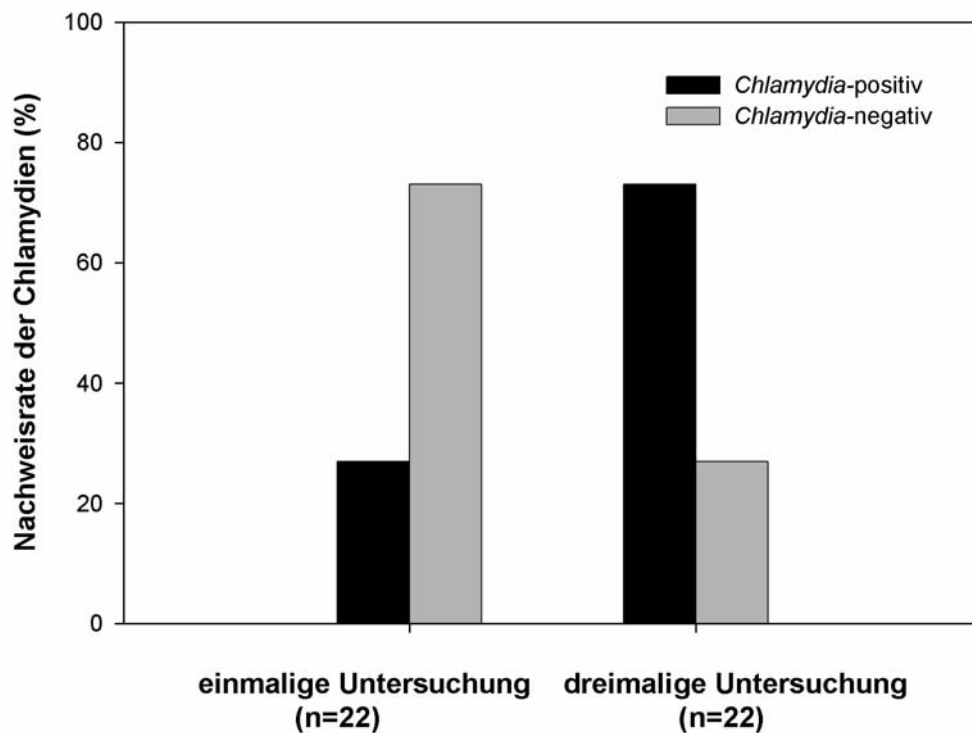


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung des *Chlamydia*-Status der Muttersauen in beiden Fütterungsgruppen

Zum Nachweis einer etwaigen latenten Chlamydieninfektion der Muttersauen wurde DNA aus Fäzesproben extrahiert. Von jeder der zu Versuchsbeginn gehaltenen 22 Muttersauen wurde an drei Terminen *ante partum* (*a.p.*) (90, 31, und 21 Tage *a.p.*) Kot aus dem Enddarm entnommen und mit der Genus- und Spezies-spezifischen PCR auf Chlamydien untersucht. Als Zielgen diente *ompA*. Die Nachweisrate des Erregers variierte von 27% (6/22) bei der einmaligen Beprobung bis hin zu 73% (16/22) bei dreimaliger Untersuchung der einzelnen Sauen (Abb. 5).



**Abb. 5:** Genotypischer Nachweis von Chlamydien in Fäzesproben der Muttersauen. Nach einer einmaligen Untersuchung der Tiere konnten bei 27% (6/22) der Tiere Chlamydien nachgewiesen werden, wohingegen bei dreimaliger Untersuchung 73% (16/22) der Tiere als Chlamydienträger identifiziert wurden.

Bei jeder der 17 mit Hilfe der PCR als *Chlamydia*-Träger erkannten Muttersauen konnte ein Amplifikat mit der Primer-Kombination 201CHOMP und TRACH269 generiert werden. Hingegen konnte nur bei 6 Tieren unter Verwendung des Differenzierungs-Primers S45241 ein Produkt erzeugt werden. Diese Weiterdifferenzierung schlug mit hoher Wahrscheinlichkeit fehl, weil der reverse Primer S45241 am 3`Ende das Basentriplett ACT aufweist, welches in der aus den Fäzes gewonnenen *ompA*-DNA durch die Insertion anderer Basentriplets ersetzt wurde. Dieser Sachverhalt ist in der folgenden Abbildung exemplarisch dargestellt.

Sequenzabschnitt	
<i>C. suis</i> S45	.....ACT GCT GCT ACA GGG ACT AAA GAT....
Oligonukleotid S45241	ACT GCT GCT ACA GGG ACT AAA GAT
Sequenzierungsprodukt	.....GAC GCT GCT ACA GGG ACT AAA GAT.....

**Abb 6:** Dargestellt ist ein Vergleich von drei Teilsequenzen des *ompA*: In der oberen Zeile ist die entsprechende Sequenz des Referenzstammes *C. suis* S 45 abgebildet (Acc.-Nr.: U73110), darunter findet sich die Sequenz des Oligonukleotids S45241. In der untersten Zeile ist eine DNA-Sequenz (Acc.-Nr.: AY687635) dargestellt, die im ersten Schritt der Nested-PCR generiert wurde. Es wird deutlich, dass im Gegensatz zu dem Primer S45241 und dem Referenzstamm der sequenz-analytierte Genbereich eine Mutation aufweist. Aufgrund dieser Insertion eines anderen Basentriplets kann der Primer am 3`Ende nicht anlagern. Daher findet keine PCR-Amplifizierung statt.

## 4.2. Nachweis von Chlamydien bei Ferkeln, deren Muttersauen einen positiven Chlamydien-Trägerstatus aufwiesen

### 4.2.1. Chlamydien-Kultivierung

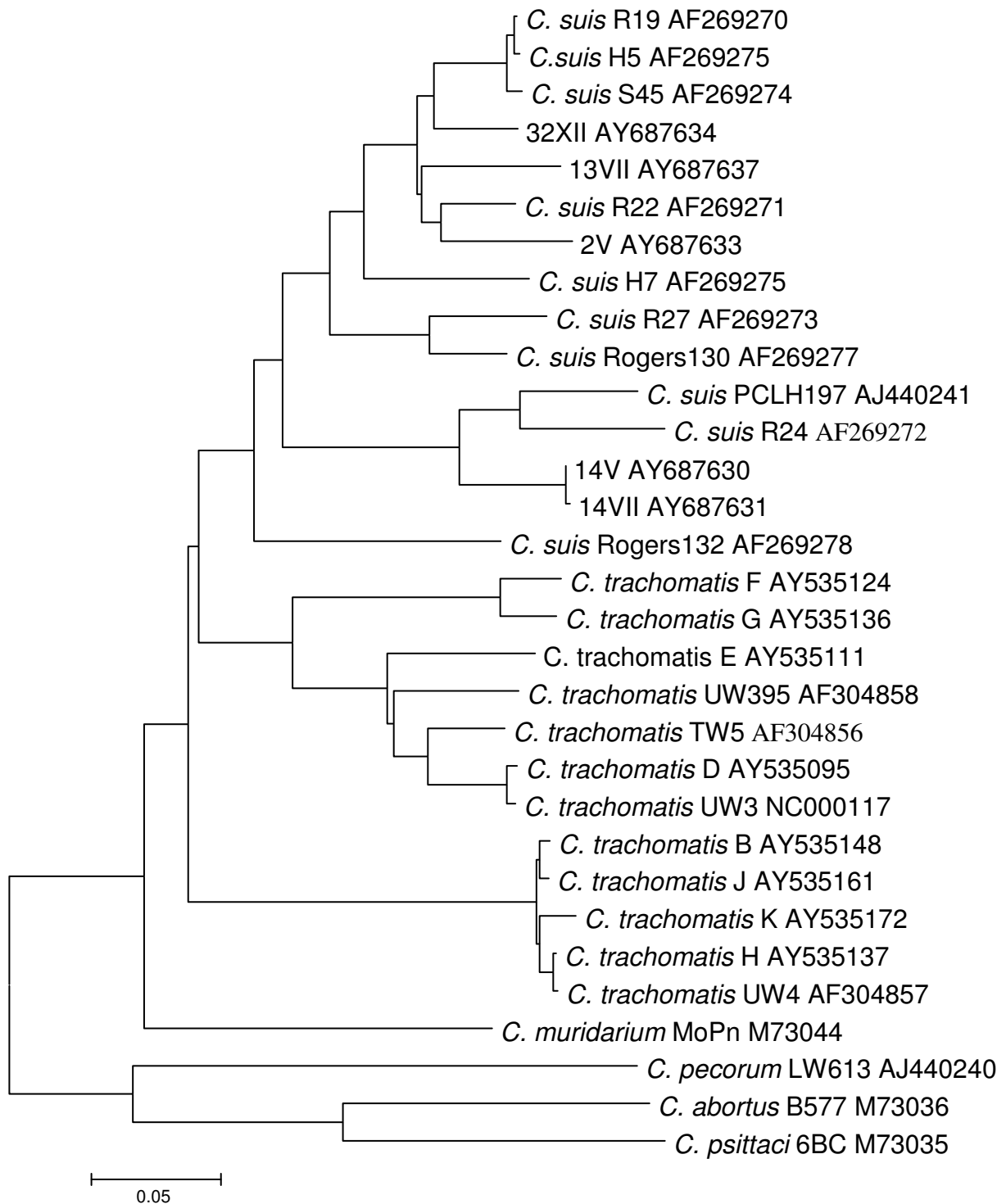
Es wurden die Nachkommen von jeweils fünf Muttersauen mit Chlamydieträgerstatus aus der Probiotika-gefütterten Gruppe (20 Ferkel) und aus der Kontrollgruppe (20 Ferkel) untersucht. Zur Anzucht von Chlamydien wurden von diesen 40 Ferkeln aufgearbeitete, gepoolte Kolonmukosaprobe (*Colon ascendens* und *Colon descendens*) und aufgearbeitete Kotproben auf BGM-Monolayer inokuliert. Von drei Tieren mussten sowohl die Kolonmukosaprobe als auch die Kotprobe wegen bakterieller Verunreinigungen von der Beurteilung ausgeschlossen

werden, so dass insgesamt 74 Proben von 37 Ferkeln in die Auswertung einfließen. Bei fünf Tieren gelang der Nachweis von Chlamydien in der Zellkultur. Bei fünf Mukosaproben (2V, 13VII, 14V, 14VII und 32XII; Kodierung im Material und Methoden-Teil erläutert) waren die Chlamydien in der zweiten Passage sichtbar, bei drei dieser Tiere waren die Chlamydien auch in den Fäzesproben (13VII, 14V, 14VII) nachweisbar. Im Laufe der weiteren Passagierung gelang es nicht, diese Primärisolate als Chlamydienstämme zu etablieren.

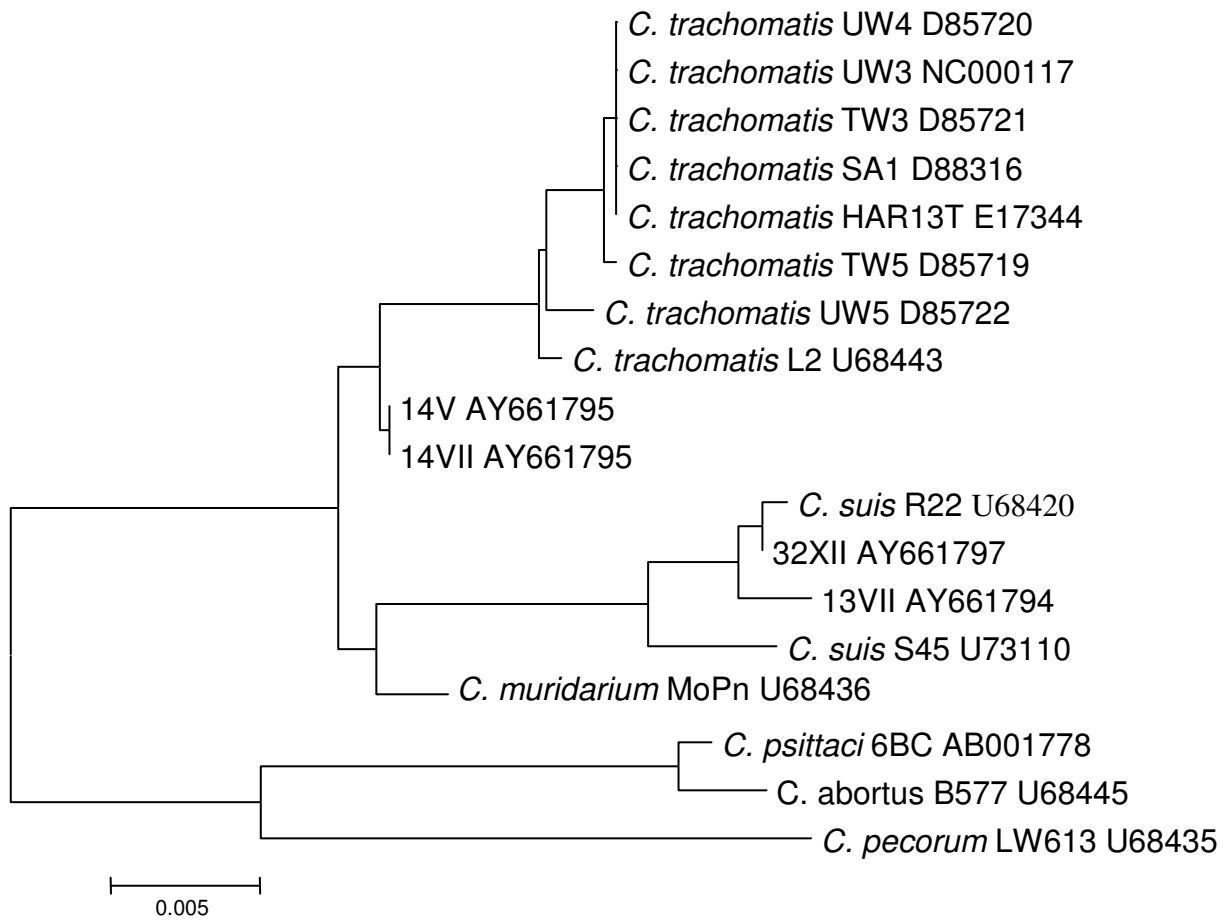
#### **4.2.1.1. Charakterisierung der Primärisolate anhand des 16S-RNA- und des *ompA*-Gens**

Um die angezüchteten Isolate näher zu charakterisieren und phylogenetisch einordnen zu können, wurde aus dem Überstand der infizierten Zellkultur DNA mittels ProteinaseK-Verdau gewonnen. Aus dieser DNA wurde das *ompA*-Gen als auch das 16S-RNA-Gen amplifiziert, aufgereinigt und Sequenz-analysiert. Beim Sequenz-Abgleich mit dem BLAST-Programm (NCBI) der erhaltenen Sequenzen gegen die Datenbank (EMBL) ergab sich für das *ompA*-Gen eine Sequenz-Identität von 92%-94% zu *Chlamydia suis* S45 und für das 16S-RNA-Gen eine Übereinstimmung von 99% zu *Chlamydia suis* R22. Ein Alignment (MegAlign, DNASTar) der beiden Gene der Proben 14V und 14VII untereinander ergab eine 100% Identität der Sequenz der jeweiligen Gene. Bei der aus der Probe des Tieres 2V gewonnenen DNA konnte nur zum Teil die Sequenz des 16S RNA-Gens, vermutlich wegen Ausbildung von Sekundärstrukturen, analysiert werden. Die Sequenzen wurden bei der EMBL Nukleotidsequenz-Datenbank hinterlegt (AY661794 bis AY661798 für das 16S rRNA Gen und AY687638 bis AY68763 für das *ompA* Gene).

Mit den erhaltenen Sequenzen beider Gene wurden zur phylogenetischen Einordnung zwei Dendrogramme erstellt (Abb. 7 und 8).



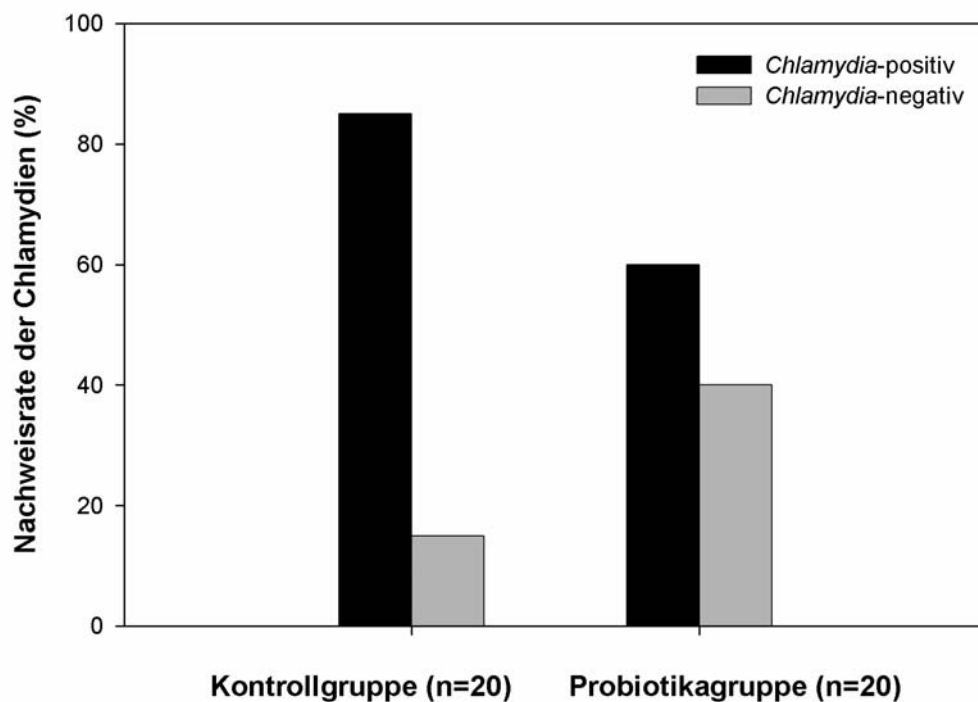
**Abb. 7:** Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der kultivierten Isolate an Hand des *ompA*-Gens innerhalb der *Chlamydiaceae*. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit dem ClustralW Algorithmus und der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbour Joining Methode erstellt.



**Abb. 8:** Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der kultivierten Isolate an Hand des 16S-RNA-Gens innerhalb der *Chlamydiaceae*. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit dem ClustralW Algorithmus und der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbour Joining Methode erstellt.

#### 4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

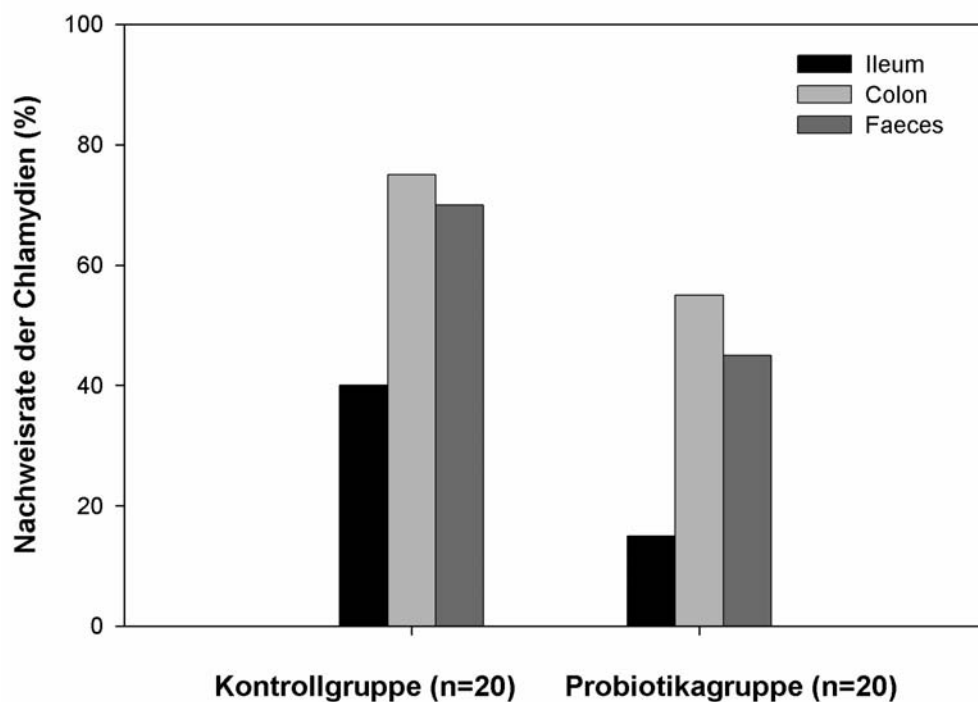
Extrahierte DNA aus dem *Ileum*, dem *Colon descendens* und der Fäzes wurde von jedem der 40 Ferkel mit der auch bei den Muttersauen angewandten Nested-PCR auf Chlamydien überprüft. Von den insgesamt 40 untersuchten Ferkeln konnte bei 29 (73%) eine Chlamydieninfektion des Darmtraktes nachgewiesen werden. Die Lokalisation der Chlamydien in den untersuchten Darmabschnitten ergab, dass bei 11 (28%) Tieren der Erreger in den Proben der Ileummukosa, bei 26 (65%) in den Proben der Kolonmukosa und bei 23 (58%) in den Fäzesproben nachgewiesen wurde. Betrachtet man die beiden unterschiedlichen Fütterungsgruppen, so ergibt sich, dass in der Kontrollgruppe 17/20 (85%) im Gegensatz zu der Probiotikagruppe bei 12/20 (60%) der Tiere eine Chlamydieninfektion des Darms nachgewiesen wurde ( $p=0,073$ ) (Abb. 9).



**Abb. 9:** Nachweisrate von Chlamydieninfektion im Darm der untersuchten Ferkel in den beiden Fütterungsgruppen. In der Kontrollgruppe sind 17/20 (85%) der Tiere *Chlamydia*-positiv im Gegensatz zu der Probiotikagruppe, in der 12/20 (60%) der Tiere als *Chlamydia*-positiv diagnostiziert wurden ( $p=0,073$ ).

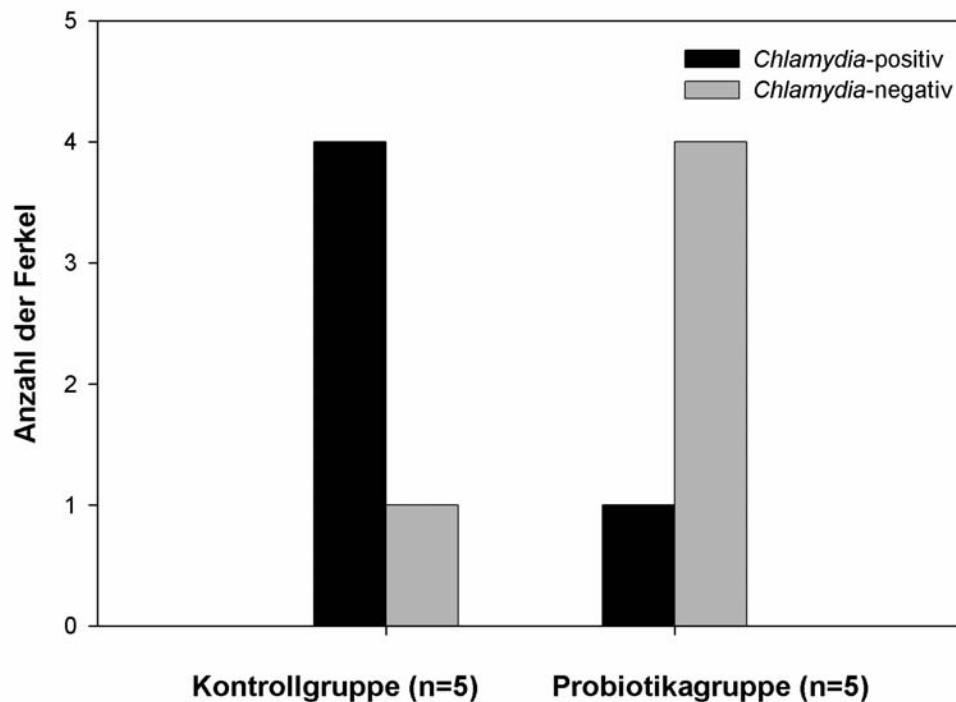
Es zeigte sich bei den von jedem Tier untersuchten Proben (Ileummukosa, Kolonmukosa und Fäzes), dass in der Kontrollgruppe im Gegensatz zu der Probiotikagruppe häufiger in allen drei Proben Chlamydien nachweisbar waren (Abb. 10). Die deutlichste Reduktion der Nachweisrate der Chlamydien im Vergleich der beiden Gruppen war in den

Ileummukosaproben zu sehen. So waren bei dieser Probe in der Probiotikagruppe 3/20 (15%) Tiere im Vergleich zu 8/20 (40%) Tiere der Kontrollgruppe als *Chlamydia*-positiv zu bewerten. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich auch eine deutliche Reduktion des Chlamydiennachweises von 20% (positive Tiere: Kontrollgruppe 15/20; Probiotikagruppe 11/20) bei den Proben der Kolonmukosa und von 25% (positive Tiere: Kontrollgruppe 14/20; Probiotikagruppe 9/20) bei den Fäzesproben.



**Abb. 10:** Chlamydieninfektionen der beiden Fütterungsgruppen in den Proben aus Ileummukosa, Kolonmukosa und Fäzes. In den Ileumproben der Kontrollgruppe wurden bei 8/20 (40%) und in den Proben der Probiotikagruppe bei 3/20 (15%) der Tiere Chlamydien nachgewiesen. Bei der Kolonprobe zeigt sich eine Verteilung von 15/20 (75%) in der Kontrollgruppe zu 11/20 (55%) in der Probiotikagruppe. Bei der Fäzesprobe stehen 14/20 (70%) positive Proben der Kontrollgruppe den 9/20 (45%) der Probiotikagruppe gegenüber (Ileum  $p = 0.073$ ; Colon  $p = 0.103$ ; Fäzes  $p = 0.326$ )

Einen signifikanten Unterschied sieht man in der Altersgruppe der 14 Tage alten Ferkel. In der Kontrollgruppe waren in dieser Altersgruppe bereits 4/5 Tiere mit Chlamydien infiziert, wohingegen in der Probiotikagruppe bei nur 1/5 Tieren der Erregernachweis gelang (Abb. 11).



**Abb. 11:** Darstellung der Verteilung *Chlamydia*-positiv und *Chlamydia*-negativ getesteter Tiere in der Gruppe der 14 Tage alten Tiere. In der Kontrollgruppe können bereits bei 4/5 Tieren Chlamydien im Darm nachgewiesen werden, wohingegen bei den Tieren der Probiotikagruppe nur bei 1/5 Tieren der Erreger nachgewiesen wurde ( $p=0,05$ ).

Wie auch bei den Muttersauen gelang der Chlamydiennachweis beim 2. Schritt der Nested-PCR mit der Primerkombination 201CHOMP und TRACH269. Die Weiterdifferenzierung mit dem Primerpaar 201CHOMP und S45241 gelang bei 12 von 29 positiv getesteten Tieren. Der Grund für das Fehlschlagen der Weiterdifferenzierung wurde bereits bei den Muttersauen dargelegt.

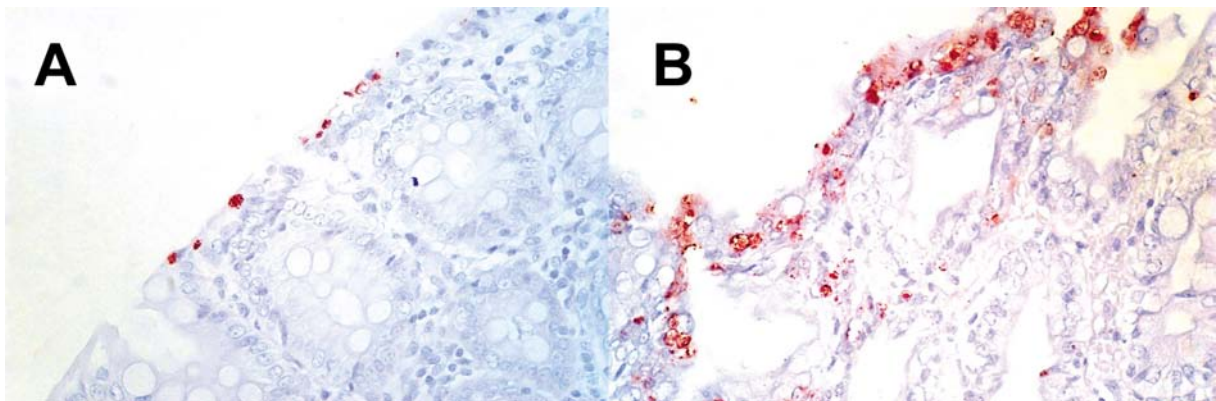
Zur Absicherung der Speziesdiagnose *Chlamydia suis* wurden von fünf ausgewählten Tieren die PCR-Produkte aus dem ersten Schritt der Nested-PCR aufgereinigt und der Sequenzanalyse zugeführt. Die Sequenzen sind in der Datenbank des EMBL mit den Acc.-Nr. AY687635-AY687639 hinterlegt. Das Alignment der erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Programms (NCBI) ergab eine Übereinstimmung von 92 - 93% mit dem *Chlamydia suis* S45 Referenzstamm. Zur weiteren Absicherung wurde mit diesen Proben die 16S-„signature sequence“-PCR durchgeführt und die erhaltenen Produkte ebenfalls sequenz-analysiert (AY686469-AY686473). Der Abgleich dieser Sequenzen gegen die Datenbank



ergab eine Übereinstimmung von 99 - 100% mit dem *Chlamydia suis* R22 Referenzstamm. Somit ist eindeutig die Speziesdiagnose *Chlamydia suis* für die untersuchte Population zu stellen.

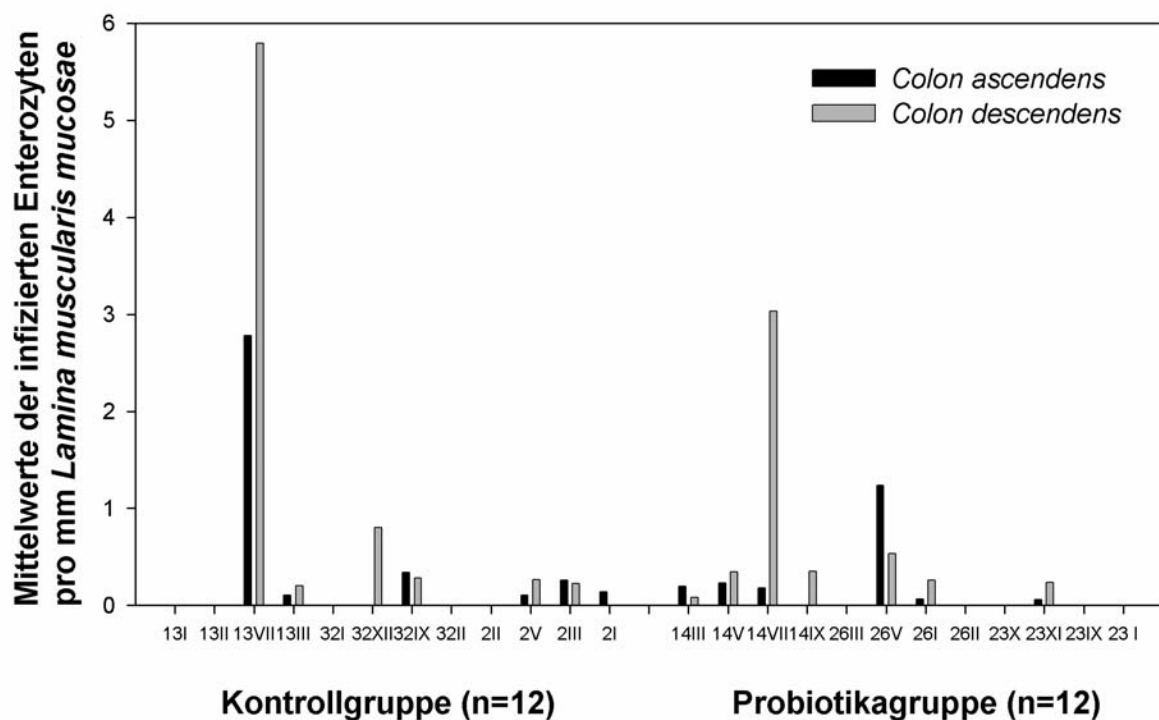
#### 4.2.3. Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Chlamydieninfektion am Darm der Ferkel

Um das Ausmaß der Chlamydieninfektion des Darms der Ferkel mit einer PCR-unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde die Immunhistochemie (IHC) herangezogen. Hierzu wurden aus jeder Fütterungsgruppe 12 zufällig ausgewählte Ferkel betrachtet. Es wurden von jedem Tier paraffineingebettete Gewebeproben von *Colon ascendens* und *Colon descendens* mit einem gattungsspezifischen monoklonalen Ak untersucht. Mit Hilfe der IHC konnten die Chlamydien im Zytoplasma der Enterozyten dargestellt werden, bei keinem der untersuchten Tiere konnten Chlamydien unterhalb der *Lamina muscularis mucosae* lokalisiert werden (Abb. 12).



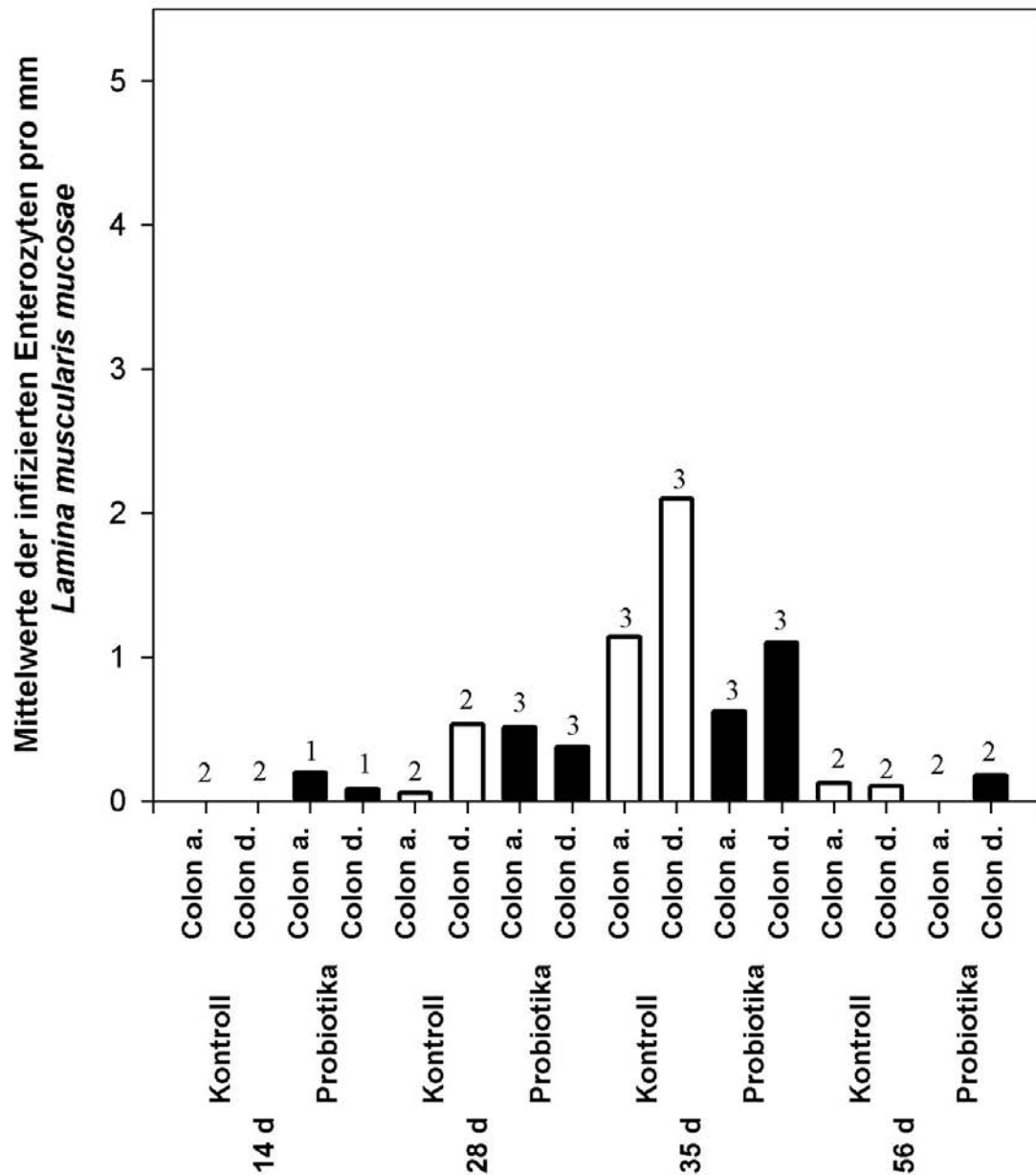
**Abb. 12:** Immunhistochemische Darstellung der Chlamydieninfektion unter Verwendung eines gegen das Lipopolysaccharid der Chlamydien gerichteten, gattungsspezifischen Ak im Darm eines Ferkels. Die Bilder zeigen mit Chlamydien (purpurfarben) infizierte Enterozyten im *Colon ascendens* (A) sowie im *Colon descendens* (B) eines 35 Tage alten Ferkels. Vergrößerung x400

In jeder Gruppe konnten mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchung sieben positive Tiere ermittelt werden. Zur semiquantitativen Auswertung des Infektionsgrades wurde die Strecke *Lamina muscularis mucosae* vermessen, die infizierten Enterozyten auf dieser Strecke gezählt und auf die Referenzstrecke von 1 mm bezogen. Betrachtet man die errechneten Mittelwerte der Einzeltiere so sieht man, dass das Ausmaß der Infektion große Schwankungen aufweist. In beiden Gruppen sieht man bei einer Mehrzahl (9/14) der *Chlamydia*-positiven Tiere, dass das *Colon descendens* eine stärkere Infektion mit Chlamydien aufweist (Abb. 13).



**Abb. 13:** Darstellung des Infektionsgrades anhand der errechneten Mittelwerte der infizierten Enterozyten pro mm *Lamina muscularis mucosae*. Man sieht im Vergleich der einzelnen Tiere eine große Spannweite beim Ausmaß der Chlamydienbelastung in beiden Fütterungsgruppen.

Wegen der großen interindividuellen Schwankungen des Infektionsgrades wurden zum Vergleich der Fütterungsgruppen die Mittelwerte der einzelnen Tiere in den jeweiligen Altersgruppen addiert (Abb. 14). Die höchste Chlamydienbelastung sah man bei den 35 Tage alten Tieren. In dieser Altersgruppe war auch ein Unterschied zwischen Kontroll- und Probiotikagruppe zu sehen.



**Abb. 14:** Altersabhängige Verteilung der infizierten Enterozyten pro mm *Lamina muscularis mucosae* der Kontrollgruppe und der Probiotikagruppe. Gezeigt werden die durchschnittliche Zahl der infizierten Zellen im *Colon ascendens* und *Colon descendens* der Fütterungsgruppen in den jeweiligen Altersgruppen. Pro Altersgruppe und Fütterungsgruppe kamen maximal drei Tiere zur Auswertung. Um die Verfälschung der Mittelwerte zu vermeiden wurden nur Tiere, die auch in der PCR *Chlamydia*-positiv waren, in die Rechnung einbezogen. Keine sichtbaren Säulen bedeutet, dass bei den Tieren mittels IHC keine Chlamydieninfektion nachweisbar war.

#### 4.2.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis der Chlamydieninfektion am Darm der Ferkel

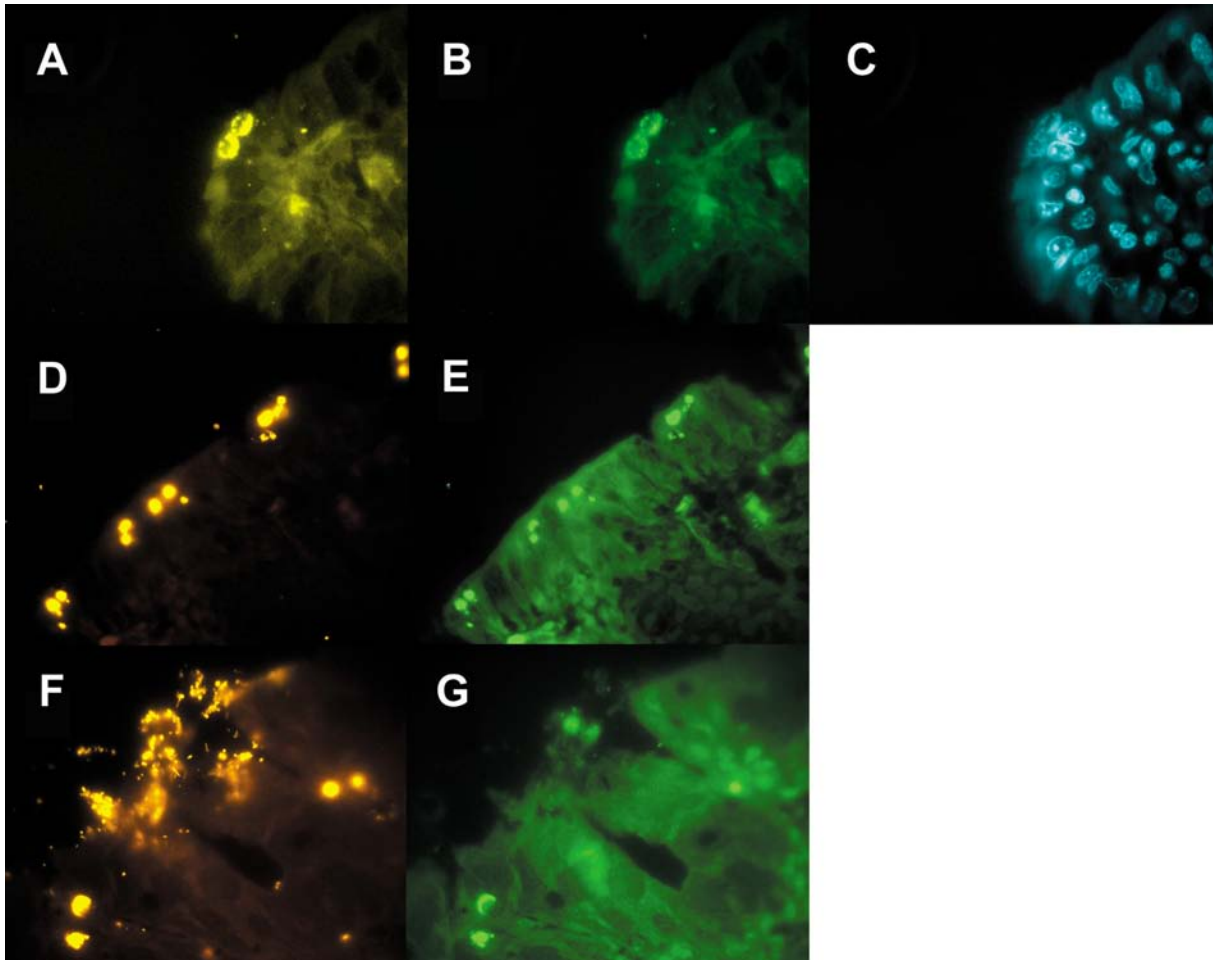
Mit dieser Methode wurden dieselben 24 Tiere untersucht, deren Infektionsstatus schon mit Hilfe der IHC bestimmt wurde. Die FISH wurde mit kunststoffeingebetteten Schnitten des *Ileum*, des *Colon ascenendens* und *Colon descendens* durchgeführt. Von den Darmabschnitten wurden 4 Schnitte mit unterschiedlichen Kombinationen von Genus- und Speziespezifischen Sonden untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse mit den verwendeten Sonden aufgeführt.

Sonde	Zielorganismus	Ergebnis der Hybridisierung
Chls-0523	<i>Chlamydiales</i>	<b>positiv</b>
Chlae-0574	<i>Chlamydiaceae</i>	<b>positiv</b>
Chla-0232	<i>Chlamydia</i>	<b>positiv</b>
Chlph-0583	<i>Chlamydophila</i>	negativ
Ct-0623	<i>C. trachomatis</i> (human)	negativ
EUB338	<i>Bacteria</i>	<b>positiv</b>

**Tab. 3:** Auflistung der verwendeten Oligonukleotidsonden mit ihren Zielorganismen und die Bewertung des Hybridisierungsergebnisses am untersuchten Darmgewebe (drei Lokalisationen) der 24 untersuchten Ferkel.

Die Ergebnisse der FISH ergaben ebenso wie die PCR und Sequenzanalyse die Speziesdiagnose *Chlamydia suis*. Die DNA-Sonden können nur Chlamydien in ihrer metabolisch aktiven Form, nicht die infektiösen oder persistierenden Stadien nachweisen. Befanden sich die Chlamydien in den Enterozyten in dieser metabolisch aktiven Form, konnten durch Hybridisierung mit entsprechenden Sonden stark positive Signale erzeugt

werden. Die folgende Abbildung (Abb. 15) zeigt beispielhaft den Chlamydiennachweis durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung am Darm der Ferkel.



**Abb. 15:** Fluoreszenz-*in-situ*-Nachweis der Chlamydieninfektion bei einem 35 Tage alten Ferkel. Darstellung der Chlamydieninklusionen im *Colon ascendens* durch die Cy3-gelabelte DNA-Sonde Chls-523 (A) als leuchtend orangegelbe Punkte. Ebenso wurden Chlamydien mit der Fluoreszein-gelabelten DNA-Sonde Chlae-574 (B) und der Kontrollfärbung durch DAPI (C) an derselben Lokalisation sichtbar gemacht.

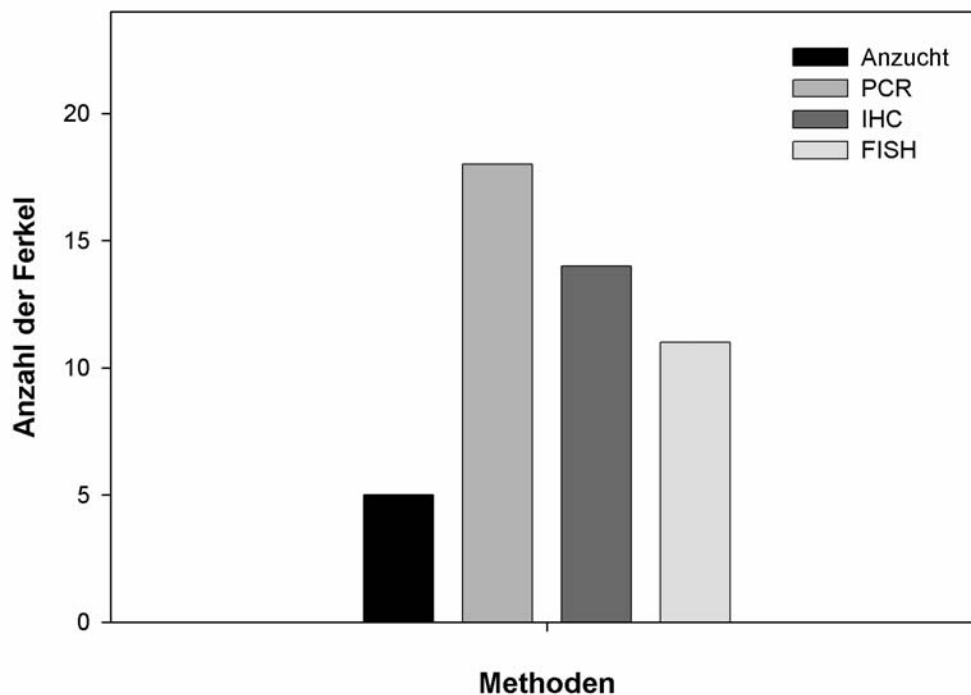
Visualisierung der Chlamydien im *Colon descendens* durch Chls-523 (D), Chlae-574 (E) und (F) und leuchtend orangegelb hybridisierte Bakterien im Darmlumen und Chlamydien durch die Cy3-gelabelter EUB-338 Sonde (G). Vergrößerung x 400.

In der Kontrollgruppe konnten bei sechs von zwölf Tieren und in der Probiotikagruppe bei fünf Tieren positive Signale mit der Hybridisierungstechnik dargestellt werden. Da von jedem Tier drei Darmabschnitte untersucht wurden, kommt man pro Fütterungsgruppe auf eine Anzahl von 36 Proben. Stellt man die Auswertung der einzelnen Darmabschnitte der Gruppen

einander gegenüber, so sieht man, dass in der Kontrollgruppe 10/36 positive Signale zeigten im Vergleich zu 8/36 der Probiotikagruppe. Von den 18 positiv getesteten Darmabschnitten verteilen sich drei auf das *Ileum*, sieben auf das *Colon ascendens* und acht auf das *Colon descendens*. Die als Positivkontrolle mitgeführte Sonde EUB-338 zeigte bei jedem hybridisierten Darmschnitt starke Hybridisierungssignale.

### 4.3. Vergleich der Methoden

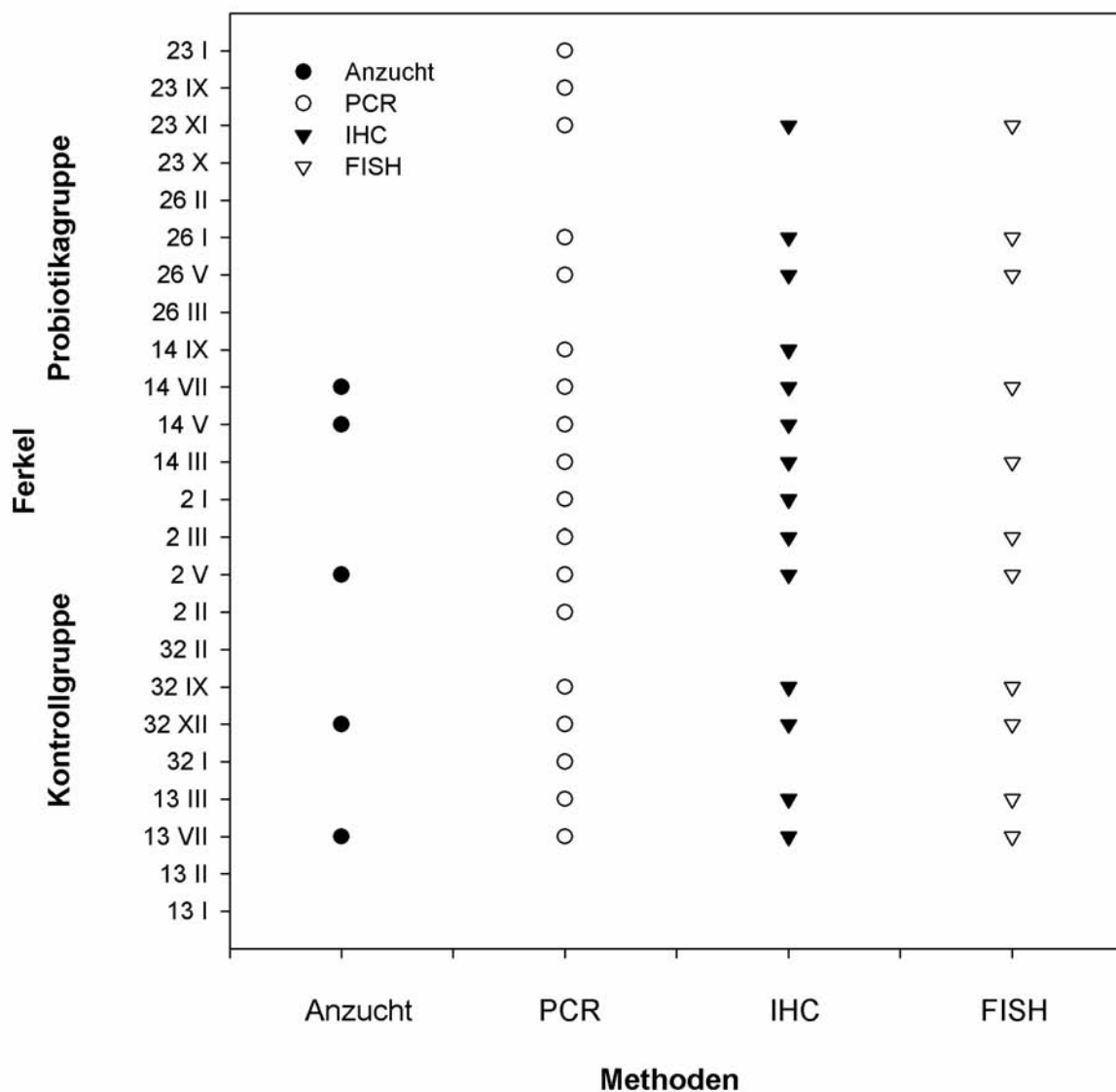
Es wurden an den gewonnenen Proben von insgesamt 24 zufällig ausgewählten Tieren die 4 Untersuchungsmethoden der Anzucht, PCR, IHC und FISH angewandt. In der folgenden Abbildung ist der Vergleich der Nachweisrate der Chlamydien graphisch dargestellt.



**Abb. 16:** Darstellung der *Chlamydia*-positiv getesteten Ferkel, die mittels Anzucht, PCR, IHC und FISH untersucht wurden. Durch Anzucht konnte bei 5/24 Tieren, durch PCR bei 18/24 Tieren, durch IHC bei 14/24 Tieren und durch FISH bei 11/24 Tieren eine Chlamydieninfektion des Darms nachgewiesen werden.

Mit der Untersuchungsmethode der PCR konnten die meisten *Chlamydia*-positiven Tiere (18/24) ermittelt werden, gefolgt von der IHC (14/24) und der FISH (11/24). Die Anzucht der Chlamydien erwies sich als Methode mit der geringsten Sensitivität (5/24).

Die Übereinstimmung der positiven Ergebnisse im Vergleich der Methoden liegt bei 100%, d.h. alle positiven Proben in der Anzucht waren auch in der FISH positiv, die FISH *Chlamydia*-positiv ermittelten waren auch in der IHC positiv und letztendlich waren alle IHC positiven Proben auch in der PCR positiv (Abb. 17).



**Abb. 17:** Darstellung der Übereinstimmung der *Chlamydia*-positiven Ergebnisse. Die fünf Tiere mit positiven Ergebnissen bei der Anzucht waren auch in den drei anderen Untersuchungsmethoden als *Chlamydia*-positiv zu bewerten. Die Tiere mit positivem Ergebnis in der FISH waren auch in der IHC und PCR als Chlamydienträger identifiziert worden. Der Chlamydiennachweis im Darm mittels IHC konnte durch den DNA-Nachweis mittels PCR bestätigt werden.