	9,91 \pm 4,40
	CM	15,3 \pm 4,10	38,9 \pm 5,76	24,9 \pm 9,34	21,3 \pm 5,43	5,87 \pm 2,33	18,8 \pm 1,71	16,2 \pm 4,57	9,72 \pm 2,08
	DS	16,9 \pm 4,20	42,5 \pm 8,17	24,2 \pm 8,34	19,5 \pm 3,38	4,42 \pm 0,87	22,0 \pm 5,11	17,4 \pm 2,73	10,2 \pm 2,68
	PV	16,2 \pm 3,79	38,7 \pm 3,56	23,3 \pm 6,12	20,0 \pm 4,30	4,72 \pm 1,35	18,2 \pm 1,39	17,3 \pm 3,36	9,65 \pm 4,40
SEM ³		0,41	0,62	0,51	0,63	0,16	0,48	0,39	0,81
P-Werte									
Zeit		<0,001*	0,552	0,070	<0,001*	0,001*	0,007*	<0,001*	0,470
Gruppe		0,886	0,992	0,977	0,802	0,770	0,400	0,854	0,321
Zeit x Gruppe		0,482	0,661	0,889	0,852	0,785	0,536	0,722	0,624

Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkeln (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ; *Signifikanz bei Werten < 0,05

ERGEBNISSE

Konzentration PRRSV spezifischer Antikörper

Beim Nachweis von spezifischem Immunglobulin G gegen PRRSV mittels ELISA konnten 7 Tage nach der Impfung nur drei Tiere positiv bewertet werden (Tabelle 16). Nach 21 und 35 Tagen zeigten alle Tiere positive IgG-Titer (Tabelle 16 und Tabelle 23). Während des Versuches konnten zunehmende IgG-Konzentrationen bei allen Ferkeln beobachtet werden ($P < 0,001$), jedoch ohne Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Tabelle 16: Nachweis von IgG-Antikörpern gegen PRRSV im Plasma der Versuchsferkel an den Tagen 7, 21 und 35 PI während der Versuchsperiode¹ mittels PRRS Antikörper ELISA (X3, IDEXX (BioScreen, Hannover)) (OD-Werte)

Zeitpunkt	Gruppe ²					SEM ³	Zeit	P-Wert	
	C	BC	CM	DS	PV			Gruppe	Zeit x Gruppe
7	0,078	0,002	0,021	0,019	0,024	0,022			
21	1,81	1,92	1,79	1,90	1,81	0,047	<0,001*	0,850	0,919
35	2,18	2,22	2,18	2,14	2,09	0,028			

¹Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkeln (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Standardfehler des Mittelwerts (SEM); *Signifikanzniveau $< 0,05$

Bestimmung von IFN- γ sezernierenden Zellen mittels ELISpot Assay

Bei der ersten Blutentnahme am Tag 0 vor der Impfung konnten keine IFN- γ sezernierenden Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden deshalb nicht in die Tabelle mit aufgenommen. Erst 7 Tage nach der Impfung konnten mithilfe des ELISpot Assays IFN- γ sezernierende Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 17 und Tabelle 18). Die Mediumkontrolle aller Gruppen war negativ, wohingegen die positive Stimulation über das Mitogen Con A mit den verschiedenen Konzentrationen 3 μ g/ μ l und 5 μ g/ μ l positiv ausfiel (Tabelle 17). Die Anzahl der positiven Zellen steigerte sich über den gesamten Versuchszeitraum. Dies konnte nach Stimulation über Con A festgestellt werden (Tabelle 17).

Die unterschiedlichen Futterzusatzstoffe hatten keinen Einfluss auf die Anzahl der IFN- γ positiven Zellen während der spezifischen Antigen Stimulation (Tabelle 18).

ERGEBNISSE

Tabelle 17: IFN- γ produzierende Zellen in SFU (Spot Forming Units) der Ferkel 7, 21 und 35 Tage nach der PRRSV Impfung im Vergleich zur Stimulationskontrolle Con A 3 und zur Medium-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardabweichung (n=5)¹

Zeitpunkt	Gruppe ²	Spot MW	Con A 3	Con A 5	Medium
7	C	0,533 \pm 0,51	13,3 \pm 15,8	10,5 \pm 6,67	0 0,0
	BC	0,367 \pm 0,30	14,5 \pm 16,2	18,2 \pm 18,1	0 0,0
	CM	0,067 \pm 0,09	8,30 \pm 11,5	15,7 \pm 20,0	0 0,0
	DS	0,500 \pm 0,67	7,56 \pm 4,20	14,2 \pm 7,92	0 0,0
	PV	0,200 \pm 0,18	17,3 \pm 18,5	18,1 \pm 10,4	0 0,0
21	C	0,967 \pm 1,70	6,10 \pm 8,20	5,80 \pm 4,88	0 0,0
	BC	0,533 \pm 0,83	7,40 \pm 4,40	5,60 \pm 7,63	0 0,0
	CM	0,300 \pm 0,25	11,9 \pm 13,0	8,70 \pm 8,66	0 0,0
	DS	0,333 \pm 0,31	8,00 \pm 3,70	5,00 \pm 2,72	0 0,0
	PV	0,300 \pm 0,30	9,20 \pm 10,6	7,70 \pm 4,67	0 0,0
35	C	0,700 \pm 0,41	20,0 \pm 11,3	12,1 \pm 7,75	0 0,0
	BC	0,833 \pm 0,91	18,2 \pm 11,5	15,4 \pm 8,18	0 0,0
	CM	1,23 \pm 1,01	24,8 \pm 17,8	19,4 \pm 7,22	0 0,0
	DS	0,800 \pm 0,84	25,8 \pm 15,3	19,2 \pm 5,18	0 0,0
	PV	0,600 \pm 0,53	30,2 \pm 16,2	25,0 \pm 8,55	0 0,0
SEM ³		0,082	1,58	1,23	-
P-Werte					
Zeit		0,760	<0,001*	<0,001*	-
Gruppe		0,662	0,821	0,552	-
Zeit x Gruppe		0,761	0,849	0,774	-

¹Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkel (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Stimulationskontrolle Con A 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sowie Mediumkontrolle ohne Zellen

*Signifikanz bei Werten < 0,05

ERGEBNISSE

Tabelle 18: IFN- γ produzierende Zellen in SFU (Spot Forming Units) der Ferkel an den Tagen 7, 21 und 35 nach der PRRSV Impfung¹

Zeitpunkt	Gruppe ²					P-Wert			
	C	BC	CM	DS	PV	SEM ³	Zeit	Gruppe	Zeit x Gruppe
7	0,533	0,367	0,067	0,500	0,200	0,083			
21	0,967	0,533	0,300	0,333	0,300	0,168	0,541	0,555	0,801
35	0,700	0,833	1,233	0,800	0,600	0,148			

¹Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkel (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

DISKUSSION

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, in einer *in vitro* Studie mögliche Effekte von unterschiedlichen Futterzusätzen in Kombination mit einem enterotoxischem *E. coli* Stamm auf die Integrität eines IPEC-J2 Zellkulturmodells zu untersuchen. Im Mittelpunkt stand dabei die Ermittlung möglicher antiadhäsiver und antimikrobieller Wirkungen der eingesetzten Futterzusatzstoffextrakte (Säurenmischung (AM), Ananasstamm (Bromelain (BM)), bovines Kolostrum (CM), getrocknete und gemahlene Steinfruchtkerne (DS), Thymianauszüge (TY), Hefezellwandbestandteil (PV)) gegenüber einem enterotoxischen *E. coli* Stamm, der den Fimbrientyp F4 exprimiert.

Im Fütterungsversuch wurde die Wirkung der vorab teilweise *in vitro* untersuchten Futterzusatzstoffe (Kolostrum (CM), getrocknete und gemahlene Steinfruchtkerne (DS), Hefezellwandextrakt (PV)) und eines zusätzlichen Probiotikums (*Bacillus cereus* var. *Toyo* (BC)) auf die Leistung sowie die hämatologischen und immunologischen Parameter von Absetzferkeln im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (ohne Futterzusatzstoff) nach einer PRRSV Impfung näher untersucht. Im Fokus dieser Untersuchung stand dabei die Überprüfung, inwieweit der Impfstoff in Kombination mit Futterzusatzstoffen das Immunsystem aktivieren kann. Weiterhin wurde zur Bestimmung von IFN- γ sezernierenden Zellen der ELISpot Test etabliert.

Im Folgenden werden die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert sowie abschließend mögliche Perspektiven für künftige Fragestellungen und Anwendungen aufgezeigt.

5.1. Kritik der Methoden

5.1.1. *In vitro* Untersuchungen

In vitro Zellmodelle des Darms sollten funktionell der *in vivo* Situation ähneln. In dem Versuch wurde die IPEC-J2 Zelllinie herangezogen, um das Dünndarmepithel von Ferkeln zu simulieren.

Der Darm ist ein äußerst komplexes System mit vielen interagierenden zellulären und mikrobiellen Faktoren, das bis heute *in vitro* nicht vollständig simuliert werden kann. Epitheliale Darmzelllinien, die als Zellkulturmodell für *in vitro* Versuche eingesetzt

DISKUSSION

werden und *in vivo* Situationen widerspiegeln, sollten auf Umwelteinflüsse sowie mikrobielle und intrinsische Faktoren, wie zum Beispiel Zytokine und inflammatorische Moleküle, reagieren können. Diese Simulation der realen Situation ist bisher aber nicht möglich.

Tight Junction Proteine sind für die Ausbildung der epithelialen Barriere, die Integrität und die Polarität notwendig, wobei Krankheitserreger die zelluläre Integrität und Barrierefunktion parazellulär beeinflussen können (Shin et al., 2006). Für die meisten *in vitro* Studien des Darms wurden humane Tumorzellen aus dem Kolon (Caco-2, T84 und HT-29) eingesetzt, um Bindungsstudien mit pathogenen Bakterien durchzuführen (Cencic, 2010). Die intestinale porcine Epithelzelllinie (IPEC-J2) wurde ausgiebig charakterisiert und bewahrt im Gegensatz zu den oben genannten Versuchszelllinien bis heute ihre natürliche, epitheliale und nicht transformierte Erscheinung (Mariani et al., 2009). Zudem exprimiert die IPEC-J2 Zelllinie eine Vielzahl von histologischen und physiologischen Merkmalen, die dem Originalgewebe entsprechen (Geens und Niewold, 2011).

Neue Kultivierungsbedingungen für IPEC-J2

In früheren Versuchen wurden die IPEC-J2 Zellen in einem Medium mit einem 10%igen Zusatz von FCS (Fetalem Kälberserum) einschließlich Wachstumsfaktoren (5 ng/ml Human Epidermaler Wachstumsfaktor (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)), Insulin/Transferrin/Selenium (Konz. g/L: 1,00/0,55/0,00067 (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)) in Kulturflaschen kultiviert (Zakrzewski et al., 2013). Das Ernten des Zellrasens erfolgte mit FCS nach einer sieben tägigen Inkubation bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre durch das Auftragen von 1 ml Trypsin-EDTA. Die Einwirkzeit betrug max. 5 Minuten.

In unserem Versuch wurden die Kultivierungsbedingungen von IPEC-J2 Zellen verändert. Es erfolgte ein Austausch von 10% Rinderserum mit Wachstumsfaktoren durch 10% Schweineserum (Porcine Serum; PS) ohne Wachstumsfaktoren. Durch diese Zugabe wurde die Wachstumsgeschwindigkeit beschleunigt, sodass schon nach 2 oder 3 Tagen ein vollständiger Zellrasen vorhanden war. Ebenfalls veränderte sich bei der mikroskopischen Betrachtung die Morphologie der Zellen. Diese Beobachtungen konnten auch in einer Studie bestätigt werden (Zakrzewski et al., 2013). Durch die Zugabe von Schweineserum erhöhte sich die Zellhöhe deutlich, während sich der Zelldurchmesser um ca. 50%

DISKUSSION

reduzierte. Die apikale Zellmembran der IPEC-J2/PS zeigte typische Mikrovilli und die TJ Ultrastruktur (Zakrzewski et al., 2013). Die meisten Parameter, die unter PS-Bedingungen untersucht wurden, konnten somit eine größere Ähnlichkeit zu Schweine-Jejunocyten aufzeigen als seit der Isolierung der Zelllinie im Jahr 1989 angenommen wurde (Berschneider, 1989; Zakrzewski et al., 2013). Durch die Verwendung von Schweineserum verlängerte sich die Einwirkzeit von Trypsin von fünf Minuten (Rinderserum) auf 20 Minuten (Schweineserum). Erst nach dieser Zeit konnten die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden.

Es veränderten sich jedoch nicht nur die Charakteristika der Zellen durch die Zugabe von Schweineserum, sondern auch deren Konfluenz bei der Widerstandsbestimmung. Hierbei wurde festgestellt, dass bei Zellen mit PS-Zusatz und steigender Passagenzahlen höhere Widerstände messbar waren. So kam es im Laufe des Versuches zu einer Zunahme der TEER Werte, die die Vergleichbarkeit von TEER-Werten unterschiedlicher Zellpassagen erschwerte.

Diese Veränderungen, die sich durch den Einsatz von Schweineserum im Laufe des Versuches zeigten, waren zu Beginn des Versuches unbekannt. Es erfolgte daher keine Anpassung der Versuchsansätze durch den Einsatz von Zellen nur mit identischen Passagenzahlen. Die Mittelwerte wurden aus den jeweils dreifach durchgeführten Versuchsreihen berechnet und statistisch ausgewertet. Es handelt sich bei der Auswertung um einen Messbereich mit großen Unterschieden zwischen Anfangs- (1. Versuchsreihe) und Endbestimmung (3. Versuchsreihe), die sich durch die Erhöhung der Passagenzahlen und die damit in Verbindung stehende, stetig steigende Stabilität durch das verwendete Schweineserum bei den eingesetzten Zellen erklären lässt.

Die Wirkung der Futterzusatzstoffe auf die Integrität (TEER-Wert) der Zellen kann hier durch die breite Streuung der Messwerte vielmehr nur als positiver oder negativer Verlauf angesehen werden.

TEER-Messmethode zur Beurteilung der Integrität des IPEC-J2 Zellkulturmodells

Der Transepitheliale Elektrische Widerstand der IPEC-J2 Zellschicht wurde mithilfe eines epithelialen Voltohmmeters mit Elektrode und einer sterilen Endohm Kammer bestimmt. Dafür wurden die mit Zellen bewachsenen Inserts für die Messung in die Kammer

DISKUSSION

eingesetzt. Anschließend wurde die Elektrode aufgesetzt und die TEER-Messung gestartet. Werden physikalische/technische Messungen durchgeführt, müssen mögliche Fehlerquellen diskutiert werden.

Für den Versuch wurden jeweils 10^{05} Zellen/Gefäß aufgetragen. Hierbei bildeten sich unterschiedliche Zellrasendichten aus, wodurch es zu veränderten Wachstumsraten trotz gleicher Versuchsvoraussetzungen kam. Eine erhöhte Zellzahl bewirkte einen erhöhten TEER-Wert, da eine erhöhte Dichte des Zellrasens bestand. Zudem bildeten sich oftmals an der Elektrode kleine Luftblasen aus, die einen Einfluss auf die TEER-Werte ausgeübt haben könnten.

Zusätzlich konnte aufgrund von Schwankungen bei der Werteerhebung meist kein stabiler Wert abgelesen werden. In diesem Fall wurde der Mittelwert als Endwert bestimmt.

Durch die Handhabung und die ständige Bewegung der Platten ist es möglich, dass Risse im Zellrasen entstanden sind, die sich ebenfalls negativ auf die Messgenauigkeit ausgewirkt haben könnten. Dies gilt auch für mögliche Einflüsse durch die Veränderung der Mediummenge aufgrund der vielfachen Entnahme der Inserts.

Zusammenfassend könnten sich die oben aufgeführten Fehler negativ auf die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen TEER-Werte der einzelnen Futterzusatzstoffgruppen ausgeübt haben.

Aufbereitung der biologischen Testmaterialien

Die Aufbereitung bzw. Extraktion der Pflanzenmaterialien erfolgte, wie bereits in vorausgegangen *in vitro* Studien mit anderen biologischen Materialien durchgeführt, auf der Grundlage der Herstellung einer wässrigen Lösung (Summerfield und Saalmüller, 1998).

Angesichts der Ergebnisse der verschiedenen Futterzusätze dieser Studie muss in Betracht gezogen werden, dass alle verwendeten Zusätze zu gleichen Dosierungen eingesetzt wurden. Diese mussten zuvor in wasserlöslichem Medium extrahiert und sterilisiert werden, wobei eine thermische Sterilisation auch eine gute Möglichkeit gewesen wäre. Dies wurde aber aufgrund des Risikos der Zerstörung der intrinsischen Struktur der einzelnen Auszüge nicht in Erwägung gezogen.

Die Extrakte (wasserlöslich) wurden im Medium gelöst und mittels einer Membranpumpe steril filtriert. Durch diese Filtration wäre es denkbar, dass aufgrund der unterschiedlichen

DISKUSSION

Partikelgröße bioaktive Bestandteile im Filter zurückgehalten wurden. Zudem besitzen die eingesetzten Substanzen und Subfraktionen ein unterschiedliches Lösungsverhalten in wasserlöslichen Medien. Abgesehen von der unterschiedlichen quantitativen Löslichkeit muss bedacht werden, dass eine Lösung von lipophilen Bestandteilen im wässrigen Medium von Beginn an ausgeschlossen war. Folglich beziehen sich die Ergebnisse der getesteten Auszüge nur auf die gefilterten und wasserlöslichen Bestandteile. Die volle Wirkung der Futterzusatzstoffe, einschließlich fettlöslicher Hormone und Vitamine, lipophiler Bestandteile sowie der Partikelgrößen der Futterzusatzstoffe, die im Vergleich zur vollständigen Diät miteinfließen, können in diesem Fall nicht mit den realen Gegebenheiten eines Fütterungsversuches verglichen werden. Zusätzlich wurden vor dem Auftragen der Futterzusatzstoffextrakte die pH-Werte der Extraktlösungen auf pH 7 eingestellt. Diese Maßnahme wurde durchgeführt, da die IPEC-J2 Zellen sensibel auf saure oder alkalische pH-Werte reagieren. Beim Einsatz einer Säuremischung wurde dies ebenfalls durchgeführt. Diese vorausgehende Neutralisation sorgte dafür, dass sich die mögliche positive Wirkung einer sauren Lösung auf die Magen-Darm-Flora beziehungsweise auf die Zelllinie durch eine Verringerung der mikrobiellen Aktivität nicht entfalten konnte und die Wirkung der Säuremischung vermutlich beeinträchtigt war.

Analysen zur Identifizierung der aktiven Substanzen der einzelnen eingesetzten Futterzusatzstoffe wurden nicht durchgeführt, da der Fokus der Studie auf der Beurteilung des Gesamtproduktes und nicht auf der Beurteilung der einzelnen aktiven Inhaltsstoffe lag. Bei dem Hefezellwandbestandteil (PV) wurde der Extrakt in PBS gelöst. Es entstand eine Suspension, die sich nach längerer Inkubationszeit als feine Hefezellwandschicht auf den Zellen niederlegte. Diese zusätzliche Schicht auf den Zellen führte womöglich zu einem erhöhten Widerstand und damit zu Ablesefehler bei der TEER-Messwertbestimmung.

IPEC-J2 Zellkulturmodell zur Beurteilung der Wirkung von Futterzusatzstoffen und deren Einflusses auf die bakterielle Adhäsion

Um die Wirkung von Futterzusatzstoffen auf die Integrität des Zellmonolayers bestimmen zu können, wurden unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Extrakte auf die kultivierten IPEC-J2 Zellen gegeben. Die Einwirkzeit der Futterzusatzstoffe während des Versuches betrug sechs oder 24 Stunden. Danach erfolgte die Zugabe der *E. coli* Bakterien. Während des Fütterungsversuches erfolgt die Supplementation der Futterzusatzstoffe über

DISKUSSION

mehrere Wochen. Das *in vitro* vorliegende Versuchsdesign entspricht nicht den realen Gegebenheiten eines Fütterungsversuches. Die *in vitro* Ergebnisse müssen daher kritisch betrachtet werden.

Auch die breite Spannweite der TEER-Werte bei der Messung des Epithelwiderstandes vor der Supplementation weist auf Fehlerquellen hin. Von Beginn an wurden unterschiedliche Startwerte ermittelt, die eine vergleichbare Auswertung erschweren.

Nach der Zugabe der ETEC-Bakterien kam es zu einem Absinken aller TEER-Werte unabhängig von den zugefügten Prüfextrakten. In diesem Fall kann man annehmen, dass der epithelschädigende Einfluss der pathogenen Bakterien größer war als die Schutzwirkung bzw. die stabilisierende Wirkung der Futterzusatzstoffe auf das Epithel. Für Folgeuntersuchungen sollten längere Einwirkzeiten und unterschiedliche Konzentrationen der Bakterien und Testsubstanzen in Betracht gezogen werden, um mögliche Effekte der Substanzen aufdecken zu können.

5.1.2. *In vivo* Untersuchungen

Versuchsdesign

Die Fragestellung der Studie bestand in der Ermittlung möglicher immunmodulatorischer Einflüsse der eingesetzten Futterzusatzstoffe. Die Absicht, die spezifische humorale und zelluläre Immunantwort auf eine intramuskuläre Vakzination gegen PRRSV beurteilen zu können, erforderte die Voraussetzung serumnegativer Tiere. In dem Versuch wurden Muttertiere verwendet, die aus einer PRRSV-freien Haltung entstammten. Serologische Nachweisverfahren (ELISA) für die Muttertiere lagen allerdings nicht vor.

Äußere klimatische sowie haltungs- und fütterungsassoziierte Schwankungen wurden weitgehend reduziert. Bei der vorliegenden Versuchsdurchführung wurden die Tiere in wesentlich kleineren Gruppen und unter anderen räumlichen Verhältnissen gehalten als in der Praxis üblich. Die Ferkel zeigten über den gesamten Versuchszeitraum einen gesunden Habitus und ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Die vorliegenden Ergebnisse sind demzufolge unter Berücksichtigung des Einflusses optimaler Haltungsbedingungen zu diskutieren.

DISKUSSION

Probenmaterial und Untersuchungsmethoden

Die vor und nach der Immunisierung zur Bestimmung der immunologischen Parameter aus der Vena cava cranialis gewonnenen Blutproben der Ferkel wurden am selbigen Tag zur PBMC- und Antikörpergewinnung weiterverarbeitet und bis zur Analyse auf Eis gekühlt oder eingefroren. Erst nach der Etablierung des ELISpot Assays wurden die PBMCs wieder aufgetaut und weiter verwendet. Beim Auftauprozess der Zellen kann davon ausgegangen werden, dass einige Zellen beschädigt wurden (Vitalität: 70-80%).

Die Blut-Proben für die Auswertung der IFN- γ sezernierenden Zellen mittels ELISpot wurden sofort nach der PRRSV Impfung entnommen, eingefroren und später mittels ELISpot Assay ausgewertet. Da aber eine detektierbare Antwort der PRRSV spezifischen, γ -Interferon produzierenden Zellen nicht früher als 4 Wochen post vaccination auftritt, war der Zeitpunkt der Blutprobenentnahme (0, 7, 21, 35 Tage post vaccination) nicht optimal gewählt (Meier et al., 2000). Zudem kann angenommen werden, dass die Immunantwort bei Absetzferkeln noch sehr schwach ausfällt und bei älteren Versuchstieren eine aussagekräftigere Immunantwort zu erwarten gewesen wäre. Abschließend betrachtet, würden ein längerer Versuchszeitraum und ein höheres Ferkelalter die Versuchsergebnisse möglicherweise optimieren.

Etablierung ELISpot Assay

Bevor der ELISpot Assay in Kombination mit dem MLV-PRRSV Impfstoff als Stimulans verwendet werden konnte, musste dieser zunächst etabliert werden. Für die Etablierung wurden drei Blutproben von ausgewachsenen Tieren eingesetzt, deren Blut für PRRSV positiv getestet wurde.

Die Etablierung entspricht der Durchführung des ELISpot Assays wie im Methodenteil beschrieben und bezieht sich weitestgehend auf das Standardprotokoll. Bei der Etablierung des verwendeten Testsystems wurden unterschiedlichen Verdünnungen des attenuierten Lebendimpfstoffes Ingelvac[®] PRRSV MLV, der als Stimulans diente, eingesetzt. Dieser wurde für die Etablierung unverdünnt und in den Verdünnungen 1:1, 1:4, 1:8 und 1:16 getestet. Schlussendlich wurde die Verdünnung 1:1 bei den ELISpot Assays als Stimulans verwendet. Die Auswertung der Spot-Counts für die Auswahl der richtigen Stimulans-Verdünnung erfolgte mikroskopisch. Die genauere Methode mit mithilfe eines ELISpot Readers (CTL ImmunoSpot[®]S5 Micro Analyzer, Cleveland, USA) der Firma BioScreen (European Veterinary Disease Management Center GmbH, Deutschland) aus Hannover

DISKUSSION

wurde dabei nicht in Betracht gezogen. Als Kritikpunkte der ELISpot Etablierung und der Testdurchführung werden die mikroskopische Auswertung sowie der Impfstoff als Stimulans gesehen.

Normalerweise wurden für die ELISpot Assays das Virus selbst wie beispielsweise das homologe PRRS Virus IA 1-4-2 oder virusbefallene Zellen als Stimulus eingesetzt (Osorio, 1998). In vorliegendem Versuch wurde nur der attenuierte Lebendimpfstoff verwendet. Möglicherweise fand die Stimulierung der Zellen durch diese Abänderung nur unvollständig statt. Zudem wurde die Entscheidung der richtigen Stimulansverdünnung per mikroskopische Auswertung durchgeführt. Die einzelnen Spots können sich jedoch nicht nur in Bezug auf ihre Anzahl, sondern auch im Hinblick auf ihre Intensivität und Größe, die die relative Antigen-Bildungsfähigkeit der Zellen widerspiegelt, voneinander unterscheiden. Da die Auswahl mikroskopisch bestimmt wurde, könnte eine nicht optimale Auswahl der Stimulansverdünnung getroffen worden sein.

Ebenfalls muss davon ausgegangen werden, dass durch Erschütterungen von nicht-adhären Zellen Lateralbewegungen vorlagen, die so zu einer fälschlicherweise erhöhten Anzahl an Spots führten.

5.2. *In vitro* Untersuchungen

5.2.1. Einfluss der biologischen Substanzen auf die Adhäsion eines enteropathogenen *E. coli* Stammes auf eine IPEC-J2 Zelllinie

Futterzusatzstoffe können durch verschiedene Mechanismen die Darmgesundheit von Tieren positiv beeinflussen. Neben der direkten Wirkung auf Pathogene oder Darmzellen spielt ebenso die Prävention einer Pathogenanbindung an das Darmepithel eine Rolle.

Innerhalb dieser Studie wurden die Eigenschaften von Futterzusatzstoffen und deren Wirkung auf die Anbindungsfähigkeit eines pathogenen F4-positiven *E. coli* Stamm an das Dünndarmepithel näher untersucht.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion einer IPEC-J2 Zelllinie mit einem enteropathogenen *E. coli* Stamm ist die Adhäsion des Bakteriums an die Zelloberfläche. Um eine initiale bakterielle Anbindung zu ermöglichen, müssen die verwendeten IPEC-J2 Zellen den F4-Rezeptor exprimieren (Geens und Niewold, 2010). Zusätzlich zur Expression des F4-Rezeptors der Epithelzellen wird die Expression von F4-Fimbrien der ETEC-Stämme benötigt (Hermes et al., 2011).

DISKUSSION

Erst nach einer erfolgreichen Anbindung ist eine Toxinausscheidung der Bakterien möglich, die schließlich zur Zerstörung des Zellepithels führen kann.

Der Nachweis für die Expression von F4-Fimbrien bei ETEC ist für die Durchführung von *in vitro* oder *in vivo* Infektionsversuchen mit enteropathogenen ETEC eine Voraussetzung.

In unserem Versuch wurden ein F4-positiver *E. coli* Stamm (Abbotstown) und ein F4-negativer *E. coli* Stamm (DSM 2840) eingesetzt und auf deren Anbindungsfähigkeit an IPEC-J2 Zellen mittels F4-Fimbrien überprüft. Dafür wurde der Einfluss des Bakteriums auf den Widerstand des Zellepithels unter Verwendung der TEER-Messmethode untersucht.

Ein F4-positives Ergebnis spiegelt sich in einem TEER-Wertabfall wider. Die erzielten Ergebnisse bestätigten diese Befunde. Anhand der sinkenden TEER-Werte der IPEC-J2 Zellen konnte die Bindungsfähigkeit mithilfe der F4-Fimbrien des ETEC-Stamms Abbotstown nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte der nicht F4-Fimbrien exprimierende DSM 2840 keinen Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion der Zellkultur. Für eine wirkungsvolle Anbindung müssen sowohl Flagellen als auch F4-(K88) Fimbrienantigene vorhanden sein, um eine effiziente F4ac+ETEC-Haftung eines enterotoxischen Escherichia nach einer Infektion zu gewährleisten. In einer *in vitro* Studie konnte nachgewiesen werden, dass F4ac+ETEC-Flagellen als potentielle Virulenzfaktoren gelten. Die Expression von Flagellen hängt signifikant von anderen Virulenzfaktoren wie F4-Fimbrien ab. Bei Abwesenheit von Flagellin wurde somit die Expression von F4-Fimbrien herunterreguliert und die Haftung an IPEC-J2 Zellen *in vitro* verringert (Zhou et al., 2013). In dieser Studie wurde die nicht-fimbriale Anbindung nicht spezifisch getestet. Als Unterschied der beiden verwendeten Versuchs-Stämme zeigte sich, dass als Hauptkriterium des unterschiedlichen Bindungsprozesses die F4-Fimbrien vermittelte Haftung anzusehen ist. Andere Faktoren, wie beispielsweise das hitzeempfindliche Enterotoxin, können förderlich auf die Anbindung von ETEC an IPEC-J2 Zellen einwirken (Johnson et Al. 2009). Im Schwein selbst werden noch weitere ETEC bindende Rezeptoren vermutet, die die Situation im Tier noch komplexer machen (Rasschaert et al., 2007).

Komplementär zu den ETEC bindenden Eigenschaften von IPEC-J2 wurde die Widerstandsmessung dazu verwendet, um die epitheliale Barrierefunktion zu charakterisieren. Sinkende Widerstände spiegeln negative Einflüsse auf die Integrität und Durchlässigkeit von Zellmonolayern wieder (Borchardt, 2011; Wilson et al., 1990; Winter et al., 1990).

DISKUSSION

Der TEER-Wert repräsentiert den transzellulären und parazellulären Widerstand, die als Parallel-Widerstände betrachtet werden können. Abnehmende TEER-Werte können daher als Zellschädigung oder beeinträchtigte TJ Funktion verstanden werden (Fromm et al., 2009).

In unserer Studie konnte keiner der eingesetzten Extrakte einen TEER-Abfall, der durch die ETEC-Exposition an den Epithelzellen verursacht wurde, verhindern. Selbst die verwendete Suspension aus PV, einer lysierten Hefepreparation aus *Saccharomyces cerevisiae*, konnte, wie bereits in einer vorhergehenden Studie beschrieben, trotz ihrer Eigenschaft, an IPEC-J2 Zellen anbinden zu können, nicht mit der ETEC-Anbindung konkurrieren (van der Aa Kühle et al., 2005). Die Schutzwirkung scheint sich in diesem Fall auf die Blockade der F4-Rezeptoren zu beziehen und ist deshalb für eine ETEC-Anbindung weniger geeignet. Bisher gibt es nur wenige Berichte über die Interferenz von Ernährungsfaktoren und deren Zusätzen in Bezug auf die ETEC-Zellinteraktion bei IPEC-J2 Zellen.

In einer zuvor durchgeführten Studie zeigte sich, dass probiotische Stämme, einschließlich *Bifidobacterium animalis* MB5s und *Lactobacillus rhamnosus* GG, intestinale Caco-2 Zellen vor proinflammatorischen Reaktionen, die durch enterotoxische *E. coli* K88 induziert wurden, schützen können (Roselli et al., 2006).

Ein breites Spektrum an Pflanzenextrakten und natürlichen Substanzen wurde in Bezug auf deren Wirkung auf IPEC-1 Zellen nach einer ETEC-Infektion getestet. Hierbei wurden vor allem Hefeauszüge und deren Zellwandbestandteile als mögliche Alternativen für eine Gesundheits- und Leistungsförderung im Tierbestand betrachtet (Ganner und Schatzmayr, 2012).

Dies beruht hauptsächlich auf der Bindungskapazität der enteropathogenen Bakterien. Ein Hefeextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae* war in der Lage, IPEC-1 Zellen vor einer gesteigerten Membrandurchlässigkeit, die durch eine ETEC-Belastung verursacht wurde, zu schützen (Roselli et al., 2007). Hinsichtlich der eigenen Studie konnte PV eine Beeinträchtigung der Zellintegrität durch die ETEC-Infektion nicht vermeiden. Trotz einer PV-Supplementation spiegelt sich dies durch abfallende TEER-Werte nach der Infektion wider. Das ist möglicherweise ein Beweis dafür, dass selbst eine verringerte ETEC-Anbindung an die Zellen nicht ausreichend ist, um unter den gegebenen experimentellen Bedingungen vor einer Toxineinwirkung schützen zu können (Spitzer et al., 2014).

DISKUSSION

Als weitere Anwärter für möglicherweise protektive Substanzen wurden Präparationen aus Rinderkolostrum gesehen. Diese Annahme wurde aufgrund der Ergebnisse der von Roselli et al. (2007) durchgeführten Studie getroffen. In dieser Studie wurden zwei Fraktionen fettfreies Rinderkolostrum eingesetzt. Eine enthielt eine erhöhte Menge an IgG, die andere war mit insulinähnlichem Wachstumsfaktor (IGF-I) angereichert. Diese Studienbefunde konnten innerhalb des eigenen Versuches nicht reproduziert werden. Als Grund für die nicht eintretende positive Wirkung könnte neben einer Variation der Zusammensetzung der vorausgehende Vorbereitungsprozess des Rinderkolostrums gesehen werden. So ist nicht auszuschliessen, dass die enthaltenen Immunglobuline oder antimikrobiellen Verbindungen wie Laktoferrin, Lysozym und Laktoperoxidase unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichend wirksam waren (Solomons, 2002). Ebenso werden die im Rinderkolostrum vorhandenen Oligosaccharide und Glycoproteine, die mit der bakteriellen Adhäsion an Epithelzellen interferieren können, möglicherweise inaktiviert (Gopal und Gill, 2000).

Bromelain, das aus Ananasstammextrakt gewonnen wird, wirkt im Sinne einer Endoprotease. Diese besitzt die Eigenschaft, Peptidbindungen hydrolytisch spalten zu können. Da TJ aus Proteinen aufgebaut sind und diese durch Endoproteasen gespalten werden können, könnte dieses den TEER-Abfall beim Einsatz von Bromelain in der *in vitro* Studie erklären. So führte die proteolytische Wirkung der hohen Extrakt-Konzentrationen dazu, dass der transepitheliale Widerstand nach der Supplementation drastisch abfiel.

Kritisch zu sehen ist hierbei, dass im eigenen Versuch hoch konzentrierte Extraktlösungen eingesetzt wurden. Diese haben sich negativ auf die Epithelbeschaffenheit ausgewirkt. Eine weitere Verdünnung der Extraktlösung hätte allerdings die dem Bromelain zugesprochene proteolytische Aktivität auf die Fimbrien von *E. coli* vermutlich zu stark abgeschwächt (Hale et al., 2005).

Das *in vitro* Ergebnis entspricht somit nicht der eigentlichen, von Bromelain ausgehenden Schutzwirkung. Im Gegensatz zu vorliegender Studie übte Bromelain eine Schutzwirkung auf IPEC-J1-Zellen gegen eine ETEC-Infektion aus, als dieses mit den Bakterien auf die Zellen hinzugegeben wurde (Roselli et al., 2007).

Somit kann vermutet werden, dass bei gleichzeitiger Zugabe von Bromelain und dem Pathogen das Epithel weniger angegriffen wird und das Enzym hydrolytisch gegenüber

DISKUSSION

den F4-Fimbrien-Proteinen der Bakterien wirken kann. Bei der parallelen zeitlichen Supplementation könnte somit eine Bakterienanbindung an das Epithel verhindert werden. In einem ETEC-Belastungsversuch bei Ferkeln stellte sich heraus, dass Bromelain die ETEC F4-Rezeptoren auf den Darmzellen durch seine proteolytische Aktivität inaktivieren konnte (Chandler und Mynott, 1998). Im intakten Gastrointestinaltrakt besitzt das Darmepithel vermutlich eine höhere proteolytische Widerstandsfähigkeit als in dem hier durchgeführten *in vitro* Versuch. Der Einsatz von Bromelain als Supplementation *in vivo* könnte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der durchgeführten Laborstudie somit durchaus als vielversprechend hinsichtlich seiner Schutzwirkung gegenüber einer ETEC-Belastung erweisen.

Auch die Vorbehandlung der Zellen mit einer Mischung organischer Säuren (AM) besaß keine epithelschützende Wirkung. In diesem Fall konnten die organischen Säuren, die oftmals in der Praxis als Futterzusatzstoffe für die Verbesserung der Gesundheit und der Leistungsparameter vor allem während der Absetzphase eingesetzt werden (Partanen et al., 2001; Roth, 2005; Roth, 1998), offenbar nicht ausreichend wirken. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Vorbehandlung des Extraktes beachtet werden. In diesem Fall wurde der pH-Wert der Lösung vor der Zugabe auf pH 7 eingestellt, um eine Zellschädigung zu verhindern. Durch die Neutralisation des sauren pH-Wertes auf pH 7 kann davon ausgegangen werden, dass keine Säureeffekte mehr vorlagen die einen Einfluss auf das Epithel besitzen konnten.

Die antibakterielle Wirkung von *Thymus vulgaris* L. wurde als Futterzusatz bei Ferkeln und innerhalb einer *in vitro* Studie untersucht. Dabei zeigte sich der Zusatz innerhalb des Fütterungsversuches als unwirksam. Im Gegensatz dazu wirkte ein Thymianzusatz gegen hämolytische *E. coli* in einer früheren *in vitro* Studie antibakteriell (Jugl-Chizzola et al., 2005). Der Hauptbestandteil der ätherischen Öle ist fettlöslich. Aufgrund dieser Eigenschaft wäre es möglich, dass die fettlöslichen, wirkungsvollen Bestandteile des Thymianöls nicht im wasserlöslichen Extrakt gelöst werden konnten und die antibakterielle Wirkung daher ausblieb.

Bei der Anwendung von Steinfruchtbestandteile *in vitro* und *in vivo* (Ratten) konnte ein hohes antioxidatives Potential nachgewiesen werden (Celep et al., 2013; Gastol et al., 2013). Der hohe Phytonzidgehalt, der als antibiotisch wirksam zu betrachten ist, und Phenolsäuren, Flavonoide und Anthocyane verleihen ihnen eine hohe bakterizide Wirkung (Gastol et al., 2013).

DISKUSSION

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass innerhalb des durchgeführten *in vitro* Versuches weder durch Zugabe von Futterzusatzstoffen allein noch in Kombination mit einer ETEC-Belastung eine schützende oder epithelstabilisierende Wirkung nachgewiesen werden konnte.

5.3. Fütterungsversuch

Ernährungsfaktoren können die Entwicklung und Immunantworten von Schweinen beeinflussen. Die Datenerhebungen der gegenwärtigen Studie basieren auf Verfolgung von Effekten einer Impfung gegen PRRSV bei Ferkeln. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass nach der Impfung eine entsprechende Antikörperantwort hervorgerufen werden konnte. Diese konnte sowohl anhand von Antikörpertitern als auch durch ELISpot Resultate belegt werden. Basierend auf der immunologischen Messung liegt eine deutliche altersabhängige Wirkung vor. Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurden nicht identifiziert. Die fehlende Wirkung auf die Leistungsparameter der Ferkel kann teilweise durch den experimentellen Aufbau erklärt werden, da nur eine sehr begrenzte Anzahl an Wiederholungen pro Gruppe vorlag.

Lebendmasse und Lebendmassezunahme

Die Mittelwerte der vier Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die Lebendmassezunahme (Tabelle 4). Die erste Woche wird als Eingewöhnungsphase der Ferkel gesehen. In diesem Zeitraum kam es zu Lebendmasseabnahmen beziehungsweise nur zu geringen Lebendmassezunahmen. Insgesamt konnte die höchste Gewichtszunahme in der Gruppe BC mit dem probiotischen *Bacillus cereus* beobachtet werden. Diese Beobachtung konnte schon in vorausgehenden Versuchen bestätigt werden. Hierbei wurde die Auswirkung einer BC Supplementation bei Muttersauen während der späten Trächtigkeit und Laktation einschließlich der Wachstumsphase der geborenen Ferkel beurteilt. In allen untersuchten Gruppen (Muttersau und Ferkel) führte eine BC Supplementation zu einer gesteigerten Gewichtszunahme (Alexopoulos et al., 2001).

DISKUSSION

Futteraufnahme und Futteraufwand

Innerhalb der 5 Versuchswochen lagen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine Unterschiede in der Futteraufnahme vor. Für die durchschnittliche Futteraufnahme und die berechnete Futterverwertung konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Frühere Studien konnten das Potential des verwendeten probiotischen *Bacillus cereus* var. *Toyoi* bei Fütterungsversuchen beweisen (Taras et al., 2005).

Rinderkolostrum wird häufig als funktionelle Proteinverbindung in der Ferkelfütterung gesehen (Dunshea et al., 2002). Die positive Wirkung von sprühgetrocknetem Schweineplasma, das in gewisser Weise vergleichbar zu bovinem Kolostrum ist, konnte in einem Fütterungsversuch bestätigt werden (Boudry et al., 2008), wohingegen die positive Wirkung in einer weiteren Studie nicht belegt werden konnte (King et al., 2008).

Auch Hefeextrakte wurden bei Ferkeln verschiedentlich getestet. Jedoch gestaltet sich der Vergleich der Studien schwierig, da jeweils sehr verschiedene Produkte und Präparationen verwendet wurden. Lebende Hefen und Hefeprodukte werden als potentielle Alternativen zu antibiotischen Leistungsförderern gesehen. Dieses konnte in einzelnen Studien an Schweinen nachgewiesen werden (Bontempo et al., 2006; Li et al., 2006; Peet-Schwering et al., 2007; Shen et al., 2009; Spark et al., 2005). Andere Studien hingegen erzielten negative Ergebnisse (Sauerwein et al., 2007).

Unter Challengebedingungen zeigten Hefeprodukte positive Effekte bei Ferkeln. Ein *Saccharomyces cerevisiae* Fermentationsprodukt erzielte eine positive Wirkung bei Ferkeln nach Infektion mit *Salmonella* Typhimurium DT104 (Price et al., 2010) und *Escherichia coli* K88 (Kiarie et al., 2011a, b). Im Rahmen von LPS-Challengeversuchen bei Schweinen stabilisierten Hefezellwandbestandteile die Futteraufnahme und Leistung (Li et al., 2007). Ein Auszug aus dem Ananasstamm konnte nicht nur die Erkrankung infolge von K88+ETEC verursachtem Durchfall verringern, sondern führte auch zu einer deutlichen Steigerung der Leistungsparameter. Mit Blick auf die Tierleistung in Kombination mit einer PRRSV Impfung wurde dieser Zusatzstoff aber noch nicht untersucht (Chandler und Mynott, 1998).

DISKUSSION

5.3.1. Hämatologische und immunologische Parameter

Hämatologie

Die im Rahmen der Studie ermittelten Blutparameter lagen im Referenzbereich der für Ferkel dieser Altersgruppe vorliegenden Daten (Nerbas, 2008). Es gab im Versuchszeitraum deutliche zeitabhängige Änderungen der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte und der Konzentrationen der Leukozyten, Lymphozyten und Basophilen. Fütterungsbedingte Unterschiede wurden an den vier Tagen 0, 7, 21 und 35 nicht beobachtet.

Phänotypisierung der peripheren Blutleukozyten

Bei der Phänotypisierung der peripheren Blutleukozyten wurden zeitabhängige Veränderungen entdeckt. Nach der Impfung erfolgte ein Anstieg der $CD4^+CD8^+\alpha$ Lymphozyten. Fütterungsbedingte Unterschiede wurden nicht beobachtet. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein und spiegelt die Zeitachse der ontogenetischen immunologischen Entwicklung von Ferkeln wider (Davis et al., 2006; van der Peet-Schwering et al., 2007).

Der Anstieg der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte sowie der myeloischen und lymphatischen Zellen wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben (Davis et al., 2006; van der Peet-Schwering et al., 2007).

In der vorliegenden Studie war die individuelle Variation sehr hoch. Ein Effekt der Behandlung auf die Tiere konnte nicht beobachtet werden. Frühere Studien erzielten unter Verwendung verschiedener Fütterungsmaßnahmen vergleichbare Ergebnisse. Die Lymphozytenfraktion beinhaltete hauptsächlich T-Zellen. Die $CD2^+CD5^-$ Lymphozyten umfasste die NK-Zellen (Gerner et al., 2009; Yang and Parkhouse, 1996). Hier war ein zeitabhängiger Abfall der Messwerte festzustellen.

Der größte Teil der T-Zellpopulation bestand aus der $CD4^+CD8\alpha^+$ Fraktion. Sowohl die klassischen MHC Klasse I-bezogenen zytotoxischen T-Zellen und eine Minderheit der zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen (etwa 3% der PBMC) zeigten diesen Phänotyp. Die Mehrheit der zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen war negativ für CD2 und CD8. Diese Fraktion schien im Versuchsablauf unverändert. Die Prozentsätze der $CD2^-CD5^+$ Zellen (etwa 20%) entsprachen den Literaturergebnissen (Yang und Parkhouse, 1996).

DISKUSSION

Obwohl bisher die γ -Kette des T-Zell-Rezeptors nicht identifiziert werden kann, ist es möglich, die Entwicklung der Populationen annähernd zu beschreiben. Vorliegenden Daten zufolge stiegen die zu den klassischen MHC-Klasse-I-gehörenden zytotoxischen T-Zellen und die kleine Population der $CD8^+ \gamma\delta$ T-Zellen nach der Impfung gegen PRRSV an.

Aufgrund der verwendeten Antikörperkombination war es nicht möglich, zwischen den einzelnen Populationen zu unterscheiden. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass nur vier Zeitpunkte für die Blutentnahme vorlagen. Kurzfristige Änderungen konnten somit nicht beobachtet werden. Zudem verändert sich die Frequenz der $CD4^+ CD8^+$ Gedächtnis- und der Effektor T-Helferzellen mit der Zeit (Saalmüller et al., 2002). Ein Einfluss der Impfung auf die Lymphozyten wird vermutet. Da aber keine ungeimpfte Gruppe vorlag, kann keine gesicherte Aussage über den alleinigen Impfeinfluss getroffen werden.

Die Analyse der exprimierten Lymphozyten-Oberflächenmarker zeigte deutliche zeitabhängige Veränderungen, aber keine fütterungsbedingten Effekte. Der höchste Anstieg der heterogenen Fraktion an $CD4^+ CD8^+ \alpha$ Zellen, die die klassischen MHC-Klasse I-restringierten, zytotoxischen T-Zellen, die $CD8^+ \gamma\delta$ T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK) beschreibt, wurde 21 Tage nach der Impfung bestimmt. Anschließend verringerte sich der Wert ($P = 0,007$).

Der Anteil der $CD2^+ CD5^-$ Zell-Population, die die NK-Zellen beschreiben (de Bruin et al., 1997; Gerner et al., 2009) verringerte sich von Tag 0 bis Tag 35 in allen Gruppen ($P < 0,001$).

Über 39,4% der Lymphozyten entsprechen T-Zellen, die die Marker CD2 und CD5 co-exprimieren. Die Werte der Fraktion, einschließlich der $\alpha\beta^+$ T-Zellen und $CD2^+ \gamma\delta$ T-Zellen, behielten während der Beobachtungszeit ihr konstantes Niveau ($P = 0,552$). Im Gegensatz dazu verringerte sich der Anteil an $CD2^- CD5^+$ Zellen im Laufe der Zeit ($P = 0,070$).

Der Anteil an $CD4^+ CD8\alpha^-$ T-Helferzellen reduzierte sich von 24,4% bei Tag 0 auf 18,8% am Tag 35 ($P < 0,001$). Die $CD4^+ CD8\alpha^+$ doppelt-positiven Zellen, die als antigenerfahrene T-Helferzellen angesehen werden (Saalmüller et al., 2002), erhöhten sich altersabhängig in allen Gruppen ($P = 0,001$).

DISKUSSION

Die relativen Anteile der CD21⁺ Zellen und CD14⁺ Zellen, die die reifen B-Zellen und Monozyten beschreiben, wurden nur teilweise durch das Ferkelalter beeinflusst ($P < 0,001$ und 0,470).

Konzentration PRRSV spezifischer Antikörper

Zum Nachweis von spezifischen Immunglobulin G (IgG) Konzentrationen gegen PRRSV konnten 7 Tage nach der Impfung nur drei Tiere als positiv eingestuft werden. Nach 21 und 35 Tagen zeigten alle Tiere positive IgG-Titer. Während der Studie wurden zunehmende Konzentrationen von IgG-Titern ($P < 0,001$) bestimmt. Zwischen den Gruppen konnten aber keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung spezifischer Interaktionen zwischen der Verabreichung von Futtermittelzusatzstoffen und der Immunantwort von Schweinen nach einer Impfung gegen Krankheiten wie PRRSV wurden bisher nur wenige Versuche durchgeführt. Grundsätzlich ist es offensichtlich, dass die Immunantwort auf eine Impfung variiert und von individuellen Faktoren beeinflusst wird. Die Phänotypisierung peripherer Blutzellen zeigte altersbedingte Veränderungen, während fütterungsbedingte Effekte nicht beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Entwicklung des Immunsystems bei Schweinen vorwiegend vom Alter (Stepanova et al., 2007) abhängig ist. Ernährungsfaktoren zeigen offenbar weniger ausgeprägte Effekte, vergleichbare Beobachtungen wurden auch in anderen Studien aufgezeigt (Klinge et al., 2009).

Die Antikörpertiter gegen PRRSV nahmen innerhalb der 35-tägigen Versuchsperiode stetig zu. Diese Werte zeigten jedoch keine Abhängigkeiten in Zusammenhang mit der Fütterung. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Zufütterung von löslichen β -Glykanen die angeborene, antivirale Immunität gegen PRRSV bei 4 Monate alten Schweinen steigern konnte (Xiao et al., 2004). Auch der Einsatz von Soja-Genistein in einer Konzentration von 200 bis 400 ppm hat gezeigt, dass dieses als Immunmodulator wirken kann. Diese konnten die systematische Viruselimination steigern und das Wachstum in Challengeversuchen mit Viren bei Schweinen erhöhen (Greiner et al., 2001).

DISKUSSION

Bestimmung von IFN- γ sezernierenden Zellen mittels ELISpot Assay

In vorliegender Studie wurde der ELISpot Assay verwendet, um spezifische, Interferon- γ produzierende Zellen näher untersuchen zu können. Dabei stellte sich dieser Assay als prinzipiell gut geeignete Untersuchungsmethode dar.

Bei früheren Beobachtungen der spezifischen IFN- γ Produktion durch T-Zellen, das dem Maß der T-Zell-Zytotoxizität entspricht, wurden verzögerte IFN- γ Antworten beobachtet (Lopez, 2004).

Diese verzögerten Beobachtungen konnten in unserem Versuch mittels der ELISpot Methode bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass erst am Tag 35 signifikante Mengen an γ -Interferon-produzierenden Zellen nachgewiesen werden konnten. Fütterungsbedingte Effekte konnten nicht nachgewiesen werden.

In anderen Studien wurde die ELISpot Methode ebenfalls dazu verwendet, um die IFN- γ Antwort in naiven sowie gegen PRRSV geimpften Schweinen mit bestimmten PRRSV Peptiden als Stimuli zu untersuchen (Burgara-Estrella et al., 2013). Zudem wurde der ELISpot Assay verwendet, um die homologe und heterologe Immunantwort nach PRRSV Infektion überprüfen zu können (Diaz et al., 2005; Diaz et al., 2012). Somit stellt der eingesetzte ELISpot Assay, eine prinzipiell geeignete Methode dar, um den zeitlichen Ablauf der Interferonsekretion näher untersuchen zu können.

Aus der Messung der Immunantwort, die auf eine PRRSV Impfung erfolgte, kann zusammenfassend gefolgert werden, dass die Entwicklung des Immunsystems bei Ferkeln typischen zeitabhängigen Mustern folgt. Durch ein ausgewogenes Fütterungssystem und unter geeigneten sanitären Bedingungen wurden keine positiven Effekte durch Futtermittelzusatzstoffe festgestellt. Es wäre zu erwarten, dass bei einem anfälligen oder gesundheitlich gefährdeten Tier oder unter schlechteren hygienischen Bedingungen das Endergebnis einer Studie anders ausfallen könnte.

PERSPEKTIVE

6. PERSPEKTIVE

Die vorliegende Arbeit bestätigte die Möglichkeit, mittels der TEER Messmethode unter *in vitro* Bedingungen Futterzusatzstoffe und deren Wirkung auf das Zellepithel untersuchen zu können. Ebenfalls waren Infektionsversuche mit *E. coli* und deren Einfluss auf das Zellepithel möglich, ohne dabei Tierversuche durchführen zu müssen. Folglich könnte das Zellkultur-Modell als Screening-Instrument, ergänzend zu *in vivo* Studien mit Ferkeln eingesetzt werden. Darüber hinaus wäre es denkbar, Versuche mit weiteren pathogenen Bakterien durchzuführen, um deren Einfluss in Kombination mit unterschiedlichen Futterzusatzstoffen zu testen.

In dieser Arbeit wurde der ELISpot Assay adaptiert und ein PRRSV-Impfstoff als Stimulans eingesetzt. Dadurch zeigte sich, dass dieser zur Stimulation der Zellen eingesetzt werden konnte. Auf virusinfizierte Zellen oder das Virus selbst musste dabei nicht zurückgegriffen werden. Diese Änderung verringerte das Risiko einer unkontrollierten Ausbreitung einer Infektion.

ZUSAMMENFASSUNG

7. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen haben gezeigt, dass Futterzusatzstoffe effektiv zur Reduzierung von Durchfallerkrankungen, die von pathogenen *Escherichia coli* bei Absetzferkeln ausgelöst werden, eingesetzt werden können. Die intestinale porcine Epithelzelllinie IPEC-J2 wurde als ein *in vitro* Modell eingesetzt, um die Wirkung von Futterzusatzstoffen auf die Adhäsion sowie die zelltoxischen Effekte eines F4-positiven *E. coli* Stamms (ETEC, Abbotstown) zu bestimmen. Ein nicht pathogener Stamm (DSM 2840) wurde herangezogen, um den F4-Fimbrien Einfluss zu testen. Die Charakterisierung der Epithelkonfluenz wurde durch die Messung des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes (TEER) von IPEC-J2 Zellen erhoben. Die zu untersuchenden Futterzusatzstoffe wurden als wasserlösliche Extrakte in verschiedenen Verdünnungen und Inkubationszeiten (6 und 24 Stunden) eingesetzt. Die erfolgreiche Anbindung des F4-positiven *E. coli* Stamms an das IPEC-J2 Epithel führte bereits kurz nach der *in vitro* Infektion zu einer Reduzierung des TEER. Im Gegensatz dazu zeigte der Stamm DSM 2840 keine Veränderung des TEER. Die Extrakte von einer Säuremischung (AM), Rinderkolostrum (CM), Ananasstammextrakt, gemahlene und getrocknete Kernobststeinen (DS), Thymian (TY) und Hefezellwandbestandteilen von *Saccharomyces cerevisiae* (PV) übten keine positiven Effekte auf das IPEC-J2 Epithel aus. Die Verringerung des Widerstandes nach der ETEC-Infektion war in allen Versuchsgruppen vergleichbar und wurde durch die Zugabe der einzelnen Substanzen nicht beeinflusst.

In einem nächsten Schritt wurde die Immunantwort von Ferkeln auf eine Impfung gegen PRRSV untersucht, nachdem verschiedene Futtermittelzusatzstoffe eingesetzt wurden.

In dem Tierversuch wurden über die Dauer von 39 Tagen in fünf Gruppen je zehn abgesetzte Ferkel im Alter von drei Wochen eingesetzt. Die unterschiedlichen Versuchsgruppen beinhalteten eine autolysierte Hefepräparation (PV), getrocknete und gemahlene Kernobststeine (DS), Rinderkolostrum (CM) oder einen probiotischen *Bacillus cereus* var. *Toyoi* NCIMB 40112 als Zusatz.

Die Ferkel wurden eine Woche nach der Einnahme im Alter von drei Wochen gegen PRRSV geimpft. Dabei wurden Blutproben vor der Impfung sowie 7, 21 und 35 Tage nach der Impfung entnommen, um das Blutbild zu bestimmen und die Immunzellen mittels Durchflusszytometrie zu phänotypisieren. Zusätzlich wurden die spezifischen IgG

ZUSAMMENFASSUNG

Antikörpertiter bestimmt und ein ELISpot Assay etabliert, um spezifische Interferon- γ produzierende Lymphozyten detektieren zu können.

Die Leistungsparameter wurden durch die einzelnen Diäten nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten die hämatologischen Parameter und das Gesamtblutbild altersabhängige Veränderungen. Fütterungsbedingte Effekte konnten nicht aufgezeigt werden. Die Analyse der Lymphozytenoberflächenmarker wiesen deutliche zeitabhängige Veränderungen, aber keine diätbedingten Effekte auf. Die $CD4^+CD8\alpha^+$ Zellen erreichten ihre höchste Zahl 21 Tage nach der Impfung, um anschließend wieder abzusinken ($P = 0,007$). Die $CD2^+CD5^-$ Zellen nahmen in allen Gruppen bis zum Tag 35 stetig ab ($P < 0,001$). Die $CD2^+CD5^+$ Zellen verblieben während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant, während die Anzahl der $CD2^-CD5^+$ und $CD4^+CD8\alpha^-$ Zellen über die Zeit abfielen ($P = 0,07$, $P < 0,001$). Die $CD4^+CD8\alpha^+$ doppelt positiven Zellen stiegen in allen Gruppen altersbedingt an ($P = 0,001$). Die $CD21^+$ Zellen und $CD14^+$ Zellen wurden nur teilweise durch das Alter beeinflusst. Zunehmende spezifische IgG-Titer wurden im Versuchszeitraum bestimmt ($P < 0,001$). Gruppenspezifische Effekte konnten jedoch, ähnlich wie bei den INF- γ produzierenden T-Zellen, nicht nachgewiesen werden. Die Immunsystementwicklung bei Ferkeln scheint somit typischen zeitabhängigen Mustern zu folgen. Fehlende fütterungsbedingte Effekte auf die Immunantwort könnten in diesem Versuch auf die ausgewogene Ernährung und die guten sanitären Bedingungen begründet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mithilfe der TEER-Messmethode der schädigende Einfluss auf das Epithel und die Zellintegrität, ausgelöst durch eine F4-positive ETEC-Anbindung an IPEC-J2 Zellen, dargestellt werden konnte. Somit könnte das Zellkulturmodell zusammen mit der TEER-Messmethode ergänzend zu *in vivo* Infektionsversuchen mit Ferkeln als Screening-Tool eingesetzt werden. Die Wirksamkeit der Futterzusätze im Tier könnte sich unter anderen Bedingungen, z.B. weniger guter Haltungshygiene, anders darstellen als in vorliegendem Versuch.

SUMMARY

8. SUMMARY

Feed additives have been shown to be effective in reducing the incidence of post weaning diarrhea caused by pathogenic *Escherichia coli* in piglets. The intestinal porcine epithelial cell line IPEC-J2 was used as an *in vitro* model to assess effects of additives on the adhesion and cell toxic effects of a F4 positive *E. coli* strain (ETEC, Abbotstown). A non pathogenic strain (DSM 2840) was used to determine the impact of F4 fimbria. The confluence of the epithelium was characterized by measurement of transepithelial electrical resistance (TEER) of the IPEC-J2 cells. The feed additives were prepared as aqueous extract and tested in different dilutions and incubation times (6h and 24h). The F4 positive *E. coli* strain adhered to IPEC-J2 cells and reduced TEER shortly after *in vitro* infection. The strain DSM 2840 showed no TEER impairment. Extracts from organic acid mix (AM), bovine colostrum (CM), pineapple stems (BM), drupe stones (DS), a phytogetic product with thyme (TY) and yeast preparations of *Saccharomyces cerevisiae* (PV) had no positive effects on the IPEC-J2 epithelium. The TEER decrease after ETEC infection was in a comparable level and was not affected by the added substances. The cell culture model might be suitable as screening tool, to complement *in vivo* challenge trials with piglets.

The immune response of piglets to a vaccination against the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) was tested after feeding different feed additives. The trial included five groups of ten piglets and lasted 39 days. Feed additives were added to a control diet (C). Tested substances included an autolyzed yeast preparation from *Saccharomyces cerevisiae* (PV), dried and milled drupe stones (DS), dried bovine colostrum (CM) and the probiotic *B. cereus* var. *Toyo*. Three-week-old piglets were vaccinated against PRRS-Virus, blood samples were taken before vaccination and 7, 21, and 35 days after vaccination for complete blood counts, flow cytometry for immune cell phenotyping, measurement of specific IgG antibodies and ELISpot assay to detect specific interferon γ -producing lymphocytes. Animal performance was not affected by the experimental diets. Hematological parameters and complete blood counts displayed time-dependent changes, feed-related effects were not observed. The analysis of the expressed lymphocyte surface markers showed distinct time dependent shifts but no dietary effects. CD4⁻CD8 α ⁺ cells reached highest levels on day 21 post vaccination and decreased thereafter ($P = 0.007$), the CD2⁺CD5⁻ cells decreased in all groups towards day 35 ($P < 0.001$). CD2⁺CD5⁺ cells were determined at constant levels during the observation

SUMMARY

period, while $CD2^{-}CD5^{+}$ cells increased and $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$ cells decreased over time ($P = 0.07$, $P < 0.001$). $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$ double positive cells increased age-dependently in all groups ($P = 0.001$). $CD21^{+}$ cells and $CD14^{+}$ cells were only partially affected by age. Increasing levels of specific IgG were determined ($P < 0.001$), but group effects could not be demonstrated as for the interferon γ producing T cells. The development of the immune system in piglets seems to follow a typical time-dependent pattern, the lack of dietary effects on the immune response in this trial might be due to a balanced diet and appropriate sanitary conditions.

In conclusion, the destructing effect on cell integrity of IPEC-J2 cells by F4-positive ETEC could be demonstrated by using TEER measurements. Consequently, the cell culture model might be suitable as screening tool complementing *in vivo* trials with piglets.

The efficiency of feed additives in animals have to be interpreted carefully, as under different conditions, e.g. impaired hygiene, results might be different compared to the present experiment.

LITERATURVERZEICHNIS

LITERATURVERZEICHNIS

- Abreu, A.C., McBain, A.J., Simoes, M. (2012):
Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents.
Nat Prod Rep 29,1007-1021.
- Acheson, D.W., Luccioli, S. (2004):
Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses.
Best Pract Res Clin Gastroenterol 18, 387-404.
- AGES (2011):
"Wo stehen wir heute? – Antibiotika in der Nutztierhaltung und mögliche Konsequenzen".
<http://www.ages.at/ages/gesundheit/mensch/antibiotikaresistenzen/antibiotika-in-der-nutztierhaltung-und-moegliche-konsequenzen/>; letztes Update: 20.10.2011, letzter Zugriff: 05.02.2014.
- AID (2008):
AID ELISpot Assay. Verfügbar unter Internetadresse:
http://aid-diagnostika.com/deutsch/kits/elispot_assays.html (02.03.2014)
- Aidara-Kane, A. (2012):
Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective.
Rev Sci Tech 31, 277-287.
- Akira, S. (2000):
The role of IL-18 in innate immunity.
Curr Opin Immunol 12, 59-63.
- Albert, M. A., Kojic, L. D., Nabi, I. R., Dubreuil, J. D. (2011):
Cell type-dependent internalization of the Escherichia coli STb enterotoxin.
FEMS Immunol Med Microbiol 61, 205-217.
- Albina, E., Carrat, C., Charley, B. (1998):
Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
J Interferon Zytokine Res 18, 485-490.
- Alexopoulos, C., Karagiannidis, A., Kritas, S.K., Boscios, C., Georgoulakis, I.E., Kyriakis, S.C. (2001):
Field evaluation of a bioregulator containing live Bacillus cereus spores on health status and performance of sows and their litters.
Physiol Pathol Clin Med 48 (3), 137–145

LITERATURVERZEICHNIS

Aperce, C. C., Burkey, T. E., KuKanich, B., Crozier-Dodson, B. A., Dritz, S. S., Minton, J. E. (2010):

Interaction of *Bacillus* species and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in immune or inflammatory signaling from swine intestinal epithelial cells.
J Anim Sci 88, 1649-1656.

Arce, C., Ramirez-Boo, M., Lucena, C., Garrido, J. J. (2010):

Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*.
Comp Immunol Microbiol Infect Dis 33, 161-174.

Artis, D. (2008):

Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.
Nat Rev Immunol 8, 411-420.

Aruoma, O. I., Spencer, J. P., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. (1996):

An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs.
Food Chem Toxicol 34, 449-456.

Bandrick, M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S. K., Molitor, T. W. (2013):

Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets.
Dev Comp Immunol 43, 114-120.

Bassaganya-Riera, J., Thacker, B. J., Yu, S., Strait, E., Wannemühler, M. J., Thacker, E. L. (2004):

Impact of immunizations with porcine reproductive and respiratory syndrome virus on lymphoproliferative recall responses of CD8⁺ T cells.
Viral Immunol 17, 25-37.

Batista, L., Pijoan, C., Dee, S., Olin, M., Molitor, T., Joo, H. S., Xiao, Z., Murtaugh, M. (2004):

Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts.
Can J Vet Res 68, 267-273.

Bauchart-Thevret, C., Cui, L., Wu, G., Burrin, D. G. (2010):

Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide.
Am J Physiol Endocrinol Metab 299, E899-E909.

LITERATURVERZEICHNIS

- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Heffron, F. (1997):
Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells.
Adv Exp Med Biol 412, 149-158.
- Berschneider, M. (1989):
Development of a normal cultured small intestinal epithelial cell line which transport Na and Cl.
Gastroenterol 96, A41.
- Bilsborough, J., Viney, J. L. (2002):
Getting to the guts of immune regulation.
Immunology 106, 139-143.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J. C. (1997):
Cellular responses to interferon-gamma.
Annu Rev Immunol 15, 749-795.
- Böhmer, B. M., Salisch, H., Brigitte, R. Paulicks, Roth, F. X. (2009):
Echinacea purpurea as a potential immunostimulatory feed additive in laying hens and fattening pigs by intermittent application.
Livestock Sci 122, 81-85.
- Bontempo, V., Giancamillo, A. D., Savoini, G., Dell'Orto, V., Domeneghini, C. (2006):
Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets.
Anim Feed Sci Tech 129, 224-236.
- Borchardt, R. T. (2011):
Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability,
Gastroenterology, 96, 736-749, 1989--the backstory.
AAPS J 13, 323-327.
- Borghetti, P., De Angelis, E., Saleri, R., Cavalli, V., Cacchioli, A., Corradi, A., Mocchegiani, E., Martelli, P. (2006):
Peripheral T lymphocyte changes in neonatal piglets: Relationship with growth hormone (GH), prolactin (PRL) and cortisol changes.
Vet Immunol and Immunopathol 110, 17-25.
- Bosworth, B. T., Samuel, J. E., Moon, H. W., O'Brien, A. D., Gordon, V. M., Whipp, S. C. (1996):
Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine.
Infect Immun 64, 55-60.

LITERATURVERZEICHNIS

Boudry, C., Dehoux, J. P., Wavreille, J., Portetelle, D., Thewis, A., Buldgen, A. (2008):
Effect of a bovine colostrum whey supplementation on growth performance, faecal
Escherichia coli population and systemic immune response of piglets at weaning.
Animal 2, 730-737.

Brandtzaeg, P. (2009):
Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions.
Scand J Immunol 70, 505-515.

Brandtzaeg, P. (2011):
The gut as communicator between environment and host: immunological consequences.
Eur J Pharmacol 668 Suppl 1, 16-32.

Brassard, D. L., Grace, M. J., Bordens, R. W. (2002):
Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein.
J Leukoc Biol 71, 565-581.

Brosnahan, A. J., Brown, D. R. (2012):
Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations.
Vet Microbiol 156, 229-237.

Brown, D. R., Price, L. D. (2007):
Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an
epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine.
Vet Microbiol 8, 328-333.

Bruins, M. J., Cermak, R., Kiers, J. L., van der Meulen, J., van Amelsvoort, J. M., van
Klinken, B. J. (2006):
In vivo and in vitro effects of tea extracts on enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced
intestinal fluid loss in animal models.
J Pediatr Gastroenterol Nutr 43, 459-469.

Buddaert, W., Van Reeth, K., Pensaert, M. (1998):
In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory
syndrome virus (PRRSV).
Adv Exp Med Biol 440, 461-467.

Burgara-Estrella, A., Diaz, I., Rodriguez-Gomez, I. M., Essler, S. E., Hernandez, J., Mateu,
E. (2013):
Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory
syndrome virus are able to induce IFN-gamma and IL-10.
Viruses 5, 663-677.

LITERATURVERZEICHNIS

- Burt, S. A., van der Zee, R., et al. Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H. P., Veldhuizen, E. J. (2007):
Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7.
Appl Environ Microbiol 73, 4484-4490.
- Burton, D. R. (2002):
Antibodies, viruses and vaccines.
Nat Rev Immunol 2, 706-713.
- Busse, F. (2001):
Bekämpfung der PRRS-Erkrankung - Welcher Impfstoff passt am besten?
http://www.pigpool.de/infopool-schwein/impfungen/bekaempfung-der-prrs-erkrankung--welcher-impfstoff-passt-am-besten/did_2052035.html; letztes Update: 01.09.2001, letzter Zugriff: 18.03.2014
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999):
Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.
J Immunol 163, 4647-4650.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E. McMullin, P., Phillips, I. (2003):
The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health.
J Antimicrob Chemother 52, 159-161.
- Celep, E., Aydin, A., Kirmizibekmez, H., Yesilada, E. (2013):
Appraisal of in vitro and in vivo antioxidant activity potential of cornelian cherry leaves.
Food Chem Toxicol 62C, 448-455.
- Cencic, A. L., Langerholc, T. (2010):
Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review.
Int J Food Microbiol 141 Suppl 1, 4-14.
- Chandler, D.S., Mynott, T. L. (1998):
Bromelain protects piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*.
Gut 43, 196-202.
- Charerntantanakul, W. (2012):
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects.
World J Virol 1, 23-30.

LITERATURVERZEICHNIS

- Chareerntantanakul, W., Platt, R., Roth, J. A. (2006):
Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral Zytokine production.
Viral Immunol 19, 646-661.
- Chareerntantanakul, W., Roth, J. A. (2006):
Biology of porcine T lymphocytes.
Anim Health Res Rev 7, 81-96.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J. (2002):
Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo.
J Ethnopharmacol 79, 213-220.
- Cowan, M. M. (1999):
Plant products as antimicrobial agents.
Clin Microbiol Rev 12, 564-582.
- Craig, W. J. (1999):
Health-promoting properties of common herbs.
Am J Clin Nutr 70, 491S-499S.
- Davis, M. E., Sears, S. C. (2006):
Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being.
J Anim Sci 84, 743-756.
- de Bruin, M. G., van Rooij, E. M., Voermans, J. J., de Visser, Y. E., Bianchi, A. T., Kimman, T. G. (1997):
Establishment and characterization of porcine cytolytic cell lines and clones.
Vet Immunol Immunopathol 59, 337-347.
- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D. (2000):
Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates.
Arch Virol 145, 659-688.
- Devriendt, B., Stuyven, E., Verdonck, F., Goddeeris, B. M., Cox, E. (2010):
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells.
Dev Comp Immunol 34, 1175-1182.

LITERATURVERZEICHNIS

- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2005):
Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
J Gen Virol 86, 1943-1951.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2006):
Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs.
Virology 351, 249-259.
- Diaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., Lopez, S., Galindo, I., Segales, J., Martin, M., Pujols, J., Mateu, E. (2012):
Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.
Vet Res 43, 30.
- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. (1994):
Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria.
Pharm Acta Helv 69, 25-28.
- Diesing, A. K. N., Panther, P., Walk, N., Post, A., Kluess, J., Kreuzmann, P., Danicke, S., Rothkötter, H. J., Kahlert, S. (2011b):
Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2.
Toxicol Lett 200, 8-18.
- Diesing, A.K., Nossol, C., Dänicke, S., Walk, N., Post, A.; Kahlert, S.; Rothkötter, H. J., Kluess J. (2011a):
Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application.
PLoS One 6, e 17472. Doi: 10.1371/journal.pone.0017472.
- Domig, K.J., Deans, S. G. (2005):
Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer
4. BOKU-Symposium Tierernährung. Oktober 2005, Wien, Österreich
- Dorman, H. J., Deans, S. G. (2000):
Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.
J Appl Microbiol 88, 308-316.
- Duarte, M. C., Leme, E. E., Delarmelina, C., Soares, A. A., Figueira, G. M., Sartoratto, A. (2007):
Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli.
J Ethnopharmacol 111, 197-201.

LITERATURVERZEICHNIS

Dubreuil, J. D. (2012):

The whole Shebang: the gastrointestinal tract, Escherichia coli enterotoxins and secretion. *Curr Issues Mol Biol* 14, 71-82.

Dubreuil, J. D. (2013):

Antibacterial and antidiarrheal activities of plant products against enterotoxinogenic Escherichia coli.

Toxins 5, 2009-2041.

Dunshea, F. R., Kerton, D. K. (2002):

Diets containing high-quality animal proteins increase growth of early-weaned pigs.

Aust J Agric Res 53, 779-784.

Dwivedi, V., Manickam, C., Patterson, R., Dodson, K., Murtaugh, M., Torrelles, J. B., Schlesinger, L. S., Renukaradhya, G. J. (2011):

Cross-protective immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus by intranasal delivery of a live virus vaccine with a potent adjuvant.

Vaccine 29, 4058-4066.

Eckel, B., Roth, F. X., Kirchgessner, M., Eidelsburger, U. (1992):

Zum Einfluß von Ameisensäure auf die Konzentration an Ammoniak und biogenen Aminen im Gastrointestinaltrakt.

J Anim Physiol Anim Nutr 67, 198-205.

Eicher, S. D., McKee, C. A., Carroll, J. A., Pajor, E. A. (2006):

Supplemental vitamin C and yeast cell wall beta-glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning.

J Anim Sci 84, 2352-2360.

Eidelburger, U. (1997):

Organische Säuren in der Schweinefütterung - Wirkungswiese als Basis für die richtige Produktwahl Deutsche Vilomix.

Tagungsband, 24-40.

Elicker, S., Sipos, W. (2009):

Compatibility of a combined vaccination against Haemophilus parasuis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Berl Munch Tierarztl Wochenschr 122, 354-357.

Ermund, A., Gustafsson, J. K., Hansson, g. C., Keita, A. V. (2013):

Mucus Properties and Goblet Cell Quantification in Mouse, Rat and Human Ileal Peyer's Patches.

PLoS One 8, e83688. Doi: 10.1371/journal.pone.0083688.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fairbrother, J. M., Nadeau, E., Gyles, C. L. (2005):
Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies.
Anim Health Res Rev 6, 17-39.
- Feuerpfeil, I., Lopez-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E., Szewzyk, R. (1999):
Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt.
In: Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 37-50.
- Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R., Coffman R. L. (1988):
IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses.
J Immunol 140, 1022-1027.
- Flaishon, L., Hershkoviz, R., Lantner, F., Lider, O., Alon, R., Levo, Y., Flavell, R. A., Shachar, I. (2000):
Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells.
J Exp Med 192, 1381-1388.
- Fromm, M., Krug, S. M., Zeissig, S., Richter, J. F., Rosenthal, R., Schulzke, J. D., Gunzel, D. (2009):
High-resolution analysis of barrier function.
Ann N Y Acad Sci 1165, 74-81.
- Frucht, D. M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J. J., Koyasu, S. (2001):
IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge.
Trends Immunol 22, 556-560.
- Fukao, T., Matsuda, S., Koyasu, S. (2000):
Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells.
J Immunol 164, 64-71.
- Galla, H., Müller, H. J. (1988):
In: Spektroskopische Methoden in der Biochemie: Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1-10
- Gallois, M., Rothkotter, Bailey, M., Stokes, C. R., Oswald, I. P. (2009):
Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role?
Animal 3, 1644-1661.
- Ganner, A., Schatzmayr, G. (2012):
Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system.
Appl Microbiol Biotechnol 95, 289-297.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ganner, A., Stoiber, C., Uhlik, J. T., Dohnal, I., Schatzmayr, G. (2013):
Quantitative evaluation of E. coli F4 and Salmonella Typhimurium binding capacity of yeast derivatives.
AMB Express 3, 62.
- Gannon, V. P., Gyles, C. L., Friendship, R. W. (1988):
Characteristics of verotoxigenic Escherichia coli from pigs.
Can J Vet Res 52, 331-337.
- García, C. C., Talarico, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte, E. B. (2003):
Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina.
Phytother Res 17, 1073-1075.
- Gastol, M., Krosniak, M., Derwicz, M., Dobrowolska-Iwanek, J. (2013):
Cornelian cherry (cornus MAS L.) juice as a potential source of biological compounds.
J Med Food 16, 728-732.
- Ge, B., LaFon, P. C., Carter, P. J., McDermott, S. D., Abbott, J., Glenn, A., Ayers, S. L., Friedman, S. L., Paige, J. C., Wagner, D. D., Zhao, S., McDermott, P. F., Rasmussen, M. A. (2013):
Retrospective analysis of Salmonella, Campylobacter, Escherichia coli, and Enterococcus in animal feed ingredients.
Foodborne Pathog Dis 10, 684-691.
- Geens, M. M., Niewold, T. A. (2010):
Preliminary Characterization of the Transcriptional Response of the Porcine Intestinal Cell Line IPEC-J2 to Enterotoxigenic Escherichia coli, Escherichia coli, and E. coli Lipopolysaccharide.
Comp Funct Genomics 2010, 469583.
- Geens, M. M., Niewold, T. A. (2011):
Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization.
Cytotechnology 63, 415-423.
- GermanMeat, (2011):
Die deutsche Fleischwirtschaft – Experten für Qualität, Service und Zuverlässigkeit
<http://www.german-meat.org/de/fleisch-aus-deutschland/schlachtung-und-zerlegung/>,
letzter Zugriff 05.04.2014
- Gerner, W., Käser, T., Saalmüller, A. (2009):
Porcine T lymphocytes and NK cells-an update.
Dev Comp Immunol 33, 310-320.

LITERATURVERZEICHNIS

Gessani, S., Belardelli, F. (1998):

IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance.
Cytokine Growth Factor Rev 9, 117-123.

Glenn, L. M., Lindsey, R. L., Folster, J. P., Pecic, G., Boerlin, P., Gilmour, M. W., Harbottle, H., Zhao, S., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P. J., Frye, J. G. (2013):

Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada.
Microb Drug Resist 19, 175-184.

Golab, J., Zagozdzon, Stoklosa, T., Kaminski, R., Kozar, K., Jakobisiak, M. (2000):

Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far?
Immunol Lett 72, 153-157.

Gomes-Neves, E., Antunes, P., Manageiro, V., Gärtner, F., Canica, M., da Costa, J. M., Peixe, L. (2014):

Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir.
Vet Microbiol 168, 229-233.

Gopal, P. K., Gill, H. S. (2000):

Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum.
Br J Nutr 84 Suppl 1, 69-74.

Greiner, L. L., Stahly, T. S., Stabel, T. J. (2001):

The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge.
J Anim Sci 79, 1272-1279.

Guessous, F., Marcinkiewicz, M., Polanowska-Grabowska, R., Kongkhum, S., Heatherly, D., Obrig, T., Gear, A. R. (2005):

Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function.
Infect Immun 73, 8306-8316.

Guggenbuhl, P., Séon, A., Piñón Quintana, A., Simões Nunes, C. (2007):

Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital[®]) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig.
Livestock Sci 108, 218-221.

Günzel, D., Zakrzewski, S. S., Schmid, T., Pangalos, M., Wiedenhoeft, J., Blasse, C., Ozboda, C., Krug, S. M. (2012):

From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy.
Ann N Y Acad Sci 1257, 142-151.

LITERATURVERZEICHNIS

Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X. J., Lum, M. A., Andrews, J. J., Rathje, J. A. (1995):

Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus.

Vet Pathol 32, 648-660.

Hale, L. P., Greer, P. K., Trinh, C. T., James, C. L. (2005):

Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations.

Int Immunopharmacol 5, 783-793.

Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L., Lund, F. E. (2000):

Reciprocal regulation of polarized Zytokine production by effector B and T cells.

Nat Immunol 1, 475-482.

Henry, R. W., Pickard, D. W., Hughes, P. E. (1985):

Citric acid and fumaric acid as food additives for early-weaned piglets.

J Anim Sci 40, 505-509.

Heo, J. M., Opapeju, F. O., Pluske, J. R., Kim, J. C., Hampson, D. J., Nyachoti, C. M. (2013):

Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds.

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 97, 207-237.

Hermes, R. G., Manzanilla, E. G., Martín-Orúe, S. M., Pérez, J. F., Klasing, K. C. (2011):

Influence of dietary ingredients on in vitro inflammatory response of intestinal porcine epithelial cells challenged by an enterotoxigenic Escherichia coli (K88).

Comp Immunol Microb 34, 479-488.

Hester, S. N., Chen, X., Li, M., Monaco, M. H., Comstock, S. S., Kuhlenschmidt, T. B., Kuhlenschmidt, M. S., Donovan, S. M. (2013):

Human milk oligosaccharides inhibit rotavirus infectivity in vitro and in acutely infected piglets.

Br J Nutr 110, 1233-1242.

Holderness, J., Hedges, J. F., Daughenbaugh, K., Kimmel, E., Graff, J., Freedman, B., Jutila, M. A. (2008):

Response of gammadelta T Cells to plant-derived tannins.

Crit Rev Immunol 28, 377-402.

Holt, J.G. Krieg, N. R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994):

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

In: Baltimore, M., USA. (Ed.) Williams & Wilkins.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hörügel, K. (2004):
Gesunderhaltung der Nutztierbestände.
In: Schriftreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Hörmansdorfer, S. (2012):
Tierkrankheiten - Bakterielle Pilzinfektionen - Escherichia coli
http://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle_pilzinfektionen/escherichia_coli/; letztes Update: 16.03.2012, letzter Zugriff: 04.02. 2014
- Huguet, A., Le Dividich, J., Le Huërou-Luron, I. (2012):
Improvement of growth performance and sanitary status of weaned piglets fed a bovine colostrum-supplemented diet.
J Anim Sci 90, 1513-1520.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik M. (2005):
Immunobiology: the immune system in health and disease.
6. Aufl. 2005 Garland Science Publishing.
- Johnson, A. M., Kaushik, R. S., Francis, D. H., Fleckenstein, J. M., Hardwidge, P. R. (2009):
Heat-labile enterotoxin promotes Escherichia coli adherence to intestinal epithelial cells.
J Bacteriol 191, 178-186.
- Johnson, A. M., Kaushik, R. S., Hardwidge, P. R. (2010):
Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic Escherichia coli.
Vet Microbiol 141, 115-119.
- Johnson, I. R., Ball, R. O., Baracos, V. E., Field, C. J. (2006):
Glutamine supplementation influences immune development in the newly weaned piglet.
Dev Comp Immunol 30, 1191-1202.
- Kaeffer, B., Bottreau, E., Velge, P., Pardon, P. (1993):
Epithelioid and fibroblastic cell lines derived from the ileum of an adult histocompatible miniature boar (d/d haplotype) and immortalized by SV40 plasmid.
Eur J Cell Biol 62, 152-162.
- Käser, T., Gerner, W., Hammes, S. E., Patzl, M., Saalmüller, A. (2008):
Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells.
Vet Immunol Immunopathol 122, 153-158.
- Keffaber, K. K. (1989):
Reproductive failure of unknown etiology.
Am Assoc Swine Pract News 1, 1-10.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kiarie, E., Bhandari, S., Scott, M., Krause, D. O., Nyachoti, C. M. (2011):
Growth performance and gastrointestinal microbial ecology responses of piglets receiving *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products after an oral challenge with *Escherichia coli* (K88).
J Anim Sci 89, 1062-1078.
- Kim, T. S., Benfield, D. A., Rowland, R. R. (2002):
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis.
Virus Res 85, 133-140.
- Kimman, T. G., Cornelissen, L. A., Moormann, R. J., Rebel, J. M., Stockhofe-Zurwieden, N. (2009):
Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology.
Vaccine 27, 3704-3718.
- King, M. R., Morel, P. C. H., Pluske, J. R., Hendriks, W. H. (2008):
A comparison of the effects of dietary spray-dried bovine colostrum and animal plasma on growth and intestinal histology in weaner pigs.
Livestock Sci 119, 167-173.
- King, M. R., Revell, D. K.; Pluske, J. R. (2008):
Dietary bovine colostrum increases villus height and decreases small intestine weight in early-weaned pigs.
Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21, 567 - 573.
- Kirchgessner, M. R.. (1988):
Ergotrope Effekte durch organische Säuren in der Ferkelaufzucht und Schweinemast.
Übers. Tierernährg. 16.
- Kirk, D. D., Rempel, R., Pinkhasov, J., Walmsley, A. M. (2004):
Application of *Quillaja saponaria* extracts as oral adjuvants for plant-made vaccines.
Expert Opin Biol Ther 4, 947-958.
- Klinge, K. L., Vaughn, E. M., Roof, M. B., Bautista, E. M., Murtaugh, M. P. (2009):
Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine.
Virology 6, 177.
- Knarreborg, A. M., Granli, T.; Jensen, B. B. (2002):
Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets.
Anim Feed Sci Tech 99, 131-140.

LITERATURVERZEICHNIS

Kogan, G., Kocher, A. (2007):

Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection.
Livestock Sci 109, 161-165.

Kolodziejczak, D., Da Costa Dias, B. (2010):

Prion interaction with the 37-kDa/67-kDa laminin receptor on enterocytes as a cellular model for intestinal uptake of prions.
J Mol Biol 402, 293-300.

Kreutz, L. C., Ackermann, M. R. (1996):

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway.
Virus Res 42, 137-147.

Kroismayr, A., Schedle, K., Sehm, J., Pfaffl, M., Plitzner, C., Foissy, H., Etle, T., Mayer, H., Schreiner, M., Windisch, W. (2008):

Effects of antimicrobial feed additives on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets.
Bodenkultur 59, 111-120

Krosniak, M., Gastol, M., Szalkowski, M., Zagrodzki, P., Derwicz, M. (2010):

Cornelian cherry (*cornus MAS L.*) juices as a source of minerals in human diet.
J Toxicol Environ Health A 73, 1155-1158.

Kümmerer, K., (2004):

Resistance in the environment.
J Antimicrob Chemoth 54, 311-320

Kunisawa, J., Takahashi, I., Kiyono, H. (2007):

Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine.
Immunol Rev 215, 136-153.

Lackovic, G., Tomaskovic, M., et al Njari, B., Vrbanac, I., Krsnik, B., Rode, B., Valpotic, I. (1999):

Distribution of immune cells expressing CD3a, CD21 and S-100 protein markers in the porcine gut-associated lymphoid tissues.
Eur J Histochem 43, 39-46.

Lallés, J., Bosi, P., Janczyk, P., Koopmans, S. J., Torrallardona, D. (2007):

Nutritional management of gut health in pigs around weaning.
Proc Nutr Soc 66, 260-268.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lee, S.-M., Schommer, S. K., Kleiboeker, S. B. (2004):
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes.
Vet Immunol Immunopathol 102, 217-231.
- Lee, W. J., Farmer, J. L., Hilty, M., Kim, Y. B. (1998):
The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets.
Infect Immun 66, 1421-1426.
- Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M., Fung, K. P. (2006):
Polysaccharide biological response modifiers.
Immunol Let 105, 101-114.
- Li, J., Kim, I. H. (2014):
Effects of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall extract and poplar propolis ethanol extract supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota and fecal noxious gas emissions in growing pigs.
Anim Sci J 85, 698-705.
- Li, J., Li, D., Gong, L., Ma, Y., He, Y., Zhai, H. (2006):
Effects of live yeast on the performance, nutrient digestibility, gastrointestinal microbiota and concentration of volatile fatty acids in weanling pigs.
Archives of Animal Nutrition 60, 277-288.
- Li, J., Li, D. F., Xing, J. J., Cheng, Z. B., Lai, C. H. (2007):
Effects of beta -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide.
J Anim Sci 84, 2374-2381.
- Li, X. (2000):
Immunomodulating Components From Chinese Medicines.
Pharm Biol 38, 33-40.
- Lipsitch, M., Samore, M. H. (2002):
Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective.
Emerg Infect Dis 8, 347-354.
- Liu, F., Li, G., Wen, K., Bui, T., Cao, D., Zhang, Y., Yuan, L. (2010):
Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics.
Viral Immunol 23, 135-149.

LITERATURVERZEICHNIS

Liu, Y. (2010):

Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 299no. G1087-G1096.

Lo, D. Y., Chen, T. H., Chien, M. S., Koge, K., Hosono, A., Kaminogawa, S., Lee, W. C. (2005):

Effects of sugar cane extract on the modulation of immunity in pigs.

J Vet Med Sci 67, 591-597.

Lopez, O. J. O. (2004):

Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity.

Vet Immunol Immunopathol 102, 155-163.

Lückstädt, C. (2005):

Acid-phytobiotic blends. A sustainable alternative for feed safety, animal health and natural growth promotion in pig farming.

In: Feed Mix, pp. 25-27.

Lückstädt, C. (2007):

Acidifiers in Animal Nutrition - A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance

Nottingham University Press, 63-69

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Jestin, A. (1998):

Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors.

Prev Vet Med 35, 53-72.

Mader, A. (2011):

Biological effects of industrial plant residues in pigs.

Dissertation, Wien, Vetmed. Univ. Vienna.

Magar, R., Larochelle, R., Dea, S., Gagnon, C. A., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D. A. (1995):

Antigenic comparison of Canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein.

Can J Vet Res 59, 232-234.

Manzanilla, E. G., Nofrarias, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J. F., Martin-Orue, S. M., Kamel, C., Gasa, J. (2006):

Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs.

J Anim Sci 84, 2743-2751.

LITERATURVERZEICHNIS

- Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., Gasa, J. (2004):
Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs.
J Anim Sci 82, 3210-3218.
- Marciani, J. D. (2005):
Iminbildende Polysaccharide, deren Herstellung und Verwendung als Zusatzmittel und
immunstimulierende Mittel,
Galenica Pharmaceuticals, I., ed. (Google Patents).
- Mariani, V., Palermo, S., Fiorentini, S., Lanubile, A., Giuffra, E. (2009):
Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and
IPI-2I.
Vet Immunol Immunopathol 131, 278-284.
- Martinez, J., Peris, B., Gomez, E. A., Corpa, J. M. (2009):
The relationship between infectious and non-infectious herd factors with pneumonia at
slaughter and productive parameters in fattening pigs.
Vet J 179, 240-246.
- Marucci, F., Waller, M., Kirchner, H. Krammer, P. (1981):
Production of immune interferon by murine T-cell clones from long-term cultures.
Nature 291, 79-81.
- Mateu, E., Diaz, I. (2008):
The challenge of PRRS immunology.
Vet J 177, 345-351.
- Mazurek, J., Pusz, P., Bok, E., Stosik, M., Baldy-Chudzik, K. (2013):
The phenotypic and genotypic characteristics of antibiotic resistance in *Escherichia coli*
populations isolated from farm animals with different exposure to antimicrobial agents.
Pol J Microbiol 62, 173-179.
- McDermott, P. F., Walker, R. D., White, D. G. (2003):
Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance.
Int J Toxicol 22, 135-143.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M., Kiyono, H.
(1992):
The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development.
Vaccine 10, 75-88.
- Meier, W., Wheeler, J., Husmann, R. J., Osorio, F., Zuckermann, F. A. (2000):
Characteristics of the immune response of pigs to PRRS virus.
Vet Res 31, 41.

LITERATURVERZEICHNIS

Meier, W. A., Galeota, J., Osorio, F. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., Zuckermann, F. A. (2003):

Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination.

Virology 309, 18-31.

Meier, W. A., Husmann, R. J., Schnitzlein, W. M., Osorio, F. A., Lunney, J. K., Zuckermann, F. A. (2004):

Cytokines and synthetic double-stranded RNA augment the T helper 1 immune response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Vet Immunol Immunopathol 102, 299-314.

Mengeling, W. L., Lager, K. M., Wesley, R. D., Clouser, D. F., Vorwald, A. C., Roof, M. B. (1999):

Diagnostic implications of concurrent inoculation with attenuated and virulent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

Am J Vet Res 60, 119-122.

Metzler-Zebeli, B. U., Zebeli, Q. (2013):

Cereal beta-glucan alters nutrient digestibility and microbial activity in the intestinal tract of pigs, and lower manure ammonia emission: a meta-analysis.

J Anim Sci 91, 3188-3199.

M'Ikanatha, N., Sandt, C. H., Localio, A. R., Tewari, D., Rankin, S. C., Whichard, J. M., Altekruise, S. F., Lautenbach, E., Folster, J. P., Russo, A., Chiller, T. M., Reynolds, S. M., McDermott, P. F. (2010):

Multidrug-resistant Salmonella isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates.

Foodborne Pathog Dis 7, 929-934.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. (1986):

Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.

J Immunol 136, 2348-2357.

Mowat, A. M. (2003):

Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.

Nat Rev Immunol 3, 331-341.

Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. (2001):

Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground. Immunol Lett 75, 159-160.

LITERATURVERZEICHNIS

- Murtaugh, M. P., Xiao, Z., Zuckermann, F. (2002):
Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.
Viral Immunol 15, 533-547.
- Mynott, T. L., Luke, R. K., Chandler, D. S. (1996):
Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic Escherichia coli receptor activity in piglet small intestine.
Gut 38, 28-32.
- Nagy, B., Fekete, P. Z. (1999):
Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals.
Vet Res 30, 259-284.
- Naumann, K., Bassler, R., Seibold, R., Barth, K. (1976):
Methodenbuch III, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln.
3. Aufl., Darmstadt: VDLUFA-Verlag
- Nerbas, E. (2008):
Aktualisierung von Blutparametern beim Schwein.
Dissertation, Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Neumann, E. J., Kliebenstein, J. B., Johnson, C. D., Mabry, J. W., Bush, E. J., Seitzinger, A. H., Green, A. L., Zimmerman, J. J. (2005):
Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States.
J Am Vet Med Assoc 227, 385-392.
- Newberry, R. D., Lorenz, R. G. (2005):
Organizing a mucosal defense.
Immunol Rev 206, 6-21.
- Ofek, I., Hasty, D. L., Sharon, N. (2003):
Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems.
FEMS Immunol Med Microbiol 38, 181-191.
- OIE (1992):
World Animal Health 1992: Part 1: Reports on the Animal health status and disease control methods and List A disease outbreaks – statistics.
Office International des Épizooties, Paris
- Olin, M. R., Batista, L., Xiao, Z., Dee, S. A., Murtaugh, M. P., Pijoan, C. C., Molitor, T. W. (2005):
Gammadelta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
Viral Immunol 18, 490-499.

LITERATURVERZEICHNIS

Osorio, F. A., Galeota, J. A., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., Laegreid, W. W. (2002):

Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity.

Virology 302, 9-20.

Osorio, F. A., Zuckermann, F., Wills, F., Meier, R., Christian, S., Galeota, J., Doster, A. (1998):

PRRSV: Comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence

Allen D. Lemman Swine Conference, 176-182.

Ostrowski, M., Galeota, J. A., Jar, A. M., Platt, K. B., Osorio, F. A., Lopez, O. J. (2002):

Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain.

J Virol 76, 4241-4250.

Palzer, A., Ritzmann, M., Majzoub, M., Wolf, G., Hermanns, W., Heinritzi, K. (2007):

[Frequency of occurrence of pneumonia associated agents and their correlation with clinical and pathological-anatomical findings in pigs].

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 120, 483-489.

Pan, L., Qin, G., Zhao, Y., Wang, J., Liu, F., Che, D. (2013):

Effects of soybean agglutinin on mechanical barrier function and tight junction protein expression in intestinal epithelial cells from piglets.

Int J Mol Sci 14, 21689-21704.

Partanen, K. H., Mroz, Z. (1999):

Organic acids for performance enhancement in pig diets.

Nutr Res Rev 12, 117-145.

Partanen, L., Marttinen, N., Alatosava, T. (2001):

Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*.

Syst Appl Microbiol 24, 500-506.

Passlack, N. (2010):

Untersuchungen zum Einfluss von Inulin und thermisch behandelten Ackerbohnen auf immunologische Parameter bei Sauen, Saug- und Absetzferkeln.

Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin

LITERATURVERZEICHNIS

Pauly, T., Weiland, E., Hirt, W., Dreyer-Bux, C., Maurer, S., Summerfield, A., Saalmüller, A. (1996):

Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes.

Immunology 88, 238-246.

Peet-Schwering, C. M. C, van der Jansman, A. J. M., Smidt, H., Yoon, I. (2007):

Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs.

J Anim Sci 85, 3099-3109.

Pei, R. S., Zhou, F., Ji, B. P., Xu, J. (2009):

Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against E. coli with an improved method.

J Food Sci 74, M379-383.

Peluso, I., Miglio, C., Morabito, G., Ioannone, F., Serafini, M. (2013):

Flavonoids and immune function in human: a systematic review.

Crit Rev Food Sci Nutr.2. Doi:10.1080/10408398.2012.656770

Percival, S. S. (2009):

Grape consumption supports immunity in animals and humans.

J Nutr 139, 1801S-1805S.

Piriou-Guzylack, L., Salmon, H. (2008):

Membrane markers of the immune cells in swine: an update.

Vet Res 39, 54.

Plana Duran, J. C. A., Climent Sanchez, I. (2006):

Recombinant viruses containing prrs proteins and the same diagnostic kits and vaccines,

Deutsches Patentamt. DE69533690 T2. Veröffentlichungsdatum: 09.03.2006

Platel, K., Srinivasan, K. (2004):

Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?

Indian J Med Res 119, 167-179.

Pluske, J. R. (2013):

Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs.

J Anim Sci Biotechnol 4, 1-7.

Pluske, J. R., Hampson, D. J., Williams, I. H. (1997):

Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review.

Livest Prod Sci 51, 215-236.

LITERATURVERZEICHNIS

- Powell, D. W. (1981):
Barrier function of epithelia.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol 241, G275-G288.
- Price, K. L., Totty, H. R., Lee, H. B., Utt, M. D., Fitzner, G. E., Yoon, I., Ponder, M. A., Escobar, J. (2010):
Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection.
J Anim Sci 88, 3896-3908.
- Radulovic, N. S., Blagojevic, P. D., Stojanovic-Radic, Z. Z., Stojanovic, N. M. (2013):
Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action.
Curr Med Chem 20, 932-952.
- Rahman, M. M., McFadden, G. (2006):
Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens.
PLoS Pathog 2, e20004. Doi: 10.1371/journal.ppat.0020004
- Rasschaert, K., Verdonck, F., Goddeeris, B. M., Duchateau, L., Cox, E. (2007):
Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection.
Vet Microbiol 123, 249-253.
- Resch, M. M. (2009)
Immunologie UTB basics. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer
- Reuss, L. (1991):
Tight junction permeability to ions and water.
In: Cereijido, M., Anderson, J. M., Tight Junctions, 2. Aufl, CRC Press Inc., Boca Raton, 62-83
- Risley, C. R., Kornegay, E. T., Lindemann, M. D., Wood, C. M., Eigel, W. N. (1992):
Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs.
J Anim Sci 70, 196-206.
- Roselli, M., Britti, M. S., Le Huerou-Luron, I., Marfaing, H., Zhu, W. Y., Mengheri, E. (2007):
Effect of different plant extracts and natural substances (PENS) against membrane damage induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in pig intestinal cells.
Toxicol In Vitro 21, 224-229.
- Roselli, M., Finamore, A., Britti, M. S., Mengheri, E. (2006):
Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88.
Br J Nutr 95, 1177-1184.

LITERATURVERZEICHNIS

Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M., Nelson, E. A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D. A. (1995):

Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs.

Vet Pathol 32, 361-373.

Rossow, K. D., Morrison, R. B., Goyal, S. M., Singh, G. S., Collins, J. E. (1994):

Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

J Vet Diagn Invest 6, 368-371.

Roth, F. X., Ettle, T. (2005):

Organische Säuren: Alternative zu antibiotischen Leistungsförderern.

Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer

4. BOKU-Symposium Tierernährung. Oktober 2005, Wien, Österreich

Roth, F.X., Kirchgessner, M. (1998):

Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects.

J Anim Feed Sci 7, 25-33

Ruan, X., Knudsen, D. E., Wollenberg, K. M., Sack, D. A., Zhang, W. (2013):

Multiepitope fusion antigen induces broadly protective antibodies that prevent adherence of Escherichia coli strains expressing colonization factor antigen I (CFA/I), CFA/II, and CFA/IV.

Clin Vaccine Immunol 21, 243-9.

Ruth, M. R., Field, C. J. (2013):

The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue.

J Anim Sci Biotechnol 4, 27.

Saalmüller, A. (2006):

New understanding of immunological mechanisms.

Vet Microbiol 117, 32-38.

Saalmüller, A., Bryant, J. (1994):

Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines.

Vet Immunol Immunopathol 43, 45-52.

Saalmüller, A., Werner, T., Fachinger, V. (2002):

T-helper cells from naive to committed.

Vet Immunol Immunopathol 87, 137-145.

LITERATURVERZEICHNIS

- Saei-Dehkordi, S. S., Fallah, A. A., Kousha, S. (2012):
Chemical composition and antioxidative activity of *Echinophora platyloba* DC. essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms.
J Food Sci 77, M631-637.
- Sang, Y., Ramanathan, B., Ross, C. R., Blecha, F. (2005):
Gene silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in beta-defensin-1 expression.
Infect Immun 73, 7133-7141.
- Sauerwein, H., Schmitz, S., Hiss, S. (2007):
Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs.
J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 91, 369-380.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U. Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L. H. (2006):
Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine.
Histochem Cell Biol 125, 293-305.
- Schulze, K. G. (2011):
Genetische Veränderbarkeit des PRRS Virus.
<http://www.prrs.de/genetische-veraenderung.aspx>; letzter Zugriff: 05.05.2014
- Sen, G. C. (2001):
Viruses and interferons.
Annu Rev Microbiol 55, 255-281.
- Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., Zhen, Y. G. (2009):
Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs.
J Anim Sci 87, 2614-2624.
- Shin, K., Fogg, V. C., Margolis, B. (2006):
Tight junctions and cell polarity.
Annu Rev Cell Dev Biol 22, 207-235.
- Sinkora, M., Butler, J.E., Holtmeier, W., Sinkorova, J. (2005):
Lymphocyte development in fetal piglets: facts and surprises.
Vet Immunol Immunopathol 108, 177-184.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sinkora, M., Sinkora, J., Rehakova, Z., Splichal, I., Yang, H., Parkhouse, R. M., Trebichavsk, I. (1998):
Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs.
Immunology 95, 595-603.
- Skjolaas, K. A., Burkey, T. E., Dritz, S. s., Minton, J. E. (2006):
Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and Zytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells.
Vet Immunol Immunopathol 111, 199-209.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., Gunther, N. W. T. (2014):
Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.
Adv Appl Microbiol 86, 145-197.
- Smith, M. G., Jordan, D., Chapman, T. A., Chin, J. J., Barton, M. D., Fahy, V. A., Fairbrother, J. M., Trott, D. J. (2010):
Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea.
Vet Microbiol 145, 299-307.
- Solomakos, N. G., Koidis, P.; Botsoglou, N. (2008):
The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage.
Food Microbiol 25, 120-127.
- Solomons, N. W. (2002):
Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrum concentrates.
Eur J Clin Nutr 56 Suppl 3, 24-28.
- Sonck, E., Stuyven, E., Goodeeris, B., Cox, E. (2010):
The effect of beta-glucans on porcine leukocytes.
Vet Immunol Immunopathol 135, 199-207.
- Sonntag, A. K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L. H., Schmidt, M. A., Karch, H. (2005):
Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells.
Appl Environ Microbiol 71, 8855-8863.
- Spark, M., Paschertz, H., Kamphues, J. (2005):
Yeast (different sources and levels) as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism.
J Anim Physiol Anim Nutr 89, 184-188.

LITERATURVERZEICHNIS

- Spitzer, F., Speiser, S., Vahjen, W., Zentek J. (2014):
Effect of feed ingredients and additives on IPEC-J2 cells challenged with a F4-
enterotoxigenic *Escherichia coli* strain
Manuskript in Vorbereitung
- Srinivasan, K. (2005):
Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research.
Food Res Int 38, 77-86.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M. B., Scherbakov, A. V., Timina, A. M., Krabbe, J. S.,
Chabros, K., Potapchuk, D. (2008):
Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory
syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe.
Arch Virol 153, 1479-1488.
- Stepanova, H., Samankova, P., Leva, L., Sinkora, J., Faldyna, M. (2007):
Early postnatal development of the immune system in piglets: the redistribution of T
lymphocyte subsets.
Cell Immunol 249, 73-79.
- Stokes, C. R., Bailey, M., Haverson, K., Harris, C., Jones, P., Inman, C., Pie, S., Oswald, I.
P., Williams, B. A., Akkermans, A. D. L., Sowa, E., Rothkötter, H. J., Miller, B. G. (2004):
Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process
of weaning.
Anim Res 53, 325-334.
- Summerfield, A., Saalmüller, A. (1998)
Interleukin-2 dependent selective activation of porcine gamma delta T lymphocytes by an
extract from the leaves of *Acanthospermum hispidum*.
Int J Immunopharmacol 20, 85-98.
- Sundrum, A. B., Benninger T., Richter, U. (2004):
Statusbericht zum Stand der Tiergesundheit in der ökologischen Tierhaltung -
Schlussfolgerungen und Handlungsoptionen für die Agrarpolitik.
[http://orgprints.org/5232/Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung](http://orgprints.org/5232/Bundesanstalt_für_Landwirtschaft_und_Ernährung); letztes Update:
12.04.2012; letzter Zugriff 10.03.2014
- Suryanarayana, M., Rajasekhar, M. V. (2012):
Organic acids in swine feeding - A Review.
Agri Sci Res J 2, 523- 533.
- Svendsen, J., Larsen, J. L. (1977):
Studies of the pathogenesis of enteric E. coli infections in weaned pigs. The significance of
the milk of the dam in preventing the disease.
Nord Vet Med 29, 533-538.

LITERATURVERZEICHNIS

- Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O. (2005):
Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets.
Arch 59, 405-417.
- Taylor, P. W. (2013):
Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents.
Int J Antimicrob Agents 42, 195-201.
- Thacker, E. L. (2001):
Immunology of the porcine respiratory disease complex.
Vet Clin North Am Food Anim Pract 17, 551-565.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B. J. (1999):
Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia.
J Clin Microbiol 37, 620-627.
- Thacker, P. A. (2013):
Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review.
J Anim Sci Biotechnol 4, 35.
- Thanawongnuwech, R., Suradhat, S. (2010):
Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design.
Virus Res 154, 133-140.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, B. (2004):
Increased production of proinflammatory Zytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Clin Diagn Lab Immunol 11, 901-908.
- TopAgrar (1996):
Wenn die Erreger Hochzeit feiern
<http://www.bossow.de/Schweine/Bibliothek/texte/erreger.htm>; letzter Zugriff 20. 03. 2014)
- Turner, J. L., Dritz, S. S., Higgins, J. J., Herkelman, K. L., Minton, J. E. (2002a):
Effects of a *Quillaja saponaria* extract on growth performance and immune function of weanling pigs challenged with *Salmonella typhimurium*.
J Anim Sci 80, 1939-1946.
- Turner, J. L., Dritz, S. S., Higgins, J. J., Minton, J. E. (2002b):
Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on growth performance and immune function of young pigs challenged with *Salmonella typhimurium*.
J Anim Sci 80, 1947-1953.

LITERATURVERZEICHNIS

- Turner, J.R. (2009):
Intestinal mucosal barrier function in health and disease.
Nat Rev Immunol 9, 799-809.
- van Beers-Schreurs, H. M. G., Vellenga, L. (1992):
The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review.
Vet Quart 14, 29-34.
- van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2005):
In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains.
Int J Food Microbiol 101, 29-39.
- van der Peet-Schwering, C. M., Jansman, A. J., Schmidt, H., Yoon, I. (2007):
Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs.
J Anim Sci 85, 3099-3109.
- van Itallie, M., Anderson, C., Melvin, J. (2004):
The Molecular Physiology of Tight Junction Pores.
Physiology 19, 331-338.
- van Reeth, K. (1997):
Pathogenesis and clinical aspects of a respiratory porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection.
Vet Microbiol 55, 223-230.
- van Reeth, K., Labarque, G., et al. (1999a):
Differential production of proinflammatory Cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity.
Res Vet Sci 67, 47-52.
- van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynch, H., Pensaet, M. (1999b):
Differential production of proinflammatory Cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity.
Res Vet Sci 67, 47-52.
- Veldhuizen, E. J. A., Koomen, I., Ultee, T., van Dijk, A., Haagsman, H. P. (2009):
Salmonella serovar specific upregulation of porcine defensins 1 and 2 in a jejunal epithelial cell line.
Vet Microbiol 136, 69-75.
- VO (EG) Nr. 1831/2003.
Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wallace, R. J. (2004):
Antimicrobial properties of plant secondary metabolites.
Proc Nutr Soc 63, 621-629.
- Whiting, T. L., Pasma, T. (2008):
Isolated weaning technology: humane benefits and concerns in the production of pork.
Can Vet J 49, 293-301.
- Wilson, J., Winter, M., Shasby, D. M. (1990):
Oxidants, ATP depletion, and endothelial permeability to macromolecules.
Blood 76, 2578-2582.
- Winter, M., Wilson, J. S., Bedell, K., Shasby, D. M. (1990):
The conductance of cultured epithelial cell monolayers: oxidants, adenosine triphosphate,
and phorbol dibutyrate.
Am J Respir Cell Mol Biol 2, 355-363.
- WPI, World Precision Instruments Inc. (2006):
Trans Epithelial Electric Resistance (TEER) Measurements,
<http://www.pharmaceutical-int.com/article/trans-epithelial-electric-resistance-teer-measurements.html>, letzter Zugriff: 08. 04. 2014
- Xiao, Z., Trincado, C. A., Murtaugh, M. P. (2004):
Beta-glucan enhancement of T cell IFN γ response in swine.
Vet Immunol Immunopathol 102, 315-320.
- Yang, H., Parkhouse, R. M. (1996):
Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid
tissues.
Immunology 89, 76-83.
- Yin, X., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Johnson, R. P., Zhu, J., Liu, B., Gyles, C. L.
(2009):
Adherence of Escherichia coli O157:H7 mutants in vitro and in ligated pig intestines.
Appl Environ Microbiol 75, 4975-4983.
- Yoon, K. J., Wu, L. L., Zimmermann, J. J., Platt, K. B. (1997):
Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in
their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection.
Vet Microbiol 55, 277-287.
- Yoon, K. J., Zimmerman, J. J., Swenson, S. L., McGinley, M. J., Eernisse, K. A., Brevik,
A., Rhinehart, L. L., Frey, M. L., Hill, H. T., Platt, K. B. (1995):
Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory
syndrome (PRRS) virus infection.
J Vet Diagn Invest 7, 305-312.

LITERATURVERZEICHNIS

- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., Nakanishi, K. (1998):
IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production.
J Immunol 161, 3400-3407.
- Zakrzewski, S., Richter, J. F., Krug, S. M., Jebautzke, B., Lee, I. F. M., Rieger, J., Sachtleben, M., Bondzio, A., Schulzke, J. D. Fromm, M., Günzel, D. (2013):
Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium.
PLoS One 8, e79643. Doi: 10.1371/journal.pone.0079643
- Zentek, J., Ferrara, F., Pieper, R., Tedin, L., Meyer, W., Vahjen, W. (2013a):
Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets.
J Anim Sci 91, 3200-3210.
- Zentek, J., Gärtner, S., Tedin, L., Männer, K., Mader, A., Vahjen, W. (2013b):
Fenugreek seed affects intestinal microbiota and immunological variables in piglets after weaning.
Br J Nutr 109, 859-866.
- Zhou, M., Duan, Q. (2013):
Both flagella and F4 fimbriae from F4ac+ enterotoxigenic Escherichia coli contribute to attachment to IPEC-J2 cells in vitro.
Vet Res 44, 1-6.
- Zimmerman, J. J., Yoon, K. J., Wills, R. W., Swenson, S. L. (1997):
General overview of PRRSV: a perspective from the United States.
Vet Microbiol 55, 187-196.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AM	Futterzusatz mit Säurenmischung (Acid Mix)
APC	Antigen präsentierende Zellen (Antigen Presenting Cell)
BM	Futterzusatz Ananasstammextrakt (Bromelain)
CD	Cluster of Differentiation
CM	Futterzusatz Rinderkolostrum (Colostrum)
Con A	Concanavalin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle-Medium
DS	Futterzusatz Steinfruchtkerne (Drupe Stones)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDEC	Ödemkrankheit (Edema Disease <i>E. coli</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
EVOM	Epitheliales Voltohmmeter
F	Fimbrien
FA	Futteraufnahme
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC-H	Forward Scatter
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GP5	Glykoprotein 5
HT-29	Human colon adenocarcinoma grade II cell line
HNO ₃	Salpetersäure
IHC	Immunhistochemie
IEC	Intestinale Epithelzellen (Intestinal epithelial cells)
IEL	Intestinale Lymphozyten (Intestinal epithelial lymphocytes)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF-I	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor)
IL	Interleukin
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria-Bertani
LMZ	Lebendmassezunahme

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LSM	Lymphozyten-Separations-Medium
ME	Metabolisierbare Energie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major-Histocompatibility-Complex)
MLN	Mesenteriale Lymphknoten (Mesenteric lymph nodes)
MUC2	Muzin-Gen 2 (Mucin-Gen 2)
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natronlauge
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (Natural Killer Cells)
oR	Organischer Rest
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PP	Peyersche Platten
Ppm	Parts per million
PRRSV	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
PV	Hefezellwandbestandteil
PWD	Post weaning diarrhea
Rfa	Rohfaser
Rfe	Rohfett
R _{med}	Gesamtwiderstand der Zelle
Rp	Rohprotein
R _{para}	Parazellulärer Widerstand
RT-PCR	Real-Time-PCR (Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction)
R _{trans}	Transzellulärer Widerstand
S.	<i>Salmonella</i>
SFU	Spot-Forming-Units
spp.	Species pluralis
SSC-H	Sideward Scatter
STEC	Shiga-Toxin produzierende <i>E. coli</i>
Stx2e	Shiga-Toxin 2e
SWC	Swine workshop cluster
TCR	T-Zellrezeptor
TEER	Transepithelialer Elektrischer Widerstand (Transepithelial Electrical Resistance)
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor
T _{H1}	Typ-1 Helferzelle
T _{H2}	Typ-2 Helferzelle
TJ	Tight Junctions
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tregs	Regulatorische T-Zelle

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TS	Trockensubstanz
TY	Futterzusatz Thymianextrakt
VT2e	Verotoxin 2e
VTEC	Verotoxin produzierende <i>E. coli</i>

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Übersicht über <i>E. coli</i> bedingte Erkrankungen bei Schweinen (Hörmansdorfer, 2012)	10
Tabelle 2:	Zelluläre Molekülexpression in IPEC-J2 Zellen (Brosnahan und Brown, 2012)	25
Tabelle 3:	Immunmolekülexpression in IPEC-J2 Zellen (Brosnahan und Brown, 2012)	27
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Starterfutters und des Ferkelaufzuchtfutters	44
Tabelle 5:	Analysierte Zusammensetzung der Ferkelstarterfutter	45
Tabelle 6:	Analysierte Zusammensetzung der Ferkelaufzuchtfutter	46
Tabelle 7:	Phänotypisierung der Blutleukozyten (Passlack, 2010)	52
Tabelle 8:	Übersicht über die in der vorliegenden Studie eingesetzten primären Antikörper	52
Tabelle 9:	Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung des primären Antikörpers	53
Tabelle 10:	Mittelwerte des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von nicht infizierten IPEC-J2 Zellen nach der Behandlung verschiedener Extraktverdünnungen mit den Konzentrationen 10^{-2} g/l bis 10^{-5} g/l	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 11:	Mittelwert des Transepithelialen Elektrischer Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen <i>E. coli</i> Stamm und nach der 24-stündigen Behandlung mit verschiedenen Extrakten (Verdünnung: 10^{-2} g/l) sowie auftretender TEER Abfall nach der Infektion (ohne Bromelain), Mittelwert \pm Standardabweichung	67
Tabelle 12:	Mittlere Lebendmassen und mittlere tägliche Lebendmassezunahme der Fütterungsgruppen je Woche innerhalb der 39-tägigen Versuchsperiode, Mittelwert \pm Standardabweichung	68
Tabelle 13:	Durchschnittliche tägliche Futteraufnahme (dFI) und mittlerer Futteraufwand (FA) der Ferkel der verschiedenen Fütterungsgruppen während einer 39-tägigen Versuchsperiode ¹ (n=5), Mittelwert \pm Standardabweichung	69
Tabelle 14:	Hämatologische Parameter und weiße Blutzellen der Ferkel an den Tagen 0, 7, 21 und 35 der Versuchsperiode; Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 5) ¹	71
Tabelle 15:	Verteilung der Immunzellen im Ferkelblut (Angaben in Prozent (%)) der durch Oberflächendifferenzierungsmarker detektierten Lymphozyten) am Tag der Impfung (Tag 0) sowie 7, 21 und 35 Tage nach der Impfung innerhalb der Versuchsperiode; Mittelwert \pm Standardabweichung (n=5) ¹	72
Tabelle 16:	Nachweis von IgG-Antikörpern gegen PRRSV im Plasma der Versuchsferkel an den Tagen 7, 21 und 35 p.i. während der Versuchsperiode ¹ mittels PRRS Antikörper ELISA (X3, IDEXX (BioScreen, Hannover)) (OD-Werte)	73

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 17:	IFN- γ produzierende Zellen in SFU (Spot Forming Units) der Ferkel 0, 7, 21 und 35 Tage nach der PRRSV Impfung im Vergleich zur Stimulationskontrolle Con A3 und zur Medium-Kontrolle, Mittelwert \pm Standardabweichung (n=5) ¹	74
Tabelle 18:	IFN- γ produzierende Zellen in SFU (Spot Forming Units) der Ferkel an den Tagen 7, 21 und 35 nach der PRRSV Impfung ¹	75
Tabelle 19:	Darstellung des TEER Verlaufes einer IPEC-J2 Zelllinie während einer Infektion mit einem F4 positiven <i>E. coli</i> Stamm Abbotstown als positive Infektionskontrolle und zum Vergleich mit einem F4 negativen <i>E. coli</i> Stamm DSM 2840 als negative Infektionskontrolle (n = 3)	140
Tabelle 20:	Mittelwerte des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von nicht infizierten IPEC-J2 Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Extraktverdünnungen ¹ inklusive Bromelain mit den Konzentrationen 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l	141
Tabelle 21:	Mittelwert des TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen <i>E. coli</i> Stamm und nach der 6-stündigen Behandlung mit verschiedenen Extrakten (Verdünnung: 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l) sowie auftretendem TEER-Abfall nach der Infektion mit Bromelain	142
Tabelle 22:	Mittelwert des TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen <i>E. coli</i> Stamm und nach der 24-stündigen Extrakt-Behandlung (Verdünnung: 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l) sowie auftretendem TEER Abfall nach der Infektion mit Bromelain	143

TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 23:** Nachweis von IgG-Antikörpern gegen PRRSV im Plasma der Versuchsferkel an den Tagen 7, 21 und 35 PI während der Versuchsperiode1 mittels PRRS Antikörper ELISA (X3, IDEXX (BioScreen, Hannover)) (OD-Werte als Ableser-Ergebnis4)

144

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1:** Phänotypische Einteilung der porcinen Leukozyten anhand spezifischer Cluster of Differentiation (CD). Variabler Ausdruck; (high) hohe Dichte, Ausdruck; (low) niedrige Dichte, Ausdruck (+) CD/SWC hohe Expression; (-) CD/SWC nicht exprimiert; (+/-) variable Expression nach Piriou-Guzylack und Salmon (2008) **18**
- Abbildung 2:** Infektion mit PRRSV. Darstellung zeitlicher Verlauf der γ -IFN produzierenden Zellen sowie die Bildung der ersten neutralisierenden Antikörper während der PRRSV Erkrankung nach Lopez (2004) **22**
- Abbildung 3:** Schematischer Aufbau einer einzelnen Transwell-Support-Einheit. Transwell-System (Corning Costar) zur Züchtung und Durchführung von Transportversuchen an künstlichen Epithelien. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind durch die Inserts in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment geteilt. Durch Zugabe der zu untersuchenden Substanz des apikalen Kompartimentes kann der Transport über das Epithel untersucht werden (Günzel et al., 2012) **38**
- Abbildung 4:** Endohm-Messkammer mit aufgesetztem Deckel inklusiver integrierter Elektrode sowie eingelegtem Insert (WPI, 2006) **38**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 5:** Pipettierschema der Extraktverdünnungen (Konzentrationsverdünnung 10^{-02} - 10^{-05} g/l) ohne Infektion mit 10^{05} IPEC-J2/300 μ l je Vertiefung. Negativkontrolle als Vergleichswert ohne Zellen mit reinem Kulturmedium (0-5 Ω cm²). IPEC-J2 Medium als Vergleich des Zellwachstums ohne Extrakteinfluss **39**
- Abbildung 6:** Pipettierschema der Extraktverdünnungen (Konzentrationsverdünnung 10^{-02} - 10^{-05} g/l) für die Infektion der Epithelzellen IPEC-J2 (10^{05} IPEC-J2/300 μ l je Vertiefung) mit der positiven Kontrolle *E. coli* (Abbotstown) oder Negativkontrolle *E. coli* (DSM 2840) in einem Verhältnis von 1:3 IPEC J-2:*E. coli* **39**
- Abbildung 7:** Aufbau und zeitlicher Ablauf des Fütterungsversuches mit den 5 unterschiedlichen Fütterungsgruppen. Die Gruppe CO entspricht der Kontrolle. Die Gruppe BC erhielt Toyocerin[®], die Gruppe DS gemahlene und getrocknete Steinfruchtkerne, die Gruppe CM bovines Kolostrum und die Versuchsgruppe PV Hefezellwandbestandteile **42**
- Abbildung 8:** Zweiparameterdarstellung im Streudiagramm nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten im Blut **55**
- Abbildung 9:** Darstellung eines negativen ELISpots (links) im Vergleich zu einem positiven ELISpot (rechts) in der Aufsicht. Jeder einzelne Spot stellt die Anwesenheit einer sekretierenden Zelle dar (AID, 2008) **58**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 10:** ELISpot Readout eines CTL ImmunoSpot[®]S5 (Micro Analyzer, Cleveland, USA). Die Zellen der Reihen 1-3 (A-H) und 6-8 (A-H) wurden mit PRRSV Impfstoff stimuliert. Die Zellen der Reihen 4-5 (A-H) und 10-11 (A-H) wurden mit dem Mitogen Con A (3µg/ml u. 5µg/ml) stimuliert. Reihe 6 (A-H) und Reihe 12 (A-H) enthielten nur Medium ohne Zellen. **59**
- Abbildung 11:** Pipettierschema einer halben ELISpot Platte: Endvolumen entsprechend 200 µl, bestehend aus 100 µl Zellstimulus und 100 µl Zellsuspension bzw. 200 µl reines Medium ohne Zellen (Kontrolle). Als positives Stimulans wurde das Mitogen Con A (3 µg/ml und 5 µg/ml) eingesetzt. Der PRRSV Stimulus wurde mit Kultrmedium 1:1 verdünnt und anschließend auf die Platte aufgetragen (Endkonzentration des Stimulans auf der Platte = 1:4) **61**
- Abbildung 12:** Darstellung des TEER Verlaufes einer IPEC-J2 Zelllinie während einer Infektion mit einem F4 positiven *E. coli* Stamm Abbotstown als positive Infektionskontrolle und zum Vergleich mit einem F4 negativen *E. coli* Stamm DSM 2840 als negative Infektionskontrolle (n = 3) **64**

ANHANG

ANHANG

Tabelle 19: Darstellung des TEER Verlaufes einer IPEC-J2 Zelllinie während einer Infektion mit einem F4 positiven *E. coli* Stamm Abbotstown als positive Infektionskontrolle und zum Vergleich mit einem F4 negativen *E. coli* Stamm DSM 2840 als negative Infektionskontrolle (n = 3)

<i>E. coli</i>	Durchgang	-3 Tage	-2 Tage	-1 Tag	Infektion	+1 Tag	+2 Tage
DSM 2840¹	1	5600	6357	4744	5013	5761	5545
	2	807	4298	3305	3589	3827	4252
	3	5240	6252	5675	5217	6604	7714
	MW	3882	5635	4575	4606	5397	5837
	SEM ³	1541	670	689	512	822	1010
Abbotstown²	1	632	3064	3828	3073	1590	27
	2	3061	3347	3321	3484	1906	2211
	3	5050	6068	5261	5959	1890	2023
	MW	2914	4159	4136	4172	1795	1420
	SEM ³	1277	958	581	901	103	699
P-Wert		0,654	0,275	0,652	0,697	0,012*	0,023*

¹Negative Infektionskontrolle

²Positive Infektionskontrolle

³Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

*Signifikanz bei Werten < 0,05

ANHANG

Tabelle 20: Mittelwerte des Transepithelialen Elektrischen Widerstandes ($\Omega \text{ cm}^2$) von nicht infizierten IPEC-J2 Zellen nach der Behandlung mit verschiedenen Extraktverdünnungen¹ inklusive Bromelain mit den Konzentrationen 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l

Futterzusatz	Tag				
	3	6	9	12	15
Kontrolle	220	2491	4493	6182	8066
Extraktverdünnung 10^{-2}					
AM	282	2702	4094	4820	6541
BM	209	3490	2034	13	14
CM	243	3285	5943	7042	9320
DS	223	1946	2528	3353	4792
PV	277	3018	4620	7590	8219
TY	260	3198	5917	8638	10260
SEM ²	25	343	629	901	953
P-Wert ³	0,967	0,875	0,355	0,047*	0,002*
Extraktverdünnung 10^{-3}					
AM	162	2470	4095	5771	7353
BM	163	2608	2278	123	1594
CM	173	1934	4611	7775	8666
DS	165	2263	3924	6096	7751
PV	352	2519	3485	5337	6901
TY	192	1704	2545	5529	7292
SEM ²	22	366	581	848	815
P-Wert ³	0,041*	0,987	0,884	0,331	0,133
Extraktverdünnung 10^{-4}					
AM	180	1897	2852	4714	6025
BM	167	2580	4815	7118	7368
CM	195	3396	6400	7251	10175
DS	204	1668	3355	5446	7197
PV	310	2209	3360	5384	7353
TY	205	1815	3514	5539	6895
SEM ²	23	313	474	576	594
P-Wert ³	0,576	0,771	0,262	0,862	0,512
Extraktverdünnung 10^{-5}					
AM	183	1651	2748	4486	5335
BM	181	3088	5216	7024	7644
CM	228	5002	6892	7499	9173
DS	216	2090	4237	6387	6670
PV	392	2441	3216	5020	7646
TY	255	2332	4108	6706	7861
SEM ²	27	396	521	685	675
P-Wert ³	0,227	0,289	0,232	0,847	0,757

¹AM: Säurenmischung; BM: Bromelain; CM: Kolostrum; DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*; TY: Thymianauszüge

²Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

³Vergleich der Mittelwerte innerhalb derselben Spalte

*Signifikanz bei Werten $< 0,05$

ANHANG

Tabelle 21: Mittelwert des TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und nach der 6-stündigen Behandlung mit verschiedenen Extrakten (Verdünnung: 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l) sowie auftretendem TEER-Abfall nach der Infektion mit Bromelain

Futterzusatz	Zeit		
	TEER vor Infektion 3 Tag	TEER vor Infektion 5 Tag	TEER nach Infektion
Kontrolle, nicht	3752	4707	3272
Kontrolle, infiziert	3823	4755	1305
Extraktverdünnung 10^{-2}			
AM	4125	6822	1657
BM	3377	4233	391
CM	4386	5013	1680
DS	3637	4265	1608
PV	3637	4635	1190
TY	3902	4443	2618
SEM ²	318	465	206
P-Wert ³	0,907	0,650	0,030*
Extraktverdünnung 10^{-3}			
AM	4073	4527	1597
BM	3809	4949	1815
CM	3819	4839	1578
DS	4162	5005	1668
PV	3986	4747	1647
TY	3900	4264	2510
SEM ²	246	207	147
P-Wert ³	0,999	0,938	0,471
Extraktverdünnung 10^{-4}			
AM	3723	4216	1779
BM	3182	4552	1752
CM	3422	4776	2151
DS	3548	4996	1666
PV	3238	4727	1325
TY	3701	4146	2557
SEM ²	276	190	174
P-Wert ³	0,993	0,824	0,455
Extraktverdünnung 10^{-5}			
AM	4736	4717	1664
BM	3144	4532	1685
CM	3412	4563	1862
DS	4024	5127	1690
PV	3490	4896	1894
TY	3822	4294	2598
SEM ²	325	184	143
P-Wert ³	0,827	0,876	0,436

¹AM: Säurenmischung; BM: Bromelain; CM: Kolostrum; DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*, TY: Thymianauszüge

²Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

³Vergleich der Mittelwerte innerhalb derselben Spalte; *Signifikanz bei Werten $< 0,05$

ANHANG

Tabelle 22: Mittelwert des TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) von IPEC-J2 Zellen vor der Infektion mit einem enterotoxischen *E. coli* Stamm und nach der 24-stündigen Extrakt-Behandlung (Verdünnung: 10^{-2} g/l - 10^{-5} g/l) sowie auftretendem TEER Abfall nach der Infektion mit Bromelain

Futterzusatz	Zeit		
	TEER vor Infektion 3 Tag	TEER vor Infektion 5 Tage	TEER nach Infektion
Kontrolle, nicht infiziert	1035	3360	3877
Kontrolle, infiziert	1261	3043	2122
Extraktverdünnung 10^{-2}			
AM	1239	3120	2118
BM	1061	2279	148
CM	1120	3121	2404
DS	1581	3009	2102
PV	1322	3151	1577
TY	1131	3559	1849
SEM ²	109	202	209
P-Wert ³	0,960	0,920	0,000*
Extraktverdünnung 10^{-3}			
AM	1356	2849	2101
BM	1132	2823	1978
CM	959	2887	2276
DS	1402	3033	1927
PV	1359	3090	1867
TY	1296	3220	2197
SEM ²	145	269	93
P-Wert ³	0,970	1,000	0,830
Extraktverdünnung 10^{-4}			
AM	1442	2844	2216
BM	1022	2852	2215
CM	615	2966	2102
DS	1318	2680	1848
PV	1554	3137	2165
TY	1588	2928	2057
SEM ²	163	217	69
P-Wert ³	0,540	1,000	0,700
Extraktverdünnung 10^{-5}			
AM	1192	2904	1785
BM	1091	2858	2139
CM	612	2643	2113
DS	1276	3260	2146
PV	1400	3092	2049
TY	1208	2850	1835
SEM ²	131	252	82
P-Wert ³	0,670	0,990	0,740

¹AM: Säurenmischung; CM: Kolostrum; BM: Bromelain; DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*; TY: Thymianauszüge

²Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

³Vergleich der Mittelwerte innerhalb derselben Spalte; *Signifikanz bei Werten $< 0,05$

ANHANG

Tabelle 23: Nachweis von IgG-Antikörpern gegen PRRSV im Plasma der Versuchsferkel an den Tagen 7, 21 und 35 PI während der Versuchsperiode¹ mittels PRRS Antikörper ELISA (X3, IDEXX (BioScreen, Hannover)) (OD-Werte als Ablese-Ergebnis⁴)

Zeitpunkt	Gruppe ²						P-Wert		
	C	BC	CM	DS	PV	SEM ³	Zeit	Gruppe	Zeit x Gruppe
7	0	0	0	0	0	0			
21	3	3	3	4	3	0	<0,001*	0,303	0,435
35	4	4	4	4	4	0			

¹Anzahl der Versuchseinheit waren 5 Boxen mit jeweils 2 Ferkel (w / m)

²C: Kontrollgruppe, BC: *Bacillus cereus* var. *Toyoi*, CM: Kolostrum, DS: Steinfruchtkerne, PV: Hefezellwandbestandteile von *Saccharomyces cerevisiae*

³Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

⁴Ergebnisse < 0,4 negativ; 0,4 - 0,99 positiv 1; 1,0 - 1,49 positiv 2; 1,5 - 1,99 positiv 3; 2,0 - 2,49 positiv 4; 2,5 - 2,99 positiv 5

*Signifikanz bei Werten < 0,05

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22. 10. 2014

Stefanie Speiser