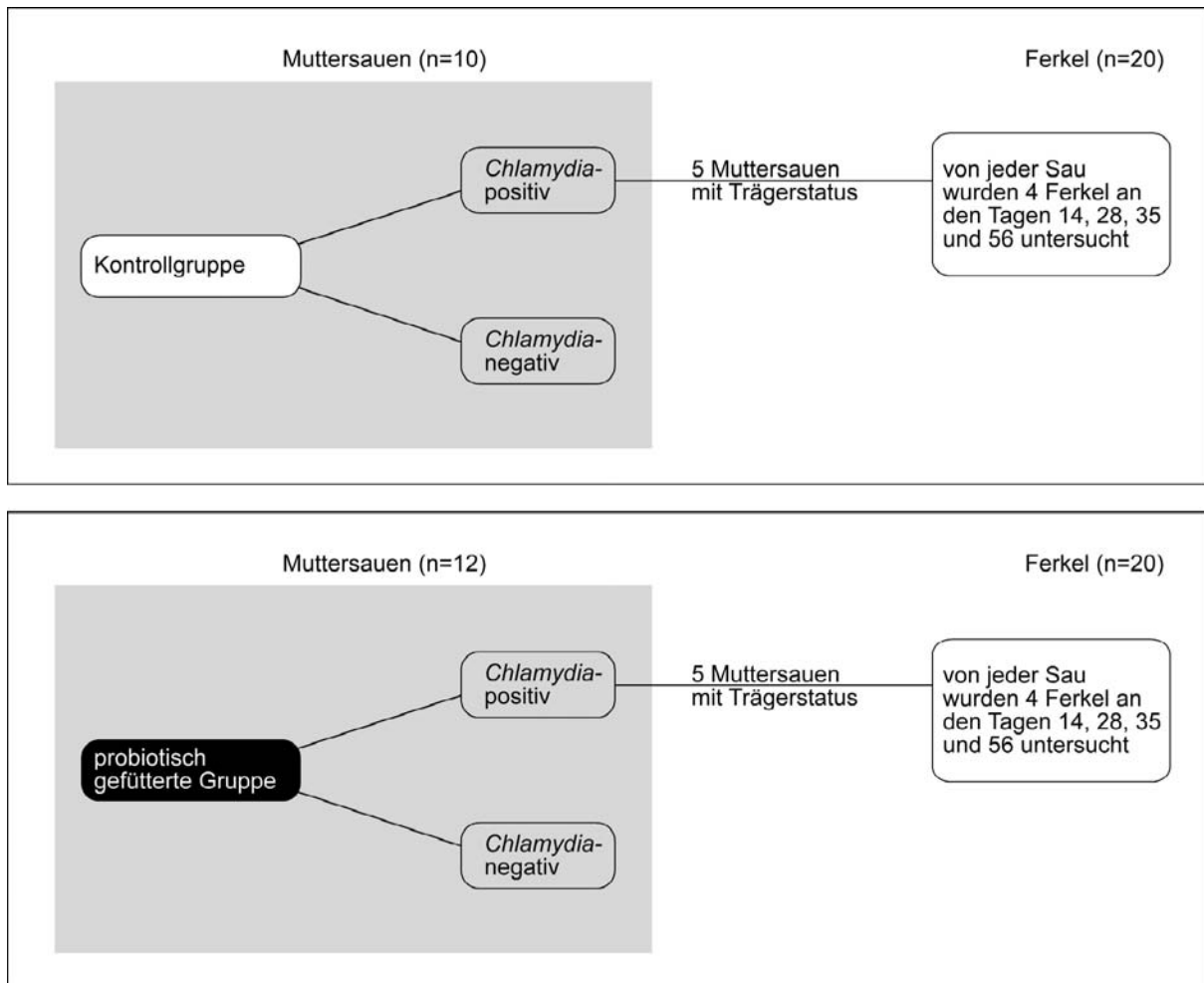


### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Versuchsplan**

Die in der Promotionsarbeit untersuchten Gewebeproben wurden im Rahmen eines Fütterungsversuches zum Nachweis der Wirkungsmechanismen von Probiotika (DFG-Forschergruppe „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“) gewonnen. Der Fütterungsversuch bestand aus einer Gruppe von Kontrollschweinen (keine Probiotika-Fütterung) sowie einer Gruppe von Probiotika-gefütterten Schweinen. Jede Gruppe bestand aus Muttersauen sowie deren Ferkel. In dieser geschlossenen Population konventionell gehaltener Muttersauen und deren Nachkommen wurde sowohl mit konventionellen als auch mit molekularen Methoden das Vorkommen von Chlamydien speziell untersucht. Als Untersuchungsorgan wurde der Darm gewählt, da diesem als Chlamydien-Habitat eine besondere Bedeutung zukommt. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Fütterung mit dem Probiotikum Cylactin® (*Enterococcus faecium* SF68, NCIMB 10415) einen Einfluss auf die Neuinfektion der Ferkel *Chlamydia*-positiv getesteter Muttersauen hat. Der Ablauf der Untersuchungen wird im folgenden Schaubild (Abb. 3) verdeutlicht.



**Abb. 3:** Darstellung der Untersuchungsgruppen

### 3.1.2. Fütterungsversuch und Untersuchungsmaterial

#### 3.1.2.1. Muttersauen

Hybrid-Muttersauen (Deutsche Landrasse x Duroc), hauptsächlich in ihrer ersten oder zweiten Gestation, wurden für den Fütterungsversuch verwendet. Nach erfolgreicher Belegung wurden die Muttersauen zufällig den beiden Fütterungsgruppen zugeordnet. 24 Tage nach erfolgreicher Belegung erhielt die Probiotika-gefütterte Gruppe mit Cylactin® (50 mg/kg Futter) supplementiertes Futter, die Kontrollgruppe die gleiche Futtermischung aber ohne die Supplementierung. Bei dem Probiotikum handelte es sich um ein *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) Präparat, das den lebenden, probiotischen Keim in einer Konzentration von  $9 \times 10^9$  KBE/g enthält. Aus drei Fäzesproben der Muttersauen, entnommen an den Terminen 90, 30 sowie 21 Tage *a.p.*, wurde die Gesamt-DNA extrahiert und mittels Spezies-

spezifischer Nested-PCR auf das Vorkommen von Chlamydien untersucht. Insgesamt wurden 22 Muttersauen auf Chlamydien untersucht. Die Muttersauen waren mit arabischen Ziffern gekennzeichnet.

### **3.1.2.2. Ferkel**

Nachdem der Chlamydienstatus der Muttersauen ermittelt war, wurden nur Ferkel von solchen Muttersauen in die weiteren Untersuchungen einbezogen, die einen positiven Chlamydien-Trägerstatus aufwiesen. Den Ferkeln der Probiotikagruppe stand ab dem 14. Lebenstag (LT) ein probiotisch supplementiertes Beifutter (Cylactin®; 100 mg/kg Futter), den Kontrollferkeln das gleiche Beifutter ohne Probiotikum *ad libitum* zur Verfügung. Im Alter von 28 Tagen wurden die Ferkel abgesetzt und je nach Gruppenzugehörigkeit auf eine probiotikahaltige/nicht supplementierte Futterration umgestellt. Zum Nachweis von Chlamydien wurde von 10 Muttersauen (5 aus jeder Fütterungsgruppe) jeweils 4 Ferkel zu den Zeitpunkten 14., 28., 35. und 56. LT zufällig ausgewählt und untersucht, insgesamt also 40 Ferkel. Die Ferkel wurden entsprechend der arabischen Ziffer der Mutter und mit römischen Ziffern, entsprechend der Wurfgröße, gekennzeichnet (z.B. Muttersau 2 mit Ferkeln 2I - 2XIII). Von jedem zu diesem Zeitpunkt euthanasierten Tier wurden Mukosaproben (ca. 1 g) aus *Ileum*, *Colon descendens* sowie Fäzes (ca. 1 g) aus dem Enddarm zur DNA-Extraktion entnommen. Außerdem wurde eine gepoolte Mukosaprobe (ca. 2 g) aus *Colon ascendens*, *Colon descendens* und eine Fäzesprobe (ca. 1 g) aus dem Enddarm für die Anzucht gesammelt. Des Weiteren wurden von jedem dieser Tiere Gewebeproben (ca. 3 x 2 cm) aus dem *Ileum*, *Colon ascendens* und *Colon descendens* entnommen und in 4% Paraformaldehyd fixiert.

### **3.1.2.3. Geräte**

Absauger	VACUBOY, neoLab, Heidelberg
Inkubatoren	WTB Binder CB 210, Binder, Tuttlingen
Kamera	AxioCam, Zeiss, Jena
DCC-Camera	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Hellfeldmikroskop	Olympus AH2, Hamburg

Histokinette	Histocentre 640CX51, Shandon, Astmoor,UK
Hybridisierungssofen	Biometra, Compact Line OV4, Göttingen
Elektrophoresekammer	Hybaid PS 250, Heidelberg
Färbeautomat	Dako Techmate, DAKO,
Fluoreszenzmikroskop	DMBL, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Kühlzentrifuge	3K30, Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode
Werkbank	LB-48-C, Lamin Air, Heraeus Instruments, Berlin
Mechanischer Zellaufschluss	BeatBeater, BioSpec, Bartlesville, USA
Mikrotom	Medim, Typ DDM 0036, Zug, Schweiz
Thermocycler	Biometra, Trio-Thermoblock, Trio Heated, Göttingen
pH-Meter	Knick Mikroprozessor pH-Meter, Berlin
Pipetten (2, 5, 10, 100, 1000 µl)	Eppendorf Reference, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Eppendorf Reference, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Roth, Karlsruhe
Vortexer	VortexMixer, neoLab, Heidelberg
Spectrophotometer	Ultrospec® 3000 pro, Amersham biotech, Freiburg
Gefrierschränke (-20 bzw. -70°C)	Privileg Öko bzw. Hera freeze, Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415D, Hamburg
Tischzentrifuge	Rotina 46R, Hettich, Tuttlingen
Transilluminator	Herlab, Molare Trenntechnik, Wiesloch
Wasserbad	GFL Karow, Berlin

### 3.1.2.4. Lösungen

#### 3.1.2.4.1. Lösungen zum Probentransport/ Anzucht

• 2SP-Transportmedium mit Ab (pH 7,2)	68,4	g	Saccharose
	2,01	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,01	g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	50	mg	Gentamycin
	10	mg	Amphotericin
	25	mg	Vancomycin
	200	ml	FKS
ad	1000	ml	Aqua bidest.

- PBS (pH 7,2-7,4)
 

	8	g	NaCl
	0,2	g	KCl
	0,2	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,26	g	Na <sub>2</sub> HPO x H <sub>2</sub> O
ad	1000	ml	Aqua bidest.
  
- Lösungen für die Giménez-Färbung
  - Fuchsinstammlösung
 

	10	g	Fuchsin
	10	g	Phenol
	100	ml	Ethanol
ad	1000	ml	Aqua bidest.
  
  - 0,1 M Phosphatpuffer
 

	2,2	g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	14,5	g	Na <sub>2</sub> HPO x H <sub>2</sub> O
ad	1000	ml	Aqua bidest.
  
  - Fuchsin-Gebrauchslösung
 

	6	ml	Stammlösung.
	10	ml	Phosphatpuffer
  
  - Malachitgrünlösung
 

	0,8	g	Malachitgrün
ad	1000	ml	Aqua bidest.

#### 3.1.2.4.2. Lösung für die DNA-Extraktion

- Lysispuffer
 

	500 mM Tris-HCl, pH 9,0
	20 mM EDTA pH 8,0
	10 mM NaCl
	20 µl ProteinaseK (20 mg/ml)

**3.1.2.4.3. Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese**

- |                        |    |      |    |                        |
|------------------------|----|------|----|------------------------|
| • 10x TBE              |    | 108  | g  | Tris-Base              |
|                        |    | 55   | g  | Borsäure               |
|                        |    | 40   | ml | 0,5M EDTA<br>(pH8,0)   |
|                        | ad | 1000 | ml | Aqua bidest.           |
| • 1x TBE               |    | 100  | ml | 10x TBE                |
|                        | ad | 1000 | ml | Aqua bidest.           |
| • Stop-Puffer          |    | 5    | ml | Glyzerin               |
|                        |    | 2    | ml | 0,5 M EDTA             |
|                        |    | 0,1  | ml | 10mM TRIS,<br>(pH 8,0) |
|                        |    | 10   | mg | Bromphenolblau         |
|                        |    | 2,9  | ml | Aqua bidest.           |
|                        | ad | 100  | ml | 1x TBE                 |
| • Agarose              |    | 1,2  | g  | Agarose                |
|                        | ad | 100  | ml | 1x TBE                 |
| • Ethidiumbromidlösung |    | 1,2  | %  |                        |

**3.1.2.4.4. Lösungen für die Immunhistochemie**

- |                                     |    |                       |    |  |
|-------------------------------------|----|-----------------------|----|--|
| • Fixierlösung für die Gewebeproben |    | 4% PFA in PBS, pH 7,2 |    |  |
| • TRIS/HCl-Puffer (pH 7,2)          |    | 0,05M Tris-HCl        |    |  |
| • PBS (pH 7,2-7,4)                  |    | 8                     | g  | NaCl                                   |
|                                     |    | 0,2                   | g  | KCl                                    |
|                                     |    | 0,2                   | g  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        |
|                                     |    | 1,26                  | g  | Na <sub>2</sub> HPO x H <sub>2</sub> O |
|                                     | ad | 1000                  | ml | Aqua bidest.                           |



- 24-well Gewebekulturplatten Corning, Schiphol, Niederlande
- Einwegpipetten (10ml) Corning, Schiphol, Niederlande
- runde Glasdeckgläser (Ø 12mm) Roth, Karlsruhe
- Methanol Roth, Karlsruhe

#### 3.1.2.5.2. PCR

- 100 bp Marker Life Technologies, Eggenstein
- *Taq*-DNA-Polymerase Life Technologies, Eggenstein
- 10x PCR-Puffer Life Technologies, Eggenstein
- MgCl Life Technologies, Eggenstein
- Ultrareines Wasser Millipore GmbH, Schwalbach
- dNTP Promega, Mannheim

#### 3.1.2.5.3. Immunhistochemie

- Superfrost<sup>+</sup> Objektträger Menzel-Gläser, Roth, Karlsruhe
- Ak-Verdünnungspuffer DAKO, Hamburg
- Peroxidase Blocking Solution DAKO, Hamburg
- Pronase Sigma-Aldrich, Deiseshofen
- Monoklonaler Ak (Chlamydien) Progen, Heidelberg
- Hämalun nach Meyer Merck, Darmstadt
- MediMount Medite, Nunningen
- AxioVision 3.0.6.  
Histologisches Messprogramm Zeiss, Jena

#### 3.1.2.5.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen

- Technovit 8100 Heraeus Kultzer, Wehrheim/Ts
- Superfrost<sup>+</sup> Objektträger Menzel-Gläser, Roth, Karlsruhe
- Oligonukleotidsonden MWG, Ebersberg
- DAPI Sigma-Aldrich, Deiseshofen
- Antifadinglösung Vectashild Vector Laboratories, Burlingame, UK



**3.1.2.5.5. Verwendete Kits**

- QIAmp DNA Stool Kit                      Quiagen, Hilden
- QIAamp DNA Mini Kit                      Quiagen, Hilden
- ChemMate Detection Kit ACE              DAKO, Hamburg
- High Pure PCR  
  Product Purification Kit                  Roche Diagnostics, Mannheim

**3.1.2.6. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Sonden und -Primer sowie verwendete Referenzstämme****3.1.2.6.1. Sequenzen der Oligonukleotid-Primer**

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5'-3')
191CHOMP	GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC
CHOMP371	TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC
201CHOMP	GGI GCW GMI TTC CAA TAY GCI CAR TC
CHOMP336s	CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT
218PSITT	GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG
TRACH269	ACC ATT TAA CTC CAA TGT ARG GAG TG
204PECOR	CCA ATA YGC ACA ATC KAA ACC TCG C
S45241	ATC TTT AGT CCC TGT AGC AGC AGT

Degenerierte Nukleotide: K= G oder T; M= A oder C; R= A oder T; Y= C oder T; I= Inosine.

### 3.1.2.6.2. Sequenzen der Oligonukleotidsonden

Sonde	Zielgruppe	DNA-Sequenz (5`-3`)
Chls-0523	<i>Chlamydiales</i>	CCT CCG TAT TAC CGC AGC
Chlae-0574	<i>Chlamydiaceae</i>	CTT TCC GCC TAC ACG CCC
Chla-0232	<i>Chlamydia</i>	TAG CTG ATA TCA CAT AGA
Chlph-0583	<i>Chlamydomphila</i>	CTA ACT TTC CTT TCC GCC
Ct-0623	<i>C. trachomatis</i> (human)	ATT AGA TGC CGA CTC GGG
EUB338	<i>Eubacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT

### 3.1.2.6.3. Referenzstämme

*Chlamydia suis* S45, *Chlamydomphila psittaci* (aviäres Isolat), *Chlamydomphila abortus* B577, *Chlamydomphila pecorum* LW 613

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Entnahme und Transport des Probenmaterials

Die Fäzesproben der Muttersauen werden behandschuht aus dem Enddarm entnommen und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung mit Hilfe des QIAmp DNA Stool Kit gekühlt transportiert und gelagert. Die Ferkel werden in Narkose gelegt, die Bauchhöhle laparoskopisch eröffnet und nachdem die einzelnen Darmabschnitte identifiziert und abgebunden sind euthanasiert. Danach werden die einzelnen Darmabschnitte entnommen. Die gepoolte Mukosaprobe aus *Colon ascendens* und *Colon descendens* wie auch die Fäzesprobe zur Anzucht werden umgehend in ein Gefäß mit Transportmedium überführt und auf Eis transportiert. Die Proben werden anschließend weiterverarbeitet und innerhalb von 24h auf vorbereitete Monolayer der Wirtszellen inokuliert. Die Mukosaprobe von *Ileum*, *Colon descendens* und die Fäzesprobe sowie die Gewebeprobe von *Ileum*, *Colon ascendens* und *Colon descendens* werden bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert und transportiert. Die DNA-Extraktion unter Verwendung von kommerziellen Kits (QIAmp DNA Stool Kit, QIAamp DNA Mini Kit) erfolgt am gleichen Tag, ebenso die Fixierung der Gewebeprobe mit 4% PFA. Die fixierten Gewebeprobe werden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Von der

gewonnenen DNA wird ein Aliquot bei 4°C gelagert und wird als Reserve ein Aliquot bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.2. Anzucht**

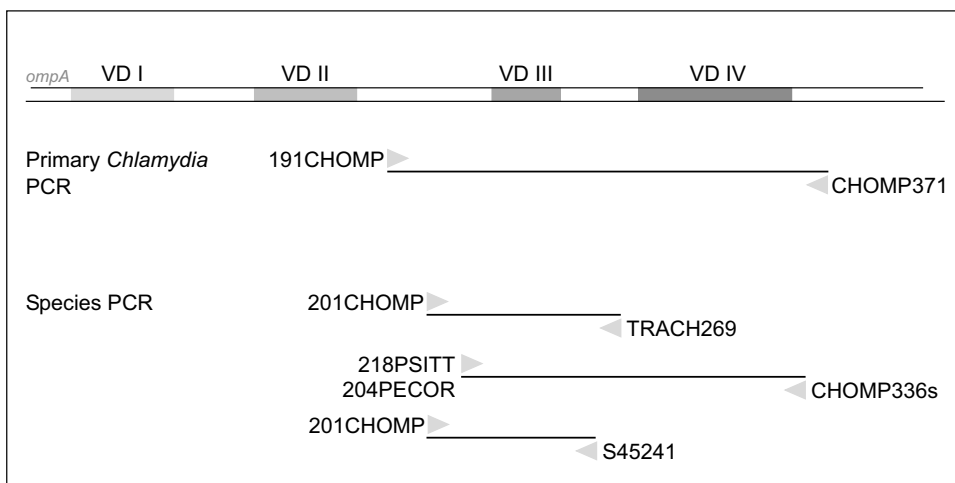
Zur Kultivierung der Chlamydien dienten Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) Zellen, eine permanente Zelllinie, die aus Nierenepithel einer grünen Meerkatze gewonnen wurde. Die Zellen wurden 48h vor Inokulation in einer Zelldichte von ca. 250.000 Zellen/ml in 24-Napf Gewebekulturplatten ausgesät. In jeden Napf dieser Gewebekulturplatten wurde ein Glasdeckglas eingelegt und mit einem ml Zellsuspension befüllt, so dass nach 48 h ein vollständiger Monolayer ausgebildet war.

Der Zellaufschluss des Mukosagewebes und der Fäzes erfolgte mit Glaskügelchen (Ø 1mm) in einem BeatBeater. Dazu wurde das Material in das Gerät verbracht und auf Eis zwei min hochtourig mit den Kügelchen vermischt. Der Überstand wurde gefiltert und durch niedertourige Zentrifugation (10 min, 500 x g, bei 4°C) von den Zelltrümmern befreit. Eine weitere Aufreinigung erfolgte mittels 20-minütiger Zentrifugation (2000 x g, 4°C). Zur Sedimentation der Elementarkörperchen (EB) wurde der so vorbehandelte Überstand für 45 min, 30000 x g bei 4°C einer Zentrifugation unterzogen, der Überstand verworfen und das Sediment in 2 ml EMEM mit Antibiotikum (Ab) resuspendiert. Die so aufgearbeitete Probe diente dann als Inokulum. Jede Probe wurde sechsfach angelegt. Zur Inokulation wurden 0,2 ml der aufgearbeiteten Probe in einen Napf der Gewebekulturplatte überführt und für 30 min, 2500 x g, bei 37°C zentrifugiert. Danach wurde die Platte noch für weitere 2 h im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> bebrütet, dann das Probenmaterial abgesaut, einmal mit PBS gespült und schließlich mit 2 ml Erhaltungsmedium je Napf aufgefüllt. Erstmals nach drei und dann nach fünf Tagen wurden je zwei Deckgläser mittels Methanol (10 min) fixiert und mit der Färbung nach Giménez auf das Vorhandensein von typischen Chlamydieninklusionen untersucht. Nach der Fixierung wurden die Zellen einmal mit Aqua bidest. gewaschen und dann für acht min mit der Fuchsin-Gebrauchslösung gefärbt. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua bidest. erfolgte für eine min die Gegenfärbung mit Malachitgrün. Nach dreimaligem Waschen und anschließender Trocknung wurde das Deckglas eingebettet, und die mit dieser Methode gefärbten Deckgläser anschließend sorgfältig mäanderförmig durchgemustert. Von den verbleibenden beiden Näpfen wurde durch Einfrieren und Wiederauftauen die Zellen zerstört und die erhaltene Flüssigkeit zur nächsten Passage eingesetzt. Sobald in den gefärbten

Deckgläsern Chlamydien sichtbar waren wurde ein Aliquot bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach insgesamt 5 Passagen wurden die Proben abschließend als Chlamydien-positiv oder Chlamydien-negativ beurteilt.

### 3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis der Chlamydien in den o. g. Proben wurde eine gattungsspezifische sowie speziesspezifische Nested-PCR eingesetzt. Diese PCR wurde mit einem modifizierten Protokoll (Sachse und Hotzel, 2003) durchgeführt. Zielgen ist das *ompA*-Gen. Das Prinzip und die Oligonukleotid-Primerkombinationen dieser Nested-PCR sind im folgenden Schaubild (Abb. 4) schematisch dargestellt.



**Abb 4:** Schematische Darstellung der Nested-PCR zur Detektion und Differenzierung der Chlamydien anhand des *ompA*-Gens. Das äußere Primerpaar 191CHOMP und CHOMP371 dient der gattungsspezifischen Amplifizierung. Im zweiten Schritt der Nested-PCR wird ein gattungsspezifischer Primer (201CHOMP oder CHOMP336s) und ein speziesspezifischer Primer verwendet. Beim Nachweis von *Chlamydophila psittaci* handelt es sich um den Primer 218PSITT, bei *Chlamydophila pecorum* um 204PECOR. Zur Differenzierung von *Chlamydia suis* stehen der Primer TRACH269, und S45241 zur Verfügung.

Die DNA aus Fäzesproben der Muttersauen und Ferkel wurden mit dem QIAamp DNA Stool Kit und die DNA aus den Mukosaproben des *Ileum* und *Colon descendens* mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert. Die DNA der Kontrollstämme wurde durch ProteinaseK-Verdau

freigesetzt. Hierzu wurden 2 ml infiziertes Zellkulturmaterial für 45 min bei 30.000 x g zentrifugiert, anschließend das erhaltene Sediment mit 150 µl Lysispuffer versetzt und für 2 h bei 60°C inkubiert.

Der Mastermix für den ersten Schritt der Nested-PCR setzt sich wie folgt zusammen:

H <sub>2</sub> O	37,75 µl
Reaktionspuffer	5 µl
MgCl	1 µl
dNTP	1 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
DNA-Template	3 µl

Das Temperatur-Zeit-Profil beim 1. Schritt war wie folgt:

Schritt 1: Denaturierung 94° C, 5 min; Schritt 2: Denaturierung 94° C, 30 sec; Schritt 3: Annealing: 50° C, 30 sec; Schritt 4: Polymerisation 72° C, 30 sec; Schritt 5: Extension 72° C, 5 min, Schritt 6: Pause 4° C, ~.

Nach 35 Zyklen schlossen sich zur Differenzierung die speziesspezifischen PCR Schritte an. Hierzu wurden 1 µl des ersten Schritts als Template für den zweiten Schritt der Nested-PCR eingesetzt.

H <sub>2</sub> O	39,75 µl
Reaktionspuffer	5 µl
MgCl	1 µl
dNTP	1 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
Taq-Polymerase	0,25 µl
DNA-Template	1 µl

Das Temperatur-Zeit-Profil der durchgeführten Speziesspezifischen PCR-Reaktion war wie folgt:

Schritt 1: Denaturierung 94° C, 5 min; Schritt 2: Denaturierung 94° C, 30 sec; Schritt 3: Annealing 60° C, 30 sec; Schritt 4: Polymerisation 72° C, 30 sec; Schritt 5: Extension 72° C, 5 min; Schritt 6: Pause 4° C, ~.

Bei den zweiten Schritten der Nested-PCR wurden 20 Zyklen durchlaufen. Insgesamt wurden mit der DNA einer jeden Probe 4 PCR-Reaktionen ausgeführt. Im Fall eines Amplifikates mit der Oligonukleotid-Primerkombination 201CHOMP und TRACH269 wurde eine weitere Reaktion mit dem Differenzierungsprimer S45241 durchgeführt. Der Primer TRACH269 soll an das humane als auch animale *Chlamydia trachomatis/Chlamydia suis ompA*-Gen binden und mit dem Primer S45241 soll nur *Chlamydia suis* detektiert werden. Diese Spezies wurde im Rahmen der taxonomischen Neuordnung von *Chlamydia trachomatis* abgespalten.

Zur Visualisierung der vorhandenen PCR-Produkte wurde die Agarose-Gelelektrophorese (1,3% Agarose, 1,3 µl einer 1%-Ethidiumbromidlösung) eingesetzt. Je Probe wurden 3 µl Stopp-Puffer mit 7 µl PCR-Produkt vermischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-Marker mit aufgetragen. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine Spannung von 120 V für 90 min angelegt. Im Anschluss wurde das Gel in einem Transilluminator überprüft.

Um eine höchstmögliche Spezifität der PCR zu erhalten, wurden die einzelnen PCR-Schritte in verschiedenen Arbeitsbereichen und ausschließlich mit gestopften Pipettenspitzen ausgeführt. Weiterhin wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese ebenfalls die Negativkontrolle (Mastermix ohne DNA Template) des ersten und zweiten PCR-Schritts mit aufgetragen, um falsch positive Ergebnisse, die aus Verunreinigungen resultieren können, zu minimieren.

Dieses PCR-Protokoll wurde mit den Fäzesproben aller untersuchten 27 Muttersauen (81 Proben) und den Proben der 40 Ferkel (120 Proben) durchgeführt.

Zur Absicherung der Speziesdiagnose wurden von 5 Proben der Kolonmukosa verschiedener Ferkel zusätzlich eine 16S „signature sequence“-PCR mit den Primern 16SIGF (5'-CGGCGTGGATGAGGCAT-3') und 16SIGR (5'-TCAGTCCCAGTGTTGGC-3') unter Standardbedingungen durchgeführt (Everett *et al.*, 1999).

Von den mittels Anzucht gewonnenen Isolaten wurde zur näheren Charakterisierung das 16S rRNA-Gen mit den Primern 16SF (5'-GCGTGGATGAGGCATGCAA-3') und 16SR (5'-GGAGGTGATCCAGCCCCA-3') und das *ompA*-Gen mit den Primern CTU (5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG-3') and TGLY (5'-GGCTACAGCTCTACCAT TGA-3') unter Standardbedingungen amplifiziert (Everett, 2000; Bush und Everett, 2001).

### 3.2.4. Immunhistochemie

Das fixierte Gewebe von *Colon ascendens* und *Colon descendens* von je 12 Tieren aus der Probiotika-gefütterten Gruppe und der Kontrollgruppe wurde zufällig ausgewählt und mit Hilfe der Histokinette in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und anschließend mit einer absteigenden Xylol-Reihe (100%, 90% und 70%) entparaffiniert sowie in H<sub>2</sub>O rehydriert. Zur besseren Penetration des Ak wurden die Schnitte 5 min mit einer 0,05% Pronaselösung vorbehandelt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte in einem Färbevollautomaten unter Verwendung des ChemMate Detektion Kit AEC Rabbit/Mouse, der den monoklonalen, gattungsspezifischen und gegen das Lipopolysaccharid gerichteten Chlamydien-Ak (Progen, Heidelberg) im Fall einer Bindung mit einer pupurfarbenen Farbreaktion nachweist. Der primäre Ak wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Es wurden mit jedem Schnitt eine Positivkontrolle (Darmgewebe aus Infektionsversuch mit Chlamydien) und eine Negativkontrolle (kein primärer Ak) mitgeführt. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer und die Einbettung in ein wasserlösliches Medium (MediMount, Nunningen). Die mikroskopische Beurteilung erfolgte im Hellfeldmikroskop mit dem 100er Objektiv. Um eine semiquantitative Auswertung des Ausmaßes der Infektion durchführen zu können, wurde die Strecke *Lamina muscularis mucosae* über der intakten Schleimhaut vermessen (AxioVision, Zeiss) und die infizierten Enterozyten auf dieser Strecke gezählt. Damit ein Vergleich unter den Tieren erfolgen konnte, wurde der Mittelwert der infizierten Enterozyten pro mm errechnet.

### 3.2.5. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Nachdem die Gewebeproben in 4% PFA fixiert und gelagert wurden erfolgte die Einbettung in Kunststoff unter Verwendung von Technovit 8100 (Heraeus Kultzer). Von den Gewebeproben, die auch mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht wurden, wurden Gewebestücke (12 Tiere aus jeder Gruppe) von *Ileum*, *Colon ascendens* und *Colon descendens* unmittelbar hintereinander liegend eingebettet. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Skalpell in ca. 0,3 x 0,3 cm geschnitten und über Nacht in PBS mit 6,8% Saccharose gewaschen. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in 100%igem Azeton. Während der ersten Minuten wurde das Azeton so häufig gewechselt, bis keine Trübung des Azetons mehr

sichtbar war. Die Infiltration des Gewebes mit einer Mischung aus Technovit 8100 plus Härter I erfolgte für 6 - 10 Stunden bei 4° C und im Anschluss hieran wurde das Darmgewebe entsprechend der Schneiderichtung in die Einbettungsform (Histoform S, Heraeus Kultzer) orientiert. Die Aushärtung des Kunststoffes erfolgte durch Zugabe der Infiltrationslösung plus Härter II bei 4°C. Schließlich wurden die eingebetteten Darmgewebestücke auf Histoblöcke geklebt und aus der Einbettungsform entfernt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Es wurden 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und auf positiv geladene Objektträger aufgezogen.

Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden die unter „Material“ aufgeführten Oligonukleotidsonden kommerziell hergestellt (MWG, Ebersberg). Es wurden die Sonden Chls-0523, Chlae-0574, Chla-0232, Chlph-0583, Ct-0623 und EUB338 mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoreszein oder Cy3 am 5`Ende markiert synthetisiert. Von jedem Tier wurden 4 Schnitte mit folgenden Sondenkombinationen und Formamidkonzentrationen hybridisiert (Tab. 2):

Oligonukleotidsonden-Kombination	Formamidkonzentration
Chls-0523 und Chlae-0574	20%
Chla-0232 und Chlph-0583	25%
Chls-0523 und Ct-0623	25%
Chlae-0574 und EUB338	20%

**Tab. 2:** Kombination der verwendeten Oligonukleotid-Sonden sowie die verwendeten Formamidkonzentration

Für jeden Schnitt wurde ein Gesamtvolumen an Hybridisierungspuffer von 40 µl zur Hybridisierung der drei Darmabschnitte verwendet. Diesem Hybridisierungspuffer wurde die jeweilige Sonde in einer Konzentration von 200 ng zugesetzt. Die mit Hybridisierungslösung beschichteten Objektträger wurden für vier Stunden bei 46°C in einer feuchten Kammer inkubiert, im Anschluss für 10 min mit vorgewärmtem Waschpuffer bei 48°C gewaschen und schließlich mit kaltem Aqua bidest. abgespült. Zur Kontrolle wurde jeder Schnitt mit DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole), einem DNA-Farbstoff, für 2 min in einer Konzentration von



1µg/ml gefärbt. Nach Trocknung des Präparates erfolgte die Einbettung mit einem Antibleichmittel.

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit einem DMBL-Epifluoreszenz-Mikroskop (Leica Bensheim). Dieses Epifluoreszenz-Mikroskop war mit den Fluoreszenzfilterblöcken L5 und Y3 ausgestattet. Bilder wurden mit einer dazu gehörenden digitalen Kamera angefertigt und als Datei digital gespeichert.

### **3.2.6 DNA-Sequenzanalyse**

Zur Überprüfung der Spezifität und der Speziesdifferenzierung der PCR wurden von fünf Kolonmukosaproben der randomisiert ausgewählten Ferkel die PCR-Produkte des ersten Schrittes der Nested-PCR mit Hilfe des High Pure PCR-Product Purification Kit, Roche Diagnostics aufgereinigt. Die DNA in dem gewonnenen Eluat wurde fluorometrisch gemessen und auf 100 ng/µl eingestellt. Dieses Fragment wurde kommerziell sequenzanalysiert (AGOWA, Berlin). Die von denselben Kolonmukosaproben erhaltenen Amplifikate der 16S „signature sequence“-PCR wurden ebenfalls aufgereinigt und sequenzanalysiert. Aus den durch Anzucht gewonnenen Isolaten wurde das *ompA*- und das 16S-rRNA-Gen amplifiziert und sequenzanalysiert. Der Abgleich der erhaltenen Nukleotidsequenzen erfolgte mittels BLAST-Programm (NCBI).

Die Dendrogramme wurde mit Hilfe des Programms MEGA erstellt.

### **3.2.7. Statistik**

Die statistische Analyse der Nachweisrate der Chlamydieninfektion im Vergleich der beiden Fütterungsgruppen erfolgte mit dem  $\chi^2$  Test (Likelihood-Quotient) unter zu Hilfenahme des Programms SPSS 12.0 für Windows. Es wurden p-Werte, die kleiner oder gleich 0,05 waren, als statistisch signifikant bewertet. Zur semiquantitativen Auswertung der Immunhistologie wurde der arithmetische Mittelwert infitierter Zellen pro mm *Lamina muscularis mucosae* errechnet. Die Altersgruppen der jeweiligen Fütterungsgruppe wurden mittels Pivot-Tabelle vergleichend dargestellt. Die grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit SigmaPlot 8.0.