

# 1. Einleitung

Die Kokzidiose ist eine durch Protozoen der Spezies *Eimeria* hervorgerufene Darminfektion. Sie kann besonders in der Jungtieraufzucht zu erheblichen Verlusten führen. Im Zuge der Intensivierung der Geflügelhaltung sind die Bedingungen für die Entstehung wirtschaftlicher Verluste durch Kokzidiose erheblich gestiegen. Praktisch durchlaufen weltweit alle Hühner eine mehr oder weniger starke Eimerieninfektion.

Eine Bekämpfung und Kontrolle der Eimerieninfektion erfolgt in der Hühner- und Putenaufzucht über die Verabreichung von Antikokzidien mit dem Futter. Da die Kokzidien gegen die Antikokzidien Resistenzen entwickeln können, müssen diese nach einiger Zeit gewechselt werden. Weitere Nachteile der Antikokzidien sind das beim Mastgeflügel Wartezeiten eingehalten werden müssen, und das die Verbraucher im Bezug auf Chemotherapeutika in Lebensmittel liefernden Tieren zunehmend sensibilisiert sind.

Das Überstehen einer Kokzidiose bewirkt bei den Tieren eine höhere Widerstandskraft gegenüber nachfolgenden Infektionen. Die sich nach einer Erkrankung ausbildende Immunität wird bei einer Impfung ausgenutzt. In Deutschland ist momentan für Hühner nur der attenuierte Kokzidiose-Lebendimpfstoff "Paracox"<sup>1</sup> zugelassen. Eine Alternative zu attenuierten Lebendimpfstoffen ist die Entwicklung von rekombinanten Lebendvakzinen. Wird z. B. als Vektor für die rekombinanten Eimerien-Antigene ein zugelassener Salmonellen-Impfstamm verwendet, können die Tiere durch die Verabreichung des rekombinanten Salmonellen-Impfstammes gleichzeitig gegen die Salmonellose und Eimeriose des Huhnes geschützt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen rekombinanten *Salmonella enterica enterica*, Serovar Typhimurium Stamm (Kurzbezeichnung: *Salmonella typhimurium*), welcher heterologe *Eimeria tenella* Antigene exprimiert, zu entwickeln. Die immunogene Wirkung des rekombinanten *Salmonella* Stammes wurde in Tierversuchen serologisch untersucht. Für die serologische Untersuchung der Proben wurde ein ELISA etabliert. Als *Salmonella typhimurium* Stamm wurde der Impfstamm *Zoosaloral H<sup>(R)</sup>*<sup>2</sup> eingesetzt.

---

<sup>1</sup>Paracox, Pitman-Moore Europe Ltd., United Kingdom

<sup>2</sup>Impfstoffwerk Dessau-Tornau, D-06855 Roßlau

## 2. Literatur

### 2.1. Kokzidiose beim Huhn

Unter den durch Protozoen verursachten Krankheiten des Nutzgeflügels kommt den Kokzidiosen die größte Bedeutung zu. Die ubiquitär verbreiteten Erreger sind eine ständige Bedrohung jeglicher Geflügelhaltung. Hühner können von 9 bekannten Kokzidienarten befallen werden, die ausnahmslos zur Gattung "Eimeria" gehören. Jedoch nur 6 von ihnen haben eine wirtschaftliche Bedeutung. Dabei handelt es sich um *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mivati*, *Eimeria necatrix* und *Eimeria tenella*. Die Hühner-Kokzidiose ist eine komplexe intestinale Erkrankung, die weltweit jährlich zu einem Schaden von ca. 2 Billionen Dollar in der Hühnerproduktion führt (Bhogal et al., 1992).

Der Entwicklungskreislauf umfaßt bei allen *Eimeria*-Arten eine endogene und eine exogene Phase. Die zyklische Erregervermehrung erfolgt obligat intrazellulär über 1 - 4 asexuelle Schizogonien und eine geschlechtlich differenzierte Gametogonie. Die mit dem Kot der Wirtstiere ausgeschiedenen Oozysten müssen infektiös zu werden, in der Außenwelt sporulieren. Die Infektion erfolgt ausschließlich per os durch Aufnahme sporulierter Oozysten, die eine außergewöhnlich große Tenazität besitzen, und durch alle erdenklichen Vektoren belebter oder unbelebter Art verschleppt werden können.

Kokzidien sind wirts- und gewebsspezifisch. Ausbruch und Verlauf der Kokzidiose werden weitgehend von der Infektionsdosis, der Pathogenität der Kokzidienart und der allgemeinen körperlichen Verfassung der Vögel beeinflusst. In gemischtaltrigen Tiergruppen herrscht nach allgemeiner Auffassung ein enzootisches Gleichgewicht. Dagegen kommt es bei abgesonderter Aufzucht von Jungtieren, insbesondere bei Massentierhaltung auf engem Raum, zu einem gesteigertem Infektionsrisiko und zu einer Störung dieser Balance.

Die klinischen Erscheinungen bei einer Kokzidiose bestehen allgemein in Darmkatarh, Abgeschlagenheit, verringerter Nahrungsaufnahme, Gewichtsabnahme oder unbefriedigende Gewichtszunahme und sinkende Legeleistung. Aufgrund des klinischen Bildes allein läßt sich nur in wenigen Fällen (z. B. *Eimeria tenella*-Kokzidiose) eine Diagnose stellen. Für die Bestimmung der Kokzidienart sind der pathologisch-anatomische Befund der erkrankten Tiere und die Größe und Form der Oozysten wichtig.

### 2.1.1. *Eimeria tenella*

*Eimeria tenella* ruft die Blinddarmkokzidiose hervor, die in ihrer akuten Form als "Rote Ruhr" der Küken bezeichnet wird. Bei einer Infektionen mit *Eimeria tenella* tritt nach einer Präpatenz von 5 Tagen eine hämorrhagische Typhlitis mit blutigem Durchfall auf. Morbidität und Mortalität sind bei dieser Kokzidiose hoch und können bis zu 80 % betragen. Hühner sind gegenüber *Eimeria*-Infektionen praktisch in jedem Lebensalter gleich anfällig, jedoch gilt nach wie vor, dass *Eimeria tenella* besonders in der Aufzucht- und Mastperiode eine wesentliche Rolle spielt (Rommel, 1987).

Ein Entwicklungsstadium bei Eimerien ist die sporulierte Oozyste. Sie enthält bei *Eimeria tenella* je 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten. Die Sporozoiten besitzen als auffälligste Struktur die Refraktilen Körper, welche ca. 30 - 50 % des zytoplasmatischen Raums belegen (Lillehoj und Trout, 1993). Bei den Refraktilen Körpern handelt es sich vermutlich um spezifische Speicherorganellen, die bei der Darmpassage des Parasiten benötigt werden. Einige Antigene der Refraktilen Körper sind konserviert, während sich andere in ihrer Verteilung innerhalb einer individuellen Art unterscheiden (Lillehoj und Trout, 1993). Die Refraktilen Körper verändern sich nach der Invasion der Wirtszelle und spielen so möglicherweise eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung der Kokzidien (Chobotar und Scholtyserk, 1982).

Die Invasion der Wirtszelle durch die Sporozoiten benötigt eine komplexe Interaktion zwischen Parasit und Wirt. Eine organisierte Gruppe von Strukturen, die am apikalen Ende der invasiven Stadien lokalisiert ist, spielt eine wichtige Rolle beim Invasionsprozess. Zu dieser Gruppe zählen u. a. die Mikronemen (Tomley et al., 1991). Studien mit *Plasmodium knowlesi* weisen darauf hin, dass die Funktion der Mikronemen die eines Zell-Oberflächen-Rezeptors ist (Tomley et al., 1991).

Weitere Studien bestätigen die wichtige Rolle die die Mikronemenproteine beim Invasionsprozess spielen. Die Mikronemenproteine gehören zu einer Gruppe von Proteinen die mit Strukturen im Apikalem Komplex assoziiert sind. Diese Proteine sind vermutlich an der Invasion beteiligt und spielen so eine Rolle in der Formation der sogenannten "parasitophorous vacuole" (PV). Die PV ist ein spezielles Kompartiment im Wirtszellenzytoplasma. In diesem Kompartiment durchlaufen die Kokzidien, wie alle Mitglieder des Stammes Apikomplexa, eine asexuelle Entwicklung (Jenkins, 1998). Die Mikronemen sind kleine, elektronendichte Organellen, die in der Regel gruppenweise zusammenliegen. Sie verschwinden während des Entwicklungsstadiums der Schizonten bzw. Mikro- und Makrogameten.

### 2.1.2. Prophylaxe und Bekämpfung der Kokzidiose beim Huhn

Die Prophylaxe und Bekämpfung der Kokzidiose beim Huhn ist nicht nur aus wirtschaftlicher Sicht unabdingbar. Eine vorsichtige Schätzung der Kosten, bedingt durch Kokzidien in der Hühnerhaltung im Vereinigtem Königreich, ergibt jährlich 5,5 Millionen englische Pfund, davon die Hälfte allein für die medizinische Behandlung. In den Vereinigten Staaten, deren Hühner-Intensiv-Haltung sehr viel größer ist, liegen die Kosten

wahrscheinlich im Bereich von 50 Millionen englischen Pfund (Rose und Long, 1980).

Es gibt praktisch keine wirtschaftlich zu betreibende Haltungsform beim Geflügel, durch die Kokzidienbefall oder gar Kokzidiose verhindert werden könnte. Die Einhaltung der allgemeinen hygienischen Haltungsbedingungen und andere prophylaktischen Maßnahmen können das Risiko aber deutlich senken. Eine dieser prophylaktischen Maßnahmen ist die Gabe von kokzidienwirksamen Futterzusatzstoffen während der Jungtieraufzucht. Masttiere werden bis kurz vor der Schlachtung unter dem Schutz eines Antikokzidiums gehalten, um parasitenbedingte Gewichtseinbußen zu vermeiden. Jungennen sollen im Gegensatz zu Masttieren im Verlauf ihrer Aufzuchtperiode eine milde Durchseuchung zur Immunitätsbildung durchlaufen, da während der Legeperiode die Verwendung von Antikokzidien gesetzlich untersagt ist. Ein Problem der Antikokzidien ist, dass sich gegen die meisten Präparate innerhalb weniger Jahre Resistenzen ausbilden, die bereits nach 5 Jahren so weit verbreitet sein können, dass die betroffene Substanz keine Marktchance mehr hat. Zudem ist der Einsatz von Antikokzidien kostenintensiv, so wird die Aufwendung von Antikokzidien in der Geflügelhaltung mit 300 Millionen US-Dollar angegeben (Shirley, 1992).

Eine Alternative zur Chemoprophylaxe durch Antikokzidien ist eine Immunisierung der Tiere. Zur Immunisierung gegen Kokzidien existieren momentan drei Ansätze:

1. Die Immunisierung mit virulenten Erregern.
2. Die Immunisierung mit attenuierten Erregerstämmen.
3. Die Immunisierung mit rekombinanten Antigenen.

Lebendvakzine, die auf einer der ersten beiden Ansätzen beruhen, werden für das Huhn kommerziell angeboten. Diese Lebendvakzinen werden beim Huhn fast ausschließlich in der Aufzucht von Elterntieren und Legehennen eingesetzt. Der dritte Ansatz, die Immunisierung mit rekombinanten Antigenen befindet sich im Versuchsstadium oder bestenfalls im frühem Erprobungsstadium.

## **2.2. Immunologie**

### **2.2.1. Immunsystem des Huhnes**

Das Immunsystem des Vogels ist durch die morphologische Besonderheit geprägt, dass zwei zentrale lymphatische Organe vorhanden sind: die Bursa Fabricii, die den Säugetieren fehlt, und der Thymus. In der Bursa Fabricii erfolgt die Prägung der B-Lymphozyten, welche maßgeblich an humoralen Immunreaktionen beteiligt sind. Der Thymus stellt die zelluläre Immunität vermittelnden T-Lymphozyten bereit.

Immunkompetente B-Lymphozyten sind erst nach dem Schlupf in der Bursa Fabricii zu finden. Spätestens 6 Wochen nach dem Schlupf sind alle lymphatischen Organe einschließlich Knochenmark und Thymus von diesen Zellen besiedelt. Nach experimenteller Entfernung der Bursa Fabricii (Bursektomie) ist die Fähigkeit zur Ausbildung humoraler Antikörper stark herabgesetzt.

Die Bursa Fabricii und der Thymus sind nur während bestimmter Entwicklungsphasen voll ausgebildet und damit funktionsfähig, und bilden sich anschließend zurück. Mit fortschreitender Involution von Thymus und Bursa Fabricii gewinnt das Knochenmark als peripheres (sekundäres) lymphatisches Organ an Bedeutung.

Das sogenannte *lymphoepitheliale System*, ein mit den Schleimhäuten in enger anatomischer Assoziation stehendes lymphatisches Gewebe, kann über subepithelial oder interepithelial gelegene immunkompetente Zellen Immunantworten einleiten. Die Hauptaufgabe des *lymphoepithelialen Systems* ist eingedrungene Pathogene an ihrer Eintrittsstelle zu vernichten, um damit eine Verbreitung und eine systemische Infektion im Wirt zu verhindern. Diese Funktion wird auf unterschiedlicher Art und Weise verwirklicht. Zu einem durch nicht-spezifische Barrieren wie z. B. Magensekretion und Gallensalze und zum anderem durch spezifische Schutzmaßnahmen, die durch Antikörper und Lymphozyten vermittelt werden. Die spezifischen Mechanismen zur Eliminierung von schädlichen Pathogenen bedingen eine komplexe Interaktionen zwischen humoraler und zellulärer Immunität. Dies geschieht unter Ausnutzung von Antigen-spezifischen und Antigen-unabhängigen Prozessen, die zum Aufspüren und zum Neutralisieren von eindringenden Mikroorganismen entwickelt wurden (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe, ein Anteil des *lymphoepithelialen Systems*, ist ein vielschichtiges Gewebe das sich kontinuierlich mit Antigenen aus der Nahrung, mit der normalen Mikroflora und mit aufgenommenen Pathogenen auseinandersetzt. Im darmassoziierten lymphatischen Gewebe von Hühnern haben sich eine Vielfalt von spezialisierten, lymphatischen Organen (Peyerschen Platten, Caecaltonsillen und Bursa Fabricii) und Zelltypen (Epithelial Lymphozyten, Antigen-präsentierende Zellen und Natürliche Killerzellen) entwickelt, um den Körper gegen schädliche Pathogene zu verteidigen. 25 % der intestinalen Schleimhaut besteht aus lymphatischem Gewebe, das entweder als getrennte oder verwachsene lymphatische Follikel oder als vereinzelt Lymphozyten im intestinalen Epithelium, in der Lamina propria oder in den entwässernden Lymphknoten erscheint. Weitere Zelltypen im darmassoziierten lymphatischen Gewebe sind Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten und dendritische Zellen. Eine interzelluläre Kommunikation innerhalb des darmassoziierten Gewebes ist für die Entwicklung einer schützenden Immunität wichtig. Diese Kommunikation ist bidirektional, d. h. Lymphozyten sezernieren oder reagieren auf Zytokine, die Zytokine wiederum stimulieren oder hemmen die Aktivitäten von anderen Lymphozyten oder von nicht-lymphatischen, sesshaften Zellen (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Die intestinalen-epithelialen Zellen sind wichtige Regulatoren der natürlichen und erworbenen Immunität. Das Schleimhaut-Epithel des Verdauungstraktes ist eine selektive Barriere. Sie ist durchlässig für Ionen und Makromoleküle aus der Nahrung, dagegen unpassierbar für aufgenommene Pathogene und für die normale Darmflora. Die intestinalen-epithelialen Zellen produzieren einige wichtige Zytokine wie z. B. Interleukin-1 und den Tumor-Nekrose-Faktor. Es wurde sowohl eine stimulierende als auch eine hemmende Aktivität der intestinalen-epithelialen Zellen, ausgelöst durch Zytokine, beschrieben. Da die intestinalen-epithelialen Zellen eine zentrale Rolle bei den intestinalen Immunantworten spielen, ermöglicht ein umfassendes Verständnis ihrer Interaktion mit verschiedenen Pathogenen eine bessere Kontrolle von Krankheiten (Yun, Lillehoj und

Lillehoj, 2000).

Die intestinalen-intraepithelialen Lymphozyten, in erste Linie handelt es sich dabei um T-, B-Lymphozyten und Plasmazellen, sind in der Schleimhaut des Dünn- und Dickdarmes lokalisiert. Bei Hühnern wurden mit dem Menschen und der Maus vergleichbare CD3-, CD4- und CD8-Antigene gefunden. Wie auch bei den Säugetieren können die intestinalen-intraepithelialen T-Lymphozyten von Hühnern phänotypisch in eine CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulation unterteilt werden. Die Anzahl von intestinalen-intraepithelialen T-Lymphozyten im darmassoziierten lymphatischen Gewebe variiert bei Hühnern in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, dem betreffenden Darmabschnitt und dem genetischen Hintergrund (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

T-Zellen und intestinale-intraepitheliale Lymphozyten regulieren die Immunantworten in der Schleimhaut. Wie Untersuchungen zeigten beeinflussen T-Zellen und ihre abgesonderten Zytokine die Funktion von intestinalen-epithelialen Zellen. Die exakte Rolle der intestinalen-intraepithelialen Lymphozyten in diesem Prozess wird momentan weltweit erforscht. Einige Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass intestinale-intraepitheliale Lymphozyten im Stande sind, lösliche Protein-Antigene *in vitro* und *in vivo* zu bearbeiten (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

IgG ist die Immunglobulin Klasse, welche in höchster Konzentration im Blutserum der Tiere gefunden wird. Das IgG wird beim Huhn auch als IgY bezeichnet. Die Funktion von IgY ist mit der Funktion von IgG bei den Säugetieren vergleichbar. Die Struktur des IgY ist dagegen als IgA ähnlich identifiziert worden (Fischer und Hlinak, 1996). IgA ist das vorherrschende Immunglobulin bei der Sekretion von Speichel, Milch oder intestinaler Flüssigkeit.

Die Plasmazellen in der Lamina propria sondern in erster Linie IgA ab, welches dann durch die Barriere der Epithelzellen transportiert und ins Darmlumen abgegeben wird (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000). Nach der Abgabe bindet das IgA an einen Glykoproteinrezeptor für polymere Immunglobuline (pIgR), der sich an der inneren Oberfläche der intestinalen Enterozyten befindet. Das gebundene IgA wird von den Enterozyten aufgenommen, und in Vesikeln zur anderen Zelloberfläche bzw. zum intestinalen Lumen transportiert. Dort angekommen wird das pIgR teilweise abgespalten, so dass ein Rest am IgA verbleibt. Diese sogenannte "sekretorische Komponente" bildet zusammen mit dem IgA ein komplexes Molekül das als "sekretorisches IgA" bezeichnet wird. Die "sekretorische Komponente" schützt das "sekretorische IgA" vor einem Abbau (Tizard, 2000).

In manchen Spezies, z. B. Ratte, Kaninchen und Hühner, werden 30 - 75 % der IgA-Produktion aus dem Intestinum über die Pfortader in die Leber transportiert. Das IgA gelangt dann durch die Hepatozyten in die Gallenkanälchen. Die Gallenflüssigkeit ist dadurch extrem mit IgA angereichert (Tizard, 2000). Durch die Abgabe der Gallenflüssigkeit in das Intestinum schließt sich der enterohepatische Kreislauf des IgA.

Der Hauptanteil der IgA-Zellen (über 80 %) entsteht in peripheren Blutgefäßen und wandert dann durch Schleimhaut-Adhäsion-Oberflächen-Determinanten in die Lamina propria. Bei einer Untersuchung, welche Immunglobuline bei einer Kokzidiose von den Zellen in der Lamina propria produziert werden, war der Hauptanteil IgA (95 %), während IgG (3,6 %) und IgM (1,4 %) deutlich geringer vertreten waren (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Von den charakterisierten Zytokinen in Säugetiere wurden bisher nur wenige Homologe bei den Hühnern gefunden. Dabei handelt es sich um IFN- $\gamma$ , Transforming-growth-factor, Tumor-Nekrose-Faktor und IL-2. T-Lymphozyten und Makrophagen sind höchstwahrscheinlich die Quelle für die Zytokinproduktion im Darm. Hühner-IFN- $\gamma$  reguliert die erworbene Immunität durch die Aktivierung von Lymphozyten, und durch eine Erhöhung der Ausprägung von MHC-Klasse-II-Antigenen (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Das MHC von Hühnern ist kleiner und einfacher als das von Säugetieren, und es ist anders aufgebaut (Tizard, 2000). Als Synonym für das MHC des Huhnes wurde der Begriff B-Komplex eingeführt. Der B-Komplex setzt sich aus 3 Subregionen zusammen: F, L und G, die die gleichnamigen Antigene codieren. Diese Subregionen oder Antigene werden wiederum in Analogie zur MHC-Nomenklatur der Säugetiere bestimmten funktionellen Klassen, nämlich den Klassen I und II zugeordnet. Bei den üblicherweise verbreiteten Hühner-Haplotypen wird nur ein Molekül der Klasse I oder II ausgeprägt. Der Besitz eines bestimmten Haplotypen entscheidet über die Empfänglichkeit gegenüber Krankheiten. Z. B. zeigen reinerbige Hühner für B<sup>1</sup>, in der Regel eine hohe Mortalität und eine hohe Empfänglichkeit für die Marek Krankheit. Ihre Immunantworten bei einer Infektion mit *Salmonella pullorum* oder bei Verabreichung von humanen Serum-Albumin fallen schwach aus. Bei einem Vergleich zwischen Hühnern, die B<sup>5</sup> oder B<sup>2</sup> reinerbig sind, fällt auf das die B<sup>5</sup>-Tiere bei einer Infektion mit *Eimeria tenella* mit einer stärkeren Antikörper-Antwort und mit einer geringeren Entwicklung von Darmläsionen reagieren (Tizard, 2000).

Das Immunsystem von Mäusen ist ausführlicher untersucht als das von Hühnern. Es wurden Gemeinsamkeiten bei der Immunität von Mäusen und Hühnern gegenüber Eimerien-Infektionen beobachtet (Jenkins, 1998), somit können die Beobachtungen von Mäusekokzidiosen in die Erforschung der Hühnerkokzidose miteinbezogen werden.

So wurde bei Untersuchungen mit Mäusen festgestellt, dass Helfer-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine zentrale Rolle im Auslösen und Kontrollieren von spezifischen Funktionen bei einer Infektion spielen. Zwei Untereinheiten von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, welche verschiedene Reihen von Zytokinen produzieren, wurden in Mäusen beschrieben. Erstens die T<sub>h</sub>1-Untereinheit, welche IL-2 und IFN- $\gamma$  sekretiert, eine zell-abhängige Immunität vermittelt und die IgG2a-Produktion von B-Lymphozyten unterstützt (Comoy et al., 1997). Die IFN- $\gamma$ -Produktion der T<sub>h</sub>1-Zellen wird durch *Mycobacterium tuberculosis* gesteigert (Tizard, 2000). Und Zweitens die T<sub>h</sub>2-Untereinheit, welche die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 abgibt und eine humorale Immunität induziert (Comoy et al., 1997). T<sub>h</sub>2-Zellen sind assoziiert mit der ansteigenden Immunität bei manchen Parasiten, z. B. *Toxocara canis* (Helminthen) (Tizard, 2000).

Gedächtniszellen bilden eine Reserve von Antigen-empfindlichen Zellen. Wird einem "geprägten" Tier eine zweite Dosis eines Antigens verabreicht, trifft es auf eine große Anzahl von Gedächtniszellen, die in der gleichen Art und Weise wie die antigen-empfindlichen B- und T-Zellen antworten. Die Sekundärantwort ist größer als die Primärantwort und die Anlaufphase der Zellen ist kürzer (Tizard, 2000). Bei der Primärantwort überwiegt mengenmäßig das IgM gegenüber dem IgG, bei der Sekundärantwort verschiebt sich das Verhältnis zu Gunsten von IgG (Tizard, 2000).

Die Antikörper-Synthese wird über eine negative Rückkopplung kontrolliert. D. h. spezifische Antikörper binden an die Fc-Rezeptoren der B-Zellen und blockieren dadurch die weitere Produktion von Antikörpern mit der gleichen Spezifität. Maternale Antikörper verhindern über diese negative Rückkopplung die Synthese neonataler Antikörper (Tizard, 2000).

Während sich das Ei im Eierstock befindet, wird IgG aus dem Hennenserum in den Dotter transportiert. Bei der Wanderung des Eies durch den Eileiter werden Albumin, IgM und IgA erworben. Der Hühnerembryo absorbiert während seiner Entwicklung einiges von dem IgG, das dann in seinem Körper zirkuliert. Das maternale IgM und IgA wandert ohne das Albumin in die Amnion-Flüssigkeit ab, und wird dort vom Embryo abgeschluckt, so dass das Küken beim Schlüpfen im Serum IgG und im Intestinum IgM und IgA besitzt. Das frisch geschlüpfte Küken hat erst nach circa 24 Stunden alle Antikörper aus dem Dottersack absorbiert. Diese maternalen Antikörper verhindern effektiv eine erfolgreiche Vakzinierung bevor sie 10 - 20 Tage nach dem Schlüpfen verschwinden (Tizard, 2000).

### 2.2.2. Immunologie bei Kokzidiose

Da der Entwicklungszyklus von *Eimeria* intrazellulär, extrazellulär, asexuelle und sexuelle Stadien beinhaltet, ist es nicht überraschend, dass sich die Wirts-Immunität genauso komplex und aus vielen Aspekten der nicht-spezifischen und spezifischen Immunität zusammensetzt (Lillehoj, 1998). Nicht-spezifische Faktoren sind physikalische Barrieren, Phagozyten und Leukozyten und das Komplement-System. Spezifische Wirts-Immunität wird durch Lymphozyten und ihre Sekretionen wie z. B. Antikörper und Zytokine vermittelt (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Die *Eimeria tenella* Infektion ist im Darm lokalisiert, somit ist der intestinale Anteil des Immunsystems besonders gefordert. Das darmassoziierte lymphatische Gewebe besitzt drei Funktionen bei der Verteidigung des Wirtes gegen pathogene Infektionen wie z. B. Kokzidiose:

- Prozessierung und Präsentation von Antigenen
- Produktion von intestinalen Antikörpern
- Aktivierung von zell-vermittelter Immunität.

IgA ist der wichtigste intestinale Antikörper. Das sekretorische IgA eliminiert Mikroben wirksam aus dem Darm. Obgleich das sekretorische IgA weder Komplement fixiert noch die Phagozytose unterstützt, wird das Festhalten bzw. die Kolonisation von Mikroben auf der Oberfläche der epithelialen Lumenauskleidung verhindert (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Trotz dessen das bei Hühnern, die mit *Eimeria* infiziert wurden, Parasiten-spezifisches IgM, IgY und IgA sowohl zirkulierend als auch auf den Schleimhäuten gefunden wurde, ist die Fähigkeit der Immunglobuline die Infektion zu begrenzen gering. Interessanterweise ruft ein späterer Zweitkontakt mit *Eimeria tenella* oder *Eimeria acervulina* keine



Gedächtnisantwort bei dem sekretorischen IgA hervor. Ein Nachteil bei der Messung von *Eimeria* spezifischen sekretorischen IgA ist, dass das Vorkommen von IgA in der Gallenflüssigkeit möglicherweise nicht mit dem Vorkommen in den infizierten Arealen des Darmes korreliert. So war *Eimeria tenella* spezifisches sekretorisches IgA bei einer Untersuchung zwar im Blinddarminhalt nachweisbar, nicht aber im Serum oder in der Gallenflüssigkeit (Zigtermann et al., 1993). Desweiteren wurde bei Hühnern, welche mit *Eimeria acervulina* oder *Eimeria tenella* infiziert wurden beobachtet, dass die Produktion von Parasiten-spezifischen, sekretorischen IgA im erkrankten Darmbereich immer höher war wie im restlichen Körper (Girard et al., 1997)

Zell-vermittelte Immunantworten beinhalten sowohl Antigen-spezifische als auch nicht-spezifische Aktivitäten der T-Lymphozyten, der Natürlichen Killerzellen und der Makrophagen. T<sub>c</sub>-Zelle erkennen Fremd-Antigene im Zusammenhang mit MHC-Klasse-I-Molekülen und CD8<sup>+</sup>, während T<sub>h</sub>-Zellen Antigene in Assoziation mit MHC-Klasse-II-Molekülen und CD4<sup>+</sup> wahrnehmen (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000). Aktivierte Makrophagen beeinflussen zusammen mit unterschiedlichen Leukozyten-Populationen die Stärke einer Eimerien-Infektion.

Natürliche Killerzellen bekämpfen eine Vielzahl von schädlichen infektiösen Organismen im Anfangsstadium von Infektionen. Ihre durch verschiedene Mechanismen vermittelten Effekte beinhalten die Sekretion von immunregulierenden Zytokinen, die Lyse von Parasiten-Wirtszellen und, durch die Interaktion mit T-Zellen, die direkte Hemmung des Wachstums der Mikroorganismen (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000). Bei Hühner bilden die natürlichen Killerzellen eine kleine Subpopulation der intestinalen-intraepithelialen Lymphozyten, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Kokzidiose, z. B. zur Zytolyse von infizierten Zellen oder als Quelle von IFN- $\gamma$ , spielen. Bei genetisch unterschiedlichen Inzucht-Stämmen von Hühnern wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität von Natürlichen Killerzellen und der Resistenz bzw. Empfänglichkeit gegenüber Kokzidiose beobachtet (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Die Caecal-Tonsillen stellen die größte Ansammlung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes bei Hühnern dar. Die Lymphozyten der Caecal-Tonsillen sind zu 45 - 55 % B-Zellen und zu 35 % T-Zellen, und verfügen somit über eine Antikörper-Produktion und zell-vermittelte Immunfunktionen. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Lymphozyten der Caecal-Tonsillen bei den intestinalen Immunantworten auf *Eimeria* einbezogen sind (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Die Bedeutung von T-Zellen für den Erwerb der Immunität bei Kokzidiose wurde in zahlreichen Studien dokumentiert. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induzieren bei Eimerien-Infektionen eine schützende Immunantwort. Bei einer primären und sekundären *Eimeria acervulina* Infektion wurde eine Korrelation zwischen der Erkrankung und den Veränderungen der intestinalen T-Lymphozyten im Duodenum festgestellt (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000). Die Ergebnisse der Studien deuten daraufhin, dass die Eimerien-Infektion eine lokale Veränderung der T-Zellen induziert, und diese Veränderung die genetischen Unterschiede bei den Wirts-Immunantworten gegenüber verschiedenen Arten von *Eimeria* reflektiert.

Die Produktion von IFN- $\gamma$  in Hühnern wurde als Maßstab für die T-Zellen-Antwort auf Kokzidien-Antigene verwendet. Die Verabreichung von exogenem rekombinanten

IFN- $\gamma$  an Hühner führte zu einer signifikanten Hemmung der intrazellulären Entwicklung von *Eimeria*-Parasiten und zu einem geringeren Gewichtsverlust der Tiere (Yun, Lillehoj und Lillehoj, 2000).

Das Überstehen einer Kokzidiose bewirkt eine höhere Widerstandskraft gegenüber nachfolgenden Infektionen. Bei immunisierten Hühnern werden im Vergleich mit nativen Hühnern nach einer *Eimeria tenella* Infektion mehr Leukozyten in der Lamina propria gefunden (Vervelde et al., 1996).

Die ausgebildete Immunität ist weitgehend artspezifisch. Allerdings gibt es in der Literatur auch Hinweise auf eine Kreuzimmunität innerhalb der Eimerien-Arten des Huhnes. Zum Beispiel konnte ein partieller Kreuz-Schutz durch einige Entwicklungsstadien bei bestimmten Spezies, wie *Eimeria tenella* zu *Eimeria necatrix*, und *Eimeria maxima* zu *Eimeria brunetti* beobachtet werden. Bei diesen Eimerien-Arten zeigte sich eine Kreuz-Reaktivität bezüglich der gebildeten Antikörper und den T-Zellen (Bhogal et al., 1992). Desweiteren entwickelten Hühner, denen wiederholt *Eimeria adenoides* Sporozoitien verabreicht wurden, eine Immunität gegen eine *Eimeria tenella* Infektion (Augustine und Danforth, 1989).

Der Grad der Immunität variiert je nach Eimerienart und Infektionsstärke. Zum Beispiel sind bei der hochpathogenen und schwach immunogenen Art *Eimeria tenella* große Oozystenmengen oder die wiederholte Applikation von relativ kleinen Mengen an Oozysten Voraussetzung für eine gute Immunität (Rose, 1987).

Die asexuellen Vermehrungsstadien der Eimerien werden als immunogene Stadien angesehen. Folglich induzieren Proteine der Sporozoitien, Merozoitien und Schizonten eine schützende Immunität gegen Belastungsinfektionen. Die Proteine von Sporozoitien und Merozoitien spielen vermutlich eine größere Rolle als die des Schizontenstadiums. So wurde festgestellt, dass sich eine effektive Immunität überwiegend auf die Sporozoitien auswirkt, und dass die durch immunochemische Untersuchungen identifizierten Polypeptide von *Eimeria tenella* Sporozoitien und Merozoitien teilweise kreuz-reagieren (Wisher, 1986).

Die sich ausbildende Immunität nach einer Kokzidien-Infektion besteht aus humoralen und zellulären Abwehrmechanismen (Rose, 1982). Die immunen Hühner entwickeln spezifische Antikörper und zelluläre Antworten auf Parasiten-Antigene (Bhogal et al., 1992). Zirkulierende Antikörper treten in Abhängigkeit von der Infektionsdosis und der Parasitenart auf, sind aber gewöhnlich nach circa einer Woche nachweisbar. Lillehoj und Ruff gelang es, ab dem 7. Versuchstag Kokzidien-spezifische, zirkulierende und sekretorische Antikörper nachzuweisen (Lillehoj und Ruff, 1987) Bei den sekretorischen Antikörpern in der Schleimhaut, im Darmlumen und in der Gallenflüssigkeit infizierter Tiere handelt es sich in erster Linie um sekretorisches IgA, gelegentlich um IgM und IgG, dagegen liegt der Schwerpunkt im Serum auf IgG und IgM. IgA ist im Serum der infizierten Tiere nur gering vertreten.

Die Ergebnisse einer von Lillehoj durchgeführten Studie demonstrieren, dass Antikörper nur eine unwesentliche Rolle bei der Festlegung der Krankheitsempfänglichkeit und bei der Entwicklung einer schützenden Immunität gegen Kokzidien spielen (Lillehoj, 1987). Diese wird stattdessen der zellvermittelten Immunität zugesprochen, da ein adoptiver Transfer einer schützenden Immunität mit Lymphozyten möglich war, und eine

Entwicklung von T-Zellen-Antworten bei immunisierten Hühnern durch Sporozoiten- und Merozoiten-Antigene beobachtet werden konnte (Lillehoj et al., 1986).

Die Beteiligung der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen unterscheidet sich, je nachdem ob es sich um eine Primär- oder Sekundärinfektion handelt. Ein Antikörpermangel wirkt sich in erster Linie auf die Kontrolle einer Primärinfektion aus (Rose et al., 1984). Bei einer Sekundärinfektion wird die Rolle von Antikörpern als gering angesehen.

Nach Studien von Wakelin und Rose am Huhn und Nager ist die immunologische Termination einer Primärinfektion mit Eimerien als auch die immunologisch induzierte Termination gegen nachfolgende Infektionen in erster Linie T-Zellen-abhängig (Wakelin und Rose, 1990). Als gesichert kann angesehen werden, dass bei der immunologischen Termination einer Primärinfektion CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine wesentlichere Rolle spielen als CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Rose et al., 1992).

Dies wird auch durch Experimente mit T-Zellen-Verarmung, adoptiven Transfer, Zytokin-Therapie oder Anti-Zytokin Behandlung bestätigt. Sie zeigten, daß CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und assoziierte Lymphokine wie das IFN- $\gamma$ , der Tumor-Nekrose-Faktor und das IL-12, an der Immunität von Primärinfektionen bei *Eimeria vermiformis* und *Eimeria falciformis* beteiligt sind. Des weiteren ist eine Immunität, die über eine sekundäre Kokzidien Gabe hervorgerufen wurde, abhängig von der Aktivität von CD8<sup>+</sup>-Zellen und von IFN- $\gamma$ , wobei aber das IFN- $\gamma$  eine kleinere Rolle spielt (Jenkins, 1998).

Zahlreiche Autoren vertreten die Ansicht, dass Antikörper eine unbedeutende Rolle in der schützenden Immunität spielen, während die zelluläre Immunität, insbesondere in Form von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen eine entscheidende Komponente der schützenden Immunantwort ist (Jenkins, 1998). Studien mit *Eimeria papillata* Infektionen an immunodefizienten Mäusen zeigten, dass NK-Zellen und IFN- $\gamma$  an der Immunität bei Primärinfektionen beteiligt sind (Schito und Barta, 1997).

Abschließend betrachtet ist die Immunität gegenüber einer Eimeriose ein komplexes Geschehen, in dem es noch viele ungeklärte Punkte gibt. Dass sich teilweise widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur finden, hat vielerlei Gründe. So lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse z. B. dadurch erklären, dass die Mechanismen der Immunität sich zwischen den Arten der Eimerien oder zwischen den befallenen Darmabschnitten unterscheiden (Lillehoj und Trout, 1993).

Untersuchungen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen haben gezeigt dass MHC und nicht-MHC Gene die Oozysten-Produktion und die Wirts-Immunantwort bei der Primär- und der Sekundärinfektion von *Eimeria* beeinflussen (Bumstead und Millard, 1987). Zum Beispiel besitzen SC (B<sup>2</sup>B<sup>2</sup>) und TK (B<sup>15</sup> B<sup>21</sup>) Hühner unterschiedliche MHC-Gene, und zeigen verschiedene Grade der Empfänglichkeit gegenüber *Eimeria acervulina*. Bei Untersuchungen waren SC-Hühner gegenüber *Eimeria acervulina* resistenter und weniger empfänglich gegenüber *Eimeria tenella* als die TK-Hühner. Die höhere Resistenz der SC-Hühner wird auf folgende Punkte zurückgeführt. Erstens, dass die SC-Hühner die Fähigkeit besitzen zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion einen größeren Grad von Antigen-spezifischen Antikörper produzieren zu können. Zweitens, dass sie eine T-Zellen-Antwort auf die Eimerien-Antigene aufbauen können, und / oder drittens, dass sie eine größere hemmende Aktivität gegenüber den Kokzidien einleiten können (Yun, Lillehoj

und Choi, 2000).

Experimente haben klar gezeigt, dass unterschiedliche Hühnerrassen, wenn sie einer Infektion mit Eimerien ausgesetzt sind, im Grad der Resistenz variieren (Wakelin und Rose, 1990). Manche Hühnerrassen, die verhältnismässig empfänglich gegenüber einer Primärinfektion von Kokzidien sind, zeigen einen hohen Grad von Resistenz gegenüber Sekundärinfektionen. Wohingegen andere Rassen sowohl bei der Primär- als auch bei der Sekundärinfektion empfänglich sind (Lillehoj und Jenkins, 1989). Die Anfälligkeit gegenüber Kokzidieninfektionen ist selbst innerhalb der Population einer bestimmten Rasse sehr variabel. Erhöhte natürliche Resistenz ist vererbbar und kann durch Selektion erheblich gesteigert werden. Derzeit ist die Wirtschaftlichkeit einer Resistenzzucht im Vergleich zur jetzigen Bekämpfungsmethode noch nicht gegeben (Lillehoj und Ruff, 1987).

### 2.2.3. Molekularbiologische Charakterisierung von ausgewählten *Eimeria tenella* Antigenen

Eimerien weisen neben einer Vielzahl unspezifischer Antigene art-, stamm- sowie stadienspezifische Antigene auf, die bei der Immunität und bei Evasionsmechanismen eine Rolle spielen. Relativ viele Informationen liegen zu Oberflächenantigenen, vor allem von Sporozoiten, vor. Nach Oberflächenmarkierung der Parasiten lassen sich meist zahlreiche Proteine mit Größen zwischen 10 und 300 kDa darstellen. Aus einer Veröffentlichung von Wisner geht hervor, dass *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* und *Eimeria nieschulzi* ähnliche Muster in ihren jodierbaren Oberflächenkomponenten besitzen (Wisner, 1986). Bei einem Vergleich ergibt sich zwischen verschiedenen Arten keine augenfällige Ähnlichkeit im Profil der Oberflächenpolypeptide. Generell scheint jedoch Oberflächenantigenen eine gewisse Immundominanz zuzukommen. Bei einer Oberflächen-Jodierung von *Eimeria acervulina*-Sporozoiten und -Merozoiten sind 60 bzw. 90 % der immundominanten Komponenten der Parasiten jodiert (Jenkins und Dame, 1987). In einigen Fällen wurden Oberflächenantigene näher charakterisiert. Aber auch Antigene aus verschiedenen Organellen, die aufgrund ihrer Funktionen von Interesse sein können, sind bei *Eimeria* relativ gut charakterisiert. In den folgenden Abschnitten werden ausgewählte Antigene von *Eimeria tenella* - unterteilt nach ihrer Lokalisation - vorgestellt:

#### 1. Oberflächen-Antigene

Bei dem Antigen TA4 handelt es sich um ein Oberflächenprotein von *Eimeria tenella* Sporozoiten. Die Neusynthese von dem Protein TA4 beginnt circa 16 - 20 h nach dem Anfang der Oozystenporulation (Brothers et al., 1988).

Bei Versuchen von Gore und Newman wurde festgestellt, dass monoklonale Antikörper (Ptn 7,2A4/4 und Ptn 9,9D12), *in vitro* in der Lage sind, *Eimeria tenella* Sporozoiten zu neutralisieren. Bei einer Untersuchung der Antikörper mittels indirekter Immunofluoreszenz reagierten beide monoklonalen Antikörper mit der Oberfläche von Sporozoiten. Bei ihrem gemeinsamen Zielprotein handelt es sich um das sogenannte TA4 Antigen (Brothers et al., 1988).

Das 25 kD große Protein TA4 wird kurz nach seiner Synthese in ein 17 kD und 8 kD Polypeptid gespalten. Die beiden Polypeptide sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Polypeptide über eine Proteolyse bei der Antigen Isolierung entstehen. Bei der Charakterisierung von dem Antigen TA4 anhand der monoklonalen Antikörper (Ptn 7,2A4/4 und Ptn 9,9D12) fällt folgendes auf: Beide monoklonale Antikörper reagieren mit nicht-reduzierten TA4-Antigen im Immunoblot. Die Reaktion der beiden monoklonalen Antikörper unterscheidet sich bei der Verwendung von denaturierten TA4-Protein und bei rekombinanten TA4-Protein. Dies könnte sich über unterschiedliche Konformationen des TA4-Proteins, z. B. durch eine unvollständige Renaturierung oder durch das Fehlen der Disulfidbrücke, erklären lassen (Brothers et al., 1988).

## 2. Antigene der Refraktilen Körper

Hinweise, dass die Refraktilen Körper funktionell sind, wurden von Danforth und Augustine bei Versuchen mit Geflügel-Eimerien erbracht. Bei ihren Versuchen reagierte ein monoklonaler Antikörper mit einem 23 kDa Antigen, welches auf der Oberfläche und in den Refraktilen Körpern von Sporozoiten lokalisiert ist. Dieser monoklonale Antikörper reduzierte die zelluläre Invasion und die intrazelluläre Entwicklung der Geflügel-Eimerien signifikant (Danforth und Augustine, 1989).

Es wurden weitere Antigene in den Refraktilen Körpern identifiziert (Lillehoj und Trout, 1993). Z. B. das rekombinante Antigen GX3262, dass als  $\beta$ -Galactosidase-Fusionsprotein eine 112 Aminosäuren-Eimerien-Sequenz mit einem Molekulargewicht von 12 kDa besitzt (Miller et al., 1989). In der Sequenz des Antigens GX3262 ist die Sequenz eines weiteren rekombinanten Antigen, dem sogenannten SO7', enthalten (Crane et al., 1991). Bei Versuchen mit 2 Tagen alten Broiler-Küken induzierte eine einzige subcutane Verabreichung von 25  $\mu$ g GX3262, in Form eines Hitze-inaktivierten Totimpfstoffes, einen partiellen Schutz gegen Eimerien-Infektionen (Lillehoj und Trout, 1993). Hühner, die mit GX3262 exprimierenden, rekombinanten *Escherichia coli* immunisiert wurden, waren partiell gegen *Eimeria tenella* und *Eimeria acervulina* Infektionen geschützt (Lillehoj und Trout, 1993).

Ein rekombinantes Sporozoiten-Antigen, welches in der Gruppe um Jenkins unter der Bezeichnung EASZ22 entwickelt wurde, enthält ein Epitop, das zu einem inneren Antigen der Refraktilen Körper gehört. Es wurde in Immunisierungsversuchen mit Hühnern verwendet und führte zu einem signifikanten Schutz gegenüber einer Eimerien-Infektion (Jenkins et al., 1989).

Das SO7' Gen wurde von der Arbeitsgruppe Profous-Juchelka sequenziert und sie entdeckten, dass das Antigen SO7' Epitope für B- und T-Zellen besitzt (Profous-Juchelka et al., 1988). Laut Tennyson ist SO7' hoch immunogen und ruft bei Vögeln während eine natürlichen Infektion eine hohe Antikörper-Antwort hervor (Tennyson, 1994).

Durch Western Blot Analyse wurde festgestellt, dass das Fusionsprotein CheY-SO7' in den Refraktilen Körpern der Sporozoiten lokalisiert ist. Das CheY-SO7'

gehört zur Klasse der B Antigene, diese werden von sieben Arten der Hühner Kokzidien präsentiert. Dies läßt vermuten, dass eine durch sie hervorgerufene Schutzwirkung sich auf fast alle Arten der Hühnerkokzidiose bezieht. Einige der getesteten rekombinanten Proteine, unter ihnen das Fusionsprotein CheY-SO7', demonstrierten im Broiler-Batterie-Modell einen partiellen Schutz gegen die durch *Eimeria tenella* verursachte Kokzidiose. Das Fusionsprotein CheY-SO7' erzeugt ohne den Einsatz von Adjuvantien einen Schutz, d. h. in den Versuchen wurde nur das gereinigte Antigen verwendet. Durch eine intramuskuläre Applikation von CheY-SO7' immunisierte Tiere zeigten deutlich weniger Darmschleimhautläsionen als nicht-immunisierte Tiere. Weitere Ergebnisse zeigten, dass die Rekombinante CheY-SO7' einen Kreuz-Schutz bei den Kokzidienarten *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* und *Eimeria maxima* aufbaut. Der Grad des induzierten Schutzes ist bei allen vier *Eimeria* Spezies ähnlich (Crane et al., 1991).

Indirekte Immunofluoreszenz Antikörper-Tests ergaben, dass alle *Eimeria* Arten, die domestiziertes Geflügel infizieren, die SO7' Epitope besitzen (Vermeulen, 1998). Bei Western Immunoblot Analysen mit Oozysten von sieben unterschiedlichen *Eimeria* Arten mit Kaninchen-SO7'-Antiserum wurde das Antigen SO7' bei allen sieben Eimerien Arten identifiziert. Somit wurde die Annahme, dass das rekombinante Antigen SO7' einen Kreuzschutz gegen mehrere Eimerien Arten hervorrufen kann, bestätigt (Lillehoj und Trout, 1993).

Kopko und seine Mitarbeiter untersuchten die Immunantwort von Hühnern auf eine Verabreichung von SO7', dabei wurden unterschiedliche Impfstrategien getestet (Kopko et al., 2000). Den 1 Woche alten weißen Legehühnern wurde intramuskulär eine nackte DNA (pcDNA3-SO7') oder s.c. ein rekombinantes Antigen (CheY-SO7') oder per os Oozysten von *Eimeria tenella* verabreicht. Von pcDNA3-SO7' wurden 25 - 60 - 100  $\mu\text{g}$  bzw. beim zweiten Versuch 12,5 - 25 - 50  $\mu\text{g}$  injiziert. Einer weiteren Versuchsgruppe wurden 1  $\mu\text{g}$  des gereinigten rekombinanten Antigens CheY-SO7' zusammen mit iCFA im Nackenbereich appliziert. Einer anderen Versuchsgruppe wurden 2500 Oozysten von *Eimeria tenella* per os verabreicht. Zu den zwei letzten Impfstrategien wurde jeweils eine Negativ-Kontrollgruppe mitgeführt. Die Behandlung wurde nach 14 Tagen wiederholt und 2 Wochen nach der zweiten Applikation erfolgte eine Belastungsinfektion mit 2.500 Oozysten von *Eimeria tenella*. 7 Tage nach der Belastungsinfektion wurden die Tiere getötet, und der Blinddarm der Tiere nach den von Johnson und Reid beschriebenen Kriterien ausgewertet (Johnson und Reid, 1970). Das Körpergewicht der Tiere wurde während der ganzen Versuchsdauer kontrolliert. Die Tiere der Versuchsgruppe mit der s.c. Applikation von rekombinanten Antigen CheSO7' zeigte im gleichen Größenbereich wie die dazugehörige Negativ-Kontrollgruppe Darmläsionen. Auch die tägliche Gewichtszunahme unterschied sich nicht signifikant von der Negativ-Kontrollgruppe. Die s.c. Verabreichung von dem rekombinanten Antigen CheSO7' erwies sich als nicht schützend für eine Belastungsinfektion. Ein signifikanter Schutz wurde bei der Verabreichung von pcDNA3-SO7' mit einer Konzentration von 25  $\mu\text{g}$  und bei der oralen Oozysten-Gabe beobachtet (Kopko

et al., 2000).

Die oben genannten Tierversuche mit dem Antigen SO7' führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Kopko erklärt sich das Fehlen einer schützenden Wirkung in seinen Versuchen durch die unterschiedlich verwendeten Hühnerrassen und das er im Gegensatz zu Crane eine Adjuvants eingesetzt hat (Kopko et al., 2000).

### 3. Antigene der Mikronemen

Mikronemen enthalten ein Gemisch von Antigenen. Die Sporozoiten von *Eimeria tenella* besitzen mindestens 15 Komponenten zwischen 20 - 220 kD (Kawazoe et al., 1992). In dem Cluster zwischen 94 und 110 kD findet sich eine Antigenfamilie mit offensichtlich adhäsiven Eigenschaften. Zumindest zeigen die Proteine thrombospondinähnliche Motive sowie Sequenzen, die konservierten Regionen in anderen Molekülen mit adhäsiven Eigenschaften weitgehend entsprechen (Tomley et al., 1991). Es besteht weiterhin Verwandtschaft mit den Circumsporozoiten-Antigenen sowie dem TRAP-Antigen von *Plasmodium falciparum*, dem eine Rolle bei Zell-zu-Zell-Interaktionen und bei der Zytoadhärenz zugeschrieben wird. Mikronemen-Antigene der genannten Antigenfamilie aus *Eimeria tenella* reagieren auch kreuz mit analogen Proteinen von *Eimeria acervulina* und *Eimeria maxima*, und auf DNA-Ebene besteht eine 70 % Homologie zwischen einem *Eimeria maxima* Klon und einem der oben erwähnten *Eimeria tenella* Gene (Pasamontes et al., 1993).

Aus Sporozoiten oder Merozoiten gereinigte Mikronemenproteine von den Apikomplexa *Sarcocystis tenella*, *Eimeria nieschulzi* und *Eimeria tenella* haben in allen drei Fällen gezeigt, dass die Protein Komposition der Organellen mit nur 2 oder 3 Haupt-Polypeptiden relativ einfach ist. Ein immundominantes Mikronemen-Antigen, das sogenannten Etmic-1 (früher Etp 100), ist eine Hauptkonstituente der Mikronemen. Etmic-1 besitzt eine separate Domäne, welche auch z. B. beim TRAP-Antigen von *Plasmodium falciparum*, beim Komplement-Komponenten-Faktor 2 und beim Hühner-Cartilago-Matrix-Protein gefunden wird. Eine zweite Domäne von Etmic-1 besitzt starke Ähnlichkeit mit einer konservierten Region, die in einer anderen Gruppe mit adhäsiven Eigenschaften vorkommt, einschließlich der  $\alpha$ -Untereinheiten von einigen Integrinen, dem Komplement-Faktor Bb und einer Anzahl von Glykoproteinen der extrazellulären Matrix. Antiseren, die gegen ein rekombinantes Fusionsprotein von Etmic-1 gerichtet sind, reagierten kreuz mit Polypeptiden von 100 kDa in *Eimeria maxima* und *Eimeria acervulina*. Vermutlich ist das Antigen in den 3 Parasiten gleich aufgebaut. Zum anderem reagierten die Antiseren schwach mit luftgetrockneten Sporozoiten, das deutet darauf hin, dass sich ein Teil des Proteines auf der Oberfläche des Parasiten befinden muß. Der Besitz von typischen N-terminalen Signal-Sequenzen und desweiteren von an gesättigten Resten gebundene, hydrophobische Regionen läßt erwarten, dass das Antigen über das Endoplasmatische Retikulum zu den Mikronemen gelangt, und so als integrales Membranprotein fungiert. Dies deutet auf eine Rolle der Mikronemen beim Transport von Antigenen auf die Oberfläche der Zelle hin (Tomley et al., 1991).

Diese wichtige Rolle konnte bei Studien mittels Immuno-Fluoreszenz beobachtet werden. Das Etmic-1 wandert von den Mikronemen zur Parasiten-Oberfläche und wird dort neu verteilt. Dadurch wird die Wirtszelle empfänglicher für eine Invasion. Auf frisch befallenen Zellen ist freies Etmic-1 im Bereich des Parasiteneintritts zu sehen (Vaughan et al., 1996).

Untersuchungen, die an einem weiterem Mikronemenprotein namens Etmic-2 (50 kD) durchgeführt wurden bestätigen die aufgeführten Studienergebnisse. Das Etmic-2 wird kurz vor der Invasion an die Oberfläche der Sporoziten verlagert. Während der Invasion ist das Etmic-2 im Bereich des Parasiteneintritts konzentriert zu finden. Nach der Sekretion in den extrazellulären Raum wandert das Etmic-2 zur Oberfläche der infizierten Wirtszelle. Auf der Wirtszellenoberfläche verteilt es sich ungleichmäßig. Die Verbindung des Etmic-2 mit der Wirtszelle ist kurzlebig. Eine Stunde nach der Infektion ist das Etmic-2 nicht mehr auf der Oberfläche der Wirtszelle nachweisbar. Wie sich das Etmic-2 mit der Sporoziten Oberfläche und der Oberfläche der infizierten Zelle verbindet ist nicht klar, da dieses Protein keine klassische transmembrane Region besitzt (Tomley et al., 1996).

Die funktionelle Rolle von Etmic-2 ist unbekannt. Etmic-1 und Etmic-2 besitzen keine charakteristischen Sequenzmotive, die auf eine potentielle Wechselwirkung von Ligandenbindungen deuten. Wie auch immer das Etmic-2 ist in den Mikronemen vorhanden. Während der Wirtsinvasion wird es schnell und reichlich auf die Wirtszellenmembran abgesondert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des Mikronemenproteins bei der Interaktion zwischen Parasiten und Wirt hin (Tomley et al., 1996).

#### **2.2.4. Vakzinierung gegen Kokzidiose**

Der Wunsch, eine Vakzine gegen *Eimeria* zu entwickeln, hat die aktiven Recherchen zur Klärung der Mechanismen der schützenden Immunität und zur Identifizierung von immunogenen Antigenen vorangetrieben. Die Entwicklung einer effizienten Kokzidienvakzine ist langsam, da noch viele Fragen bezüglich der schützenden Immunität unbeantwortet sind. Teilweiser Schutz konnte bei jungen Hühnern durch eine Vakzinierung mit nicht-lebend Parasiten-Antigenen oder rekombinanten Antigenen induziert werden. Obgleich der partielle Schutz induziert durch rekombinante Antigene real ist, besitzt dieser nicht genügend Stärke um mit der prophylaktischen Chemotherapie, die zur Zeit Standardmethode ist, zu konkurrieren (Lillehoj und Trout, 1993).

Einige der oben erwähnten rekombinanten Antigene sind gute Kandidaten für einen zukünftige rekombinante Vakzine. Da kein anderes Kriterium verfügbar ist als die Wirksamkeit, ist die Hauptaufgabe, den richtigen Kandidaten auszuwählen. Dazu werden überwiegend in-vivo Testungen der individuellen Gene, und deren Kombinationen mit praktischen Vektorsystemen benötigt (Vermeulen, 1998).



## 2.3. *Salmonella* live carrier vaccine

In der Bundesrepublik Deutschland ist gemäß der Hühner-Salmonellen-Verordnung<sup>1</sup> eine Impfung gegen Salmonellen (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*) in Aufzuchtbetrieben vorgeschrieben. Da Salmonellen zu den fakultativen intrazellulären Bakterien gehören, werden besonders Lebendimpfstoffe, da sie in der Lage sind zellvermittelte Immunmechanismen zu induzieren, eingesetzt.

Als Lebendvakzine wurden Mutanten auf der Grundlage attenuierter *Salmonella typhimurium* und *Salmonella enteritidis* entwickelt. Eine Anzahl von attenuierten Mutanten von *Salmonella* interagieren mit dem lymphoiden Gewebe des Darmes ohne eine systemische Erkrankung auszulösen (Cardenas et al., 1994). Somit ist eine orale Immunisierung von Maus oder Huhn mit avirulenten *Salmonella* Stämmen gewöhnlich nicht mit einer Suppression, sondern mit einer Stimulierung des Immunsystems assoziiert (Curtiss III et al., 1993).

Basierend auf den Ergebnissen und den Erfolgen einer oralen Immunisierung bei anderen intestinalen Parasiten wurde damit begonnen Antigen-enthaltende Gene von *Eimeria* in Lebend-Vektoren, wie z. B. Geflügelpocken-Virus oder Salmonellen zu exprimieren.

Die Salmonellen sind als Vektor für Fremdartigene besonders geeignet, da sie aufgrund ihres Pathogenese-Mechanismus in einer besonderen Art und Weise mit den immunkompetenten Zellen Kontakt aufnehmen. Nach einer oralen Aufnahme und Besiedlung des Dünndarmes durchdringt *Salmonella typhimurium* das intestinale Epithelium und besiedelt die Peyersche Platten. Für *Salmonella typhimurium* sind die M-Zellen der Hauptweg in die Peyerschen Platten. Die M-Zellen sind eine spezialisierte Zellpopulation, welche die Peyersche Platten überschichtet. Sie sind bei der Antigen Probenaufnahme aus dem Darmvolumen in die Lymphfollikel beteiligt.

Von den Peyerschen Platten wandert *Salmonella typhimurium* in die mesenterialen Lymphknoten. Von dort erfolgt eine Streuung der Bakterien über die Lymphgefäße in das zirkulierende System, was zu einer vorübergehenden Bakteriämie führt.

Die Bakterien werden schnell durch Phagozytose in Milz und Leber aus dem Blut entfernt. Ein großer Anteil der Bakterien wird durch die daran beteiligten Zellen getötet (Mittruecker, 2000).

Dieses erste Stadium der *Salmonella* Infektion, welches normalerweise nur ein paar Stunden andauert, geht in eine Phase die mehrere Tage andauert über. Sie ist gekennzeichnet durch eine intrazelluläre Vermehrung der Bakterien, was einen Anstieg des Bakterientiters in Leber und Milz zur Folge hat.

Überschreitet der Bakterientiter den kritischen Wert für das Überleben einer *Salmonella* Infektion (bei Mäusen circa  $10^8$  KBE) wird die Infektion für das Tier unkontrollierbar. Die Konsequenzen sind eine sekundäre Bakteriämie, ein endotoxischer Schock und ein rascher Tod.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, das *Salmonella typhimurium*

---

<sup>1</sup>Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn vom 11. April 1994, Bundesgesetzblatt I S. 770

sowohl phagozytierende als auch nicht-phagozytierende Zellen besiedelt und in ihnen überleben kann. Während einer Infektion ist das intrazelluläre Wachstum essentiell, z. B. sind Mutanten die nicht in der Lage sind in Wirtszellen zu überleben, in vivo stark geschwächt (Mittrüecker, 2000).

Gelingt es dem Tier den Bakterientiter unter dem kritischen Wert zu halten ist die nachfolgende Phase durch eine Milzvergrößerung und einer generalisierten durch Makrophagen vermittelten Immunsuppression charakterisiert. Die Phase kann eine bis mehrere Wochen andauern, abhängig vom Mäusestamm und vom *Salmonella typhimurium* Stamm (Mittrüecker, 2000).

Das letzte Stadium der Infektion wird charakterisiert durch die Ausbildung erworbener Immunitätsantworten, die eine Elimination von *Salmonella typhimurium* und eine lang anhaltende Immunität gegenüber Reinfektionen ermöglichen (Mittrüecker, 2000).

Eine große Anzahl von Veröffentlichungen behandelt die Funktion der T-Zellen in der Immunität gegenüber *Salmonella* Infektionen, und es herrscht Übereinstimmung über die essentielle Bedeutung der T-Zellen bei den primären und hauptsächlich bei den sekundären Immunantworten. Die funktionelle Rolle der unterschiedlichen T-Zellen-Untereinheiten während den verschiedenen Stadien der Infektion ist noch nicht geklärt. Über die Mechanismen mit denen die T-Zellen die Infektion bekämpfen sind nur begrenzte Informationen vorhanden. Die Situation ist durch die Vielfalt der verwendeten *Salmonella* Stämme bzw. Mäusestämme und durch die unterschiedlichen Infektionsrouten in den zahlreichen Experimenten kompliziert. Dies führt zu teilweise widersprüchlichen Schlußfolgerungen (Mittrüecker, 2000).

Obwohl die Infektion von Hühnern mit *Salmonella typhimurium* in einigen Details untersucht wurde, ist die relative Rolle der zellvermittelten und humoralen Immunantworten bei der Bekämpfung von *Salmonella typhimurium* noch unklar (Zhang Barber et al., 1999). Die Kenntnisse der Immunologie bei *Salmonella* Infektionen von Geflügel sind rudimentär und viel geringer als das Wissen von vergleichbaren Infektionen bei Mäusen. Die Entwicklung von Lebendimpfstoffen für Geflügel muss noch größtenteils erprobt werden (Zhang Barber et al., 1999).

Für die Entwicklung von rekombinanten Salmonellen Stämmen sind die Ergebnisse der Gruppe um J. Flynn wichtig, da sie zum ersten Mal von CTL-Antworten gegen Antigene, welche von einem rekombinanten Salmonellenstamm exprimiert wurden, berichten (Cardenas und Clements, 1992). Dies wurde durch eine Anzahl von Untersuchungen bestätigt, die zeigten, daß die Induktion einer CTL Antwort durch ein von *Salmonella* exprimiertes, rekombinantes Parasiten-Antigen vergleichbar ist wie die durch das Original-Parasiten-Antigen (Jenkins, 1998).

Z. B. induzierte ein attenuierter *Salmonella typhimurium* Stamm mit rekombinanten Plasmodium Circumsporozoiten Antigen bei Mäusen eine CD8<sup>+</sup>-CTL Antwort gerichtet gegen das Parasiten-Antigen. Die Ergebnisse der oralen Verabreichung der rekombinanten *Salmonella* deuten darauf hin, dass die Induktion von CTL auf die intrazelluläre Lokalisation der *Salmonella* in den Makrophagen zurückzuführen ist. Die *Salmonella* Mutante überlebt in den Makrophagen und kann so intrazellulär das rekombinante Parasiten-Antigen exprimieren. Dies führt vermutlich zu einer Verarbeitung des Antigens und zu dessen Präsentation zusammen mit MHC-I-Antigenen, das wiederum eine

Induktion der CTL zur Folge hat (Aggarwal et al., 1990).

Die Untersuchungen von McSorley und ihre Mitarbeiter kamen zu einem anderen Ergebnis bezüglich der Rolle von CTL. *Salmonella* Infektionen sind von knockout Mäusen mit Defekten von T-Zellen-Rezeptor- $\gamma\delta$  oder  $\beta_2$ -Mikroglobulin kontrollierbar. Dies deutet darauf hin, dass die MHC-Klasse-I begrenzten T-Zellen bzw. die  $\gamma\delta$ -Zellen keine essentielle Rolle spielen (McSorley und Jenkins, 2000). Dagegen sind knockout Mäuse mit Defekten von T-Zellen-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ , des MHC-Klasse-II-Rezeptor und des IFN- $\gamma$ -Rezeptor nicht in der Lage eine Infektion mit einem avirulenten *Salmonella typhimurium* zu beherrschen. D. h. die knockout Mäuse sterben an einer *Salmonella* Infektion die normalerweise nicht letal ist. Folglich ist die Induktion von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für eine Kontrolle der Salmonellen Infektion notwendig (McSorley und Jenkins, 2000).

Diese Schlußfolgerung stimmt mit der Beobachtung von Comoy und seinen Mitarbeiter überein, dass *Salmonella typhimurium* die Makrophagen in der Milz befällt und eine T<sub>h</sub>1-Antwort induziert (Comoy et al., 1997).

Der schützende Effekt durch eine Impfung mit einem attenuierten *Salmonella* Stamm ist begrenzt, wenn die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vor der Belastungsinfektion mit einem virulenten Stamm verarmen (McSorley und Jenkins, 2000). Desweiteren führt eine Verarmung von T<sub>h</sub>1-Zytokinen wie z. B. IFN- $\gamma$ , Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$  und IL-12 zu einer Verstärkung der Sekundärinfektion. Die Notwendigkeit einer Aktivierung der T<sub>h</sub>1-Zellen ist eventuell auf die intrazelluläre Lokalisation der *Salmonella* in vivo zurückzuführen (McSorley und Jenkins, 2000).

McSorley stellt durch die Ergebnisse der Versuche mit knockout Mäusen fest, dass eine effektive Kontrolle einer primären Infektion mit einem attenuierten *Serovar Typhimurium* wesentlich von Signalen von T-Zellen über eine Kostimulation mit CD28 abhängig ist, und dass sie komplett unabhängig von B-Zellen stattfindet. Im Gegensatz dazu ist die durch eine Impfung induzierte Resistenz gegenüber einem virulenten *Salmonella* wesentlich abhängig von der Anwesenheit von Antikörpern. Dieser qualitative Unterschied der Notwendigkeit von Antikörpern bei virulenten und attenuierten *Salmonella* ist eventuell durch die unterschiedlichen Wachstumsraten der avirulenten bzw. virulenten Bakterien in vivo erklärbar,

Um die schnelle Vermehrung der virulenten Bakterien aufzuhalten, ist die Anwesenheit von Antikörpern im Serum notwendig. Somit verbleibt genug Zeit für eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen und eine anschließende Makrophagen-Aktivierung. Attenuierte Salmonellen vermehren sich in vivo mit einer reduzierten Rate, und gewähren so die Zeit, die eine generelle effektive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Antwort benötigt (McSorley und Jenkins, 2000).

Berndt und Methner weichen in ihren Schlußfolgerungen von den Ergebnissen von McSorley ab. Sie führten Untersuchungen zur Charakterisierung der T-Zellen-Infiltrate in unterschiedlichen Geweben nach einer oralen Immunisierung und Infektion von Eintagsküken mit *Salmonella typhimurium* durch. Die Ergebnisse zeigen, dass CD8<sup>+</sup>-T<sub>c</sub>R1<sup>+</sup>-Zellen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Infektion von *Salmonella* behandelten jungen Tieren spielen, da der Anteil dieser Zellen im peripheren Blut sowohl nach einer Infektion als auch nach einer Immunisierung signifikant ansteigt (Berndt und Meth-

ner, 2001). Außerdem war ein Anstieg von CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut besonders bei den infizierten Tieren zu beobachten. Dies weist eventuell auf die Helferfunktion dieser Zellpopulation für die Aktivierung und Proliferation der  $\gamma\delta$ -T-Zellen hin, welche für die Abwehr der *Salmonella* Infektion benötigt werden (Berndt und Methner, 2001).

Interessanterweise steigt nicht nur die Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T<sub>c</sub>R1<sup>+</sup>-Zellen sondern auch die von CD4<sup>+</sup>- und T<sub>c</sub>R2<sup>+</sup>-Zellen an. Dieser Anstieg wird im Caecum von Eintagsküken nach einer Immunisierung und Infektion mit *Salmonella typhimurium* beobachtet. Vermutlich sind die CD4<sup>+</sup>-Zellen für die Immunglobulin-Produktion im Darm notwendig. Sie unterstützen wahrscheinlich die CD8<sup>+</sup>-T<sub>c</sub>R1<sup>+</sup>-Zellen.

Bis jetzt gibt es zahlreiche Spekulationen über die Funktion der CD8<sup>+</sup>-T<sub>c</sub>R1<sup>+</sup>-Zellen. Die Beantwortung der Frage ob die CD8<sup>+</sup>-T<sub>c</sub>R1<sup>+</sup>-( $\gamma\delta$ )-Zellen in der Lage sind einen effektiven Schutz bei Hühnern gegen *Salmonella* Infektionen zu induzieren, ist das Thema von weiteren Untersuchungen (Berndt und Methner, 2001).

Sasai und seine Mitarbeiter stellten bei ihren Untersuchungen an Küken an ihrem 16. Lebenstag fest, dass eine *Salmonella enteritidis* Infektion kurz nach der oralen Verabreichung der *Salmonella* einen signifikanten Wechsel in der Subpopulation der Caecal-Tonsillen induzierte. Ein Tag nach Verabreichung sank der Anteil an CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Gruppe mit einer Dosis von  $1 \times 10^9$  KBE (hohe Dosierung) und in der Gruppe mit  $1 \times 10^6$  KBE (niedrige Dosierung) im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe ab. Bei den Tieren mit der hohen Dosis stieg der Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten 4 Tage nach der Applikation signifikant an. Der Anteil an IgG<sup>+</sup>-B-Lymphozyten stieg erst 6 Tage nach Verabreichung signifikant bei den Tieren mit hoher und niedriger Dosis an. Bei den Tieren mit niedriger Dosis war IgM<sup>+</sup> signifikant geringer als wie bei den Tieren mit hoher Dosis. Die Wissenschaftler schlussfolgern, dass die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten einen Immunglobulin-Klassen-Wechsel während der frühen Phase der *Salmonella enteritidis* Infektion induzieren (Sasai et al., 2000).

Die Rolle der Antikörper bei der Immunität gegenüber *Salmonella* Infektion ist bisher noch wenig geklärt. Sicher ist nur das nach einer Impfung neutralisierende Antikörper benötigt werden (McSorley und Jenkins, 2000).

Mittrücker bestätigt dies und stellte bei Infektionen von Mäusen mit *Salmonella typhimurium* fest, dass diese in einer auffälligen Antikörper-Antwort sowohl gegen die nicht-Protein-Antigene wie z. B. LPS als auch gegen Protein-Antigene resultieren. Die Rolle der Antikörpern in den unterschiedlichen Stadien der Infektion ist trotz einer großen Anzahl an Veröffentlichungen noch nicht vollständig aufgeklärt (Mittrücker, 2000).

In einem Versuch wurde 4 Tage alten Küken einmalig ein *Salmonella typhimurium* Stamm oral in einer Konzentration von circa  $10^8$  KBE verabreicht. Die Tiere wurden wöchentlich serologisch untersucht. Höchste Konzentrationen der Antikörperklasse konnten drei bis vier Wochen nach der Inokulation gemessen werden, hohe IgG-Titer waren auch noch am Ende des Versuches, also 4 Monate nach Verabreichung, sichtbar (Hassan et al., 1990).

Die Rolle der humoralen Immunität von Vögeln bei der Bekämpfung von *Salmonella enteritidis* wurde von Desmidt und seinen Mitarbeitern untersucht. Den 4 Wochen alten Hühnern wurde oral eine Dosis von  $10^9$  KBE *Salmonella enteritidis* verabreicht. Bei ei-

nem Teil der Tiere wurde hormonell eine Burssektomie durchgeführt. Die Ergebnisse der burssektomierten Tiere lassen vermuten, dass noch andere Mechanismen als die Antikörper bei der Abwehr der *Salmonella enteritidis* Infektion nützlich sind. Die Eliminierung von *Salmonella enteritidis* hängt nur teilweise von der humoralen Immunität ab. Die intestinalen, humoralen Antworten scheinen effektiver bei der Eliminierung von *Salmonella enteritidis* zu sein als die systemische, humoralen Antworten (Desmidt et al., 1998).

Es wurden zahlreiche Untersuchungen mit rekombinanten *Salmonella* durchgeführt. Nachfolgend sind drei beispielhaft aufgeführt:

Hopkins und seine Mitarbeiter verabreichten Mäusen oral mit einer Dosis von  $10^8$  KBE einen attenuierten *Salmonella typhimurium* Stamm. Der Salmonellen Stamm verfügt über ein Plasmid mit dem codierenden Fragment des Hepatitis B Antigen. Durch eine einmalige Applikation wurde eine lang anhaltende (16 Wochen) IgG-Antwort gerichtet gegen das Salmonellen Antigen LPS und gegen das Hepatitis B Antigen induziert (Hopkins et al., 1995)

Bei oraler Verabreichung von  $10^9$  KBE eines rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stammes an Mäuse konnten Serum IgG und Speichel IgA Antworten, sowohl gegen die rekombinanten als auch gegen die *Salmonella* Antigene, beobachtet werden. Der gegen die Salmonellen gerichtete Antikörper-Titer war deutlich höher als der gegen die rekombinanten Antigene gerichtete Titer. Eine zweite orale Applikation 7 Wochen später erhöhte, sowohl den gegen die Salmonellen Antigene als auch gegen die rekombinanten Antigene gerichteten IgA-Titer. Bei IgG stieg nur der gegen die rekombinanten Antigene gerichtete Titer signifikant an (Hajishengallis et al., 1996).

Ein rekombinanter *Salmonella typhimurium* Stamm (SL3261), welcher ein Schistosoma oder Clostridien Antigen exprimiert, wurde Mäusen einmalig in einer Konzentration von circa  $10^7$  KBE intravenös oder intraperitoneal injiziert. Der *Salmonella* Stamm induzierte eine  $T_h1$ -Antwort assoziiert mit IL-4, IFN- $\gamma$  und IgG2a-Antikörpern, die gegen die beiden rekombinanten Antigene gerichtet waren. Beim Einsatz von CFA wurde ein Antwort beobachtet, die durch eine Expression sowohl von IL-4 und IFN- $\gamma$ , als auch von streng spezifischen IgG1- und IgG2a-Antworten charakterisiert war. Das Adjuvans wurde subcutan oder intraperitoneal mit einem Volumen von 0,2 ml verabreicht (Comoy et al., 1997).

Bei der Entwicklung einer lebenden, attenuierten *Salmonella* Vakzine sollte beachtet werden, dass die Induktion eines Schutzes abhängig ist vom Alter der Tiere und vom Applikations-Zeitplan (Hassan und Curtiss III, 1994). Bei der Impfung von Hühnern mit einem avirulenten *Salmonella* Stamm war eine Applikation in der zweiten und vierten Lebenswoche effektiver als die am ersten und vierzehnten Lebenstag. Die geringere Effektivität der Impfung am 1. Lebenstag kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Küken zum diesem Zeitpunkt weniger immunkompetent sind. Die einmalige Impfung führte zu schlechteren Ergebnissen als die doppelte Impfung. Die zweite Verabreichung verstärkt möglicherweise die Gedächtniszellantworten und führt somit zu einem höherem Antikörpertiter. Frühere Versuche mit dem gleichem avirulenten *Salmonella* Stamm hatten gezeigt, dass eine schützende Wirkung bei Hühnern dosisabhängig ist (Hassan und Curtiss III, 1994). Bei Mäusen wurde eine große Variabilität in der Minimaldosis von Antigenen, welche zur Stimulierung von spezifischen Antikörpern benötigt wird,

festgestellt (Fayolle et al., 1994). Vielleicht trifft dies auch bei den Hühnern zu.

Ein rekombinanter, attenuierter *Salmonella typhimurium* Stamm wurde Mäusen verabreicht und die ausgelösten Antikörper-Antworten wurden gemessen. Die Immunantworten der Tiere gegenüber dem rekombinanten Antigen fielen unterschiedlich aus. Diese Unterschiede sind vermutlich auf eine unterschiedliche Resistenz der Mäuse gegenüber dem Lebendvektor zurückzuführen. Die unterschiedliche Resistenz der Tiere wird durch genetischen Faktoren bestimmt. Das bedeutet die Induktion von Antikörpern gegen ein rekombinantes Antigen ist unter anderem von genetischen Faktoren abhängig (Fayolle et al., 1994). Bei Mäusen beeinflusst der *ity*-Locus (immunity to typhimurium) die Empfänglichkeit der Tiere gegenüber Salmonelleninfektionen. Insbesondere wird die initiale Vermehrung der Salmonellen in den Makrophagen beeinflusst. Beim Huhn werden auf Grund experimentell nachgewiesener beträchtlicher Unterschiede in der Resistenz verschiedener Linien gegenüber *Salmonella typhimurium* und *Salmonella enteritidis* "ity" ähnliche Gene vermutet (Selbitz, 1994).

Bei der Immunität von Mäusen gegenüber *Salmonella* wurden weitere Unterschiede beobachtet. Eine Vakzinierung von resistenten Mäusen mit attenuierten *Salmonella* induziert einen Schutz gegenüber einer Sekundärinfektion mit einer letalen Dosis an virulenten Bakterien. Dieser Schutz ist passiv durch Serum auf empfängliche Mäuse übertragbar. Eine Vakzinierung von empfänglichen Mäusen mit attenuierten *Salmonella* induziert einen Schutz, jedoch ist dieser nur mit Serum und T-Zellen erfolgreich übertragbar (Mittrüecker, 2000). Folglich beeinflusst die Immunlage der Mäuse die Art der ausgebildeten Immunantwort.

Wenn auch Versuche mit knockout Mäusen wertvolle Ergebnisse erbringen, müssen diese vorsichtig interpretiert werden, da eine Infektion mit attenuierten Stämmen von *Salmonella typhimurium* nicht zwingend eine Infektion mit einem virulenten Wildstamm reflektiert (Mittrüecker, 2000).

Zusammenfassend sprechen folgende Gründe für die Wahl eines attenuierten *Salmonella typhimurium* Stammes als Carrier für die *Eimeria tenella* Antigene: Der *Salmonella typhimurium* Stamm kann eine starke B- und T-Zell-Antwort induzieren, beide Komponenten sind bei der Immunität gegen Eimerien beteiligt. Wird der attenuierte Salmonellenstamm oral verabreicht, kann dies neben der systemischen Immunantwort zu einer lokalen Antwort des Intestinalen Immunsystems führen. Dies ist für eine erfolgreiche Immunisierung bei Eimerien notwendig. Entspricht die attenuierte *Salmonella* Mutante einer Lebendvakzine des Huhnes, könnte nicht nur ein Impfschutz gegen Eimerien aufgebaut werden, sondern auch gegen die Hühner-Salmonellose. Ein oraler Lebendimpfstoff ist billiger in der Produktion und einfacher zu verabreichen als ein zu injizierender Totimpfstoff (Roland et al., 1999).

Zur Verfügung steht der *Salmonella typhimurium* Impfstoff *Zoosaloral H* des Impfstoffwerkes Dessau-Tornau, ein Abkömmling des virulenten Wild Stammes M415. Dabei handelt es sich um eine auxotrophe Mutante für Histidin und Adenin (Barbezange et al., 2000). Diese Auxotrophie wurde bei der Entwicklung eines Spezialmediums <sup>2</sup> ausgenutzt, dass eine schnelle und sichere Unterscheidung des *Zoosaloral H* von *Salmonella*

---

<sup>2</sup>Bovisaloral-Zoosaloral-Diagnostikum, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, 06855 Roßlau

*dublin* bzw. *Salmonella typhimurium* Wildstämmen ermöglicht.

Frühere Arbeiten beschreiben *Zoosaloral H* als eine Impfstamm mit guter Kolonisierung und einer immunogenen Wirkung in den Tieren. Zum Beispiel sind bei einer oralen Verabreichung von  $5 \times 10^7$  KBE *Zoosaloral H* der Kropf, das Jejunum und Caecum nach 3 h und die Leber nach 24 h besiedelt (Barbezange et al., 2000). *Zoosaloral H* erzielte nach einer zweimaligen Impfung von Eintagsküken deutliche Schutzeffekte gegen eine homologe Infektion (Springer, 1996).

Zur Verbesserung des Nachweises des Impfstammes wurde der rekombinante Impfstamm mit einem Lux-Operon von *Vibrio fischeri* (Phänotyp=Leuchtend) markiert. Durch diese genetische Markierung ist eine Kolonie des rekombinanten Impfstammes ohne weitere Einzeltestungen erkennbar (Beyer und Boehm, 1996).

## 2.4. Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, rekombinante *Salmonella typhimurium* Stämme zu konstruieren, die heterologe Antigene aus *Eimeria tenella* exprimieren. Die Wirkung dieser Stämme wurde in Tierversuchen serologisch untersucht.

Die Wahl fiel auf *Eimeria tenella*, da es sich um eine hoch pathogene Art der Hühner-Eimerien handelt, und bereits eine Vielzahl von interessanten Antigenen charakterisiert und kloniert worden sind. Als relevante Antigene wurden nach einer Literaturrecherche das TA4, SO7 und Etmic ausgewählt, siehe Tabelle 2.1.

Ausgehend von einer cDNA aus einer *Eimeria tenella* Sporozoiten mRNA sollten die Antigene in *Escherichia coli* exprimiert werden. Anschließend sollte eine Umklonierung in ein Plasmid, das eine kontinuierliche Expression der Eimerien-Antigene in Salmonellen erlaubt, erfolgen. Als *Salmonella* Stamm sollte der Impfstamm *Zoosaloral H* eingesetzt werden, dieser sollte mit den Konstrukten transformiert werden. Mit den transformierten Salmonellen, die die *Eimeria tenella* Antigene mit einem speziellen Aminosäurenrest produzierten, sollten Tierversuche stattfinden. Die daraus gewonnenen Proben sollten in einem ELISA auf Immunglobulin A und G untersucht werden, um die Wirkung der rekombinanten Antigene auf den humoralen Anteil des Immunsystems zu testen.

Tabelle 2.1.: Charakterisierung von den ausgewählten *Eimeria tenella* Antigenen

Name	Entwicklungsstadium	Zelluläre Lokalisation	Kommentare	GenBank
TA4	Sporozoiten	Oberfläche	gegen TA4 gerichtete Antikörper sind in vitro in der Lage <i>E. tenella</i> Sporozoiten zu neutralisieren	M21004
Etmic	Sporozoiten; Merozoiten	Mikronemen	Antisera von einem rekomb. Fusionsprotein reagierten kreuz mit Polypeptiden von <i>E.maxima</i> und <i>E.acervulina</i>	M73495
SO7	sporulierte Oozyste; Sporozoiten	Refrakter Körper	mit SO7 immunisierte Tiere zeigten deutlich weniger Läsionen der Darmschleimhaut nach einer Belastungsinfektion	X15898