

# 5. Diskussion

Die Proteine TA4, 3Etmic und SO7 von dem Parasiten *Eimeria tenella* wurden ausgehend von einer cDNA aus Sporozoiten mRNA in *Escherichia coli* exprimiert. Die TA4-, 3Etmic- und SO7-cDNA wurde zusammen mit Anteilen des Plasmidsvektors pQE-30 in ein Plasmid, das eine kontinuierliche Expression der drei Eimerien-Proteine in Salmonellen erlaubt, umkloniert. Der Impfstamm *Zoosaloral H* wurde mit dem Konstrukt transformiert, und produzierte daraufhin TA4, 3Etmic und SO7, welche N-terminal ein Peptid bestehend aus sechs Aminosäuren Histidin besitzen. Mit den transformierten Salmonellen und mit dem aus *Escherichia coli* affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteinen wurden Tierversuche mit Hühnern durchgeführt. Die aufgereinigten Proteine wurden im Gegensatz zu den oral verabreichten rekombinanten Salmonellen zusammen mit FA subcutan appliziert. Ausgewertet wurde der Titer von spezifischen Antikörpern in Serum bzw. Gallenflüssigkeit der behandelten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dazu wurde ein ELISA entwickelt.

## 5.1. Molekularbiologische Charakterisierung von den *Eimeria tenella* Antigenen TA4, 3Etmic und SO7

### 5.1.1. Amplifikation

Die in den PCRs eingesetzten Primer wurden anhand der Sequenzen der ausgewählten *Eimeria tenella* Gene aus der Genbank konstruiert.

Bei dem TA4-Fragment wurden bei den Bindungsstellen der Primer die Ergebnisse von Brothers berücksichtigt (Brothers et al., 1988). Die Arbeitsgruppe um Brothers arbeitete mit einer 1267 bp langen Einzelstrang DNA, welche an ihrem 3'-Ende eine 553 bp lange, uncodierte Region besaß. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass für die Expression von TA4 der ca. 700 bp großen Abschnitt am 5'-Ende der Einzelstrang DNA ausreicht. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer amplifizierten das ca. 700 bp große Fragment am 5'-Ende von TA4.

Das circa 2000 bp große Etmic1-Fragment (Tomley et al., 1991) wurde in die zwei Teilstücke, 3Etmic und 5Etmic, aufgeteilt. Das 1081 bp große Fragment 3Etmic entspricht ungefähr der 3'-Hälfte des Etmic1-Fragmentes, während das 5Etmic mit einer Größe von 993 bp sich am 5'-Ende von Etmic1 befindet. Dieser Schritt wurde zur Vermei-

derung von Komplikationen durchgeführt, die bei der Expression eines großen Fragmentes auftreten können. Aus zeitlichen Gründen wurde nur mit einem der zwei Teilstücken des Etmic1-Fragmentes weitergearbeitet. Ausgewählt wurde das 3Etmic, da es an seinem 5'-Ende die Sequenz für das "thrombo-spondin like motif" inklusive seiner partiellen Wiederholung besitzt (Tomley et al., 1991).

Zuerst wurde für die Amplifikation von dem Fragment SO7 ein 5'-Primer<sup>1</sup> verwendet, welcher unmittelbar am 5'-Ende der veröffentlichten Sequenz (Liberator et al., 1989) seine Bindungsstelle besaß. Die Amplifikation des SO7-Fragmentes mit diesem Primer gelang nicht, als Ursache wurde die Signalsequenz am 5'-Ende der SO7-Sequenz angesehen. Um diese zu umgehen wurde ein neuer 5'-Primer (SO7-F6) erstellt, welcher erst seine Bindungsstelle circa 100 Basen vom 5'-Ende des Antigen SO7 entfernt hatte. Mit dem neuem Primer gelang die Amplifikation eines 635 bp großen SO7-Fragmentes.

### 5.1.2. Klonierung

Die Klonierung der relevanten *Eimeria tenella* Gene in den Vektor pBlueskript erfolgte, da dieser im Gegensatz zu dem Vektor pQE-30 mit dem Wirt XL1-Blue eine Nachweisbarkeit des Inserts mittels  $\alpha$ -Komplementation erlaubt. Diese Methode ermöglichte eine schnelle und einfache Bestimmung von Insert positiven Klonen. Durch die Verwendung von pBlueskript als Vektor konnte das Angebot einer automatischen Sequenzierung der Inserts in einem Fremdlabor genutzt werden. Da die Ligation mit dem Vektor pBluescript im Gegensatz zu den anderen Ligationen mit "glatten Enden" erfolgte, wurde eine Behandlung des Vektors mit alkalischer Phosphatase und der PCR-Fragmente mit einer Kinase notwendig.

Positive Klone wurden zum automatischen Sequenzieren außer Haus gegeben. Die bis auf wenige Basen mit der Originalsequenz übereinstimmenden Inserts von TA4-2, 3Etmic und SO7 wurden in den Vektor pQE-30 umkloniert. Eine Besonderheit des pQE-30 ist die "6xHis-tag" codierende Sequenz, die entweder stromaufwärts (5') oder stromabwärts (3') zur Klonierungsregion liegt. Sie bedingt eine Verknüpfung von sechs Histidin-Aminosäuren mit dem Expressionsprotein, über diese sechs Aminosäuren kann das Protein mittels Metall-Affinitätschromatographie mit einer Nickel-Verbindung aufgereinigt werden. Weitere Informationen können dem Handbuch für "high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins"<sup>2</sup> entnommen werden. Bei den pQE-30-Konstrukten von TA4-2, 3Etmic und SO7 lag die "6xHis-tag" codierende Sequenz stromaufwärts, somit befanden sich die sechs Histidin-Aminosäuren bei den rekombinanten Proteinen N-terminal. Da sich der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue ideal für die Lagerung und Vermehrung von pQE-Plasmiden eignet, wurde er bei diesen Arbeiten verwendet.

Für die Expression der rekombinanten Eimerien-Antigene im *Salmonella typhimurium* Stamm war ein Wechsel von pQE-30 zu dem Vektor pMMB207.1 notwendig. Ein großer Nachteil bei dem Einsatz von Lebendbakterien als Antigenträger ist die Instabilität der Expression des Fremd-Antigenes in vivo (McSorley et al., 1997). Ei-

---

<sup>1</sup>5' CTC GCC CCA ACT TTT TCC 3'

<sup>2</sup>Qiagen GmbH, D-40724 Hilden

ne nicht kontrollierte Expression von hohen Mengen eines Fremd-Proteines in Bakterien durch "multi-copy" Plasmide endet oft in einen schnellen Verlust des Plasmides oder des exprimierenden Genes (aus den Bakterien) (McSorley et al., 1997). Das Plasmid pMMB207.1 liegt in den Zellen nur in einer geringen Anzahl vor, diese niedrige Kopiezahl bedingt eine geringe Menge an exprimierenden Fremd-Antigenen. (Morales et al., 1991). Zusätzlich besitzt der pMMB207.1 Vektor auf seinem Plasmid eine "Partition-Region". Diese "Partition-Region" bedingt eine gleichmäßige Verteilung des Plasmides auf die Tochterzellen, dadurch ist die Gefahr eines Verlustes des Plasmides geringer, d. h. der pMMB207.1 Vektor ist dadurch stabiler als der pQE-30 Vektor. Die niedrigere Expressionsstärke des pMMB207.1 Vektors wurde für eine erhöhte Stabilität des Plasmides bewußt in Kauf genommen.

Das Ergebnis der Kotreisolierung (siehe Kapitel 4.4) gibt Hinweise über die Länge des Expressions-Intervalles des rekombinanten Antigens TA4-2 bzw. über die Stabilität des Plasmides. Die Expression von TA4-2 konnte bei einem rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stamm mittels Western Blot nachgewiesen werden, welcher aus einer Kotprobe, die sechs Tage nach oraler Applikation des Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 gezogen wurde, reisoliert wurde.

Cardenas untersuchte den Antikörpertiter von Serum und Dünndarm bei oral behandelten Mäusen. Er stellte fest, dass vermutlich ein entscheidendes Kriterium für die Entwicklung einer Immunantwort auf ein Fremdanigen, nicht die Verweildauer des Vektors im Gewebe ist, sondern die Anfangskonzentration des Antigens, die dem GALT präsentiert wird (Cardenas et al., 1994) Das wiederum würde bedeuten das die Stabilität des Plasmides nicht entscheidend für die Induktion von Antikörpern ist. Der verwendete Vektor pMMB207.1 wurde aufgrund seiner Stabilität für den Versuch ausgewählt.

Durch die genetische Markierung der Impfstoff-Kandidaten mit dem Lux-Operon von *Vibrio fischeri* wurde der Nachweis der rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stämme wesentlich erleichtert.

### 5.1.3. Expression

Die Expression des Antigens SO7 konnte nur über einen Western Blot überprüft werden, und nicht wie bei den Antigenen TA4-2 und 3Etmic über ein mit Coomassie Blau ausgewerteten SDS-PAGE, da sowohl bei den pQE-30 und pMMB207.1 Konstrukten in *Escherichia coli*, als auch bei den Salmonellenklonen, Vektor- bzw. Bakterienstamm spezifische Banden im Größenbereich des Antigens SO7 vorlagen.

Im Western Blot wurden monoklonale Anti-His-Antikörper zum Nachweis der "6xHis-tagged proteins" TA4-2, 3Etmic und SO7 eingesetzt. Die Antikörper sind gegen die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Ser-(His)<sub>4</sub> gerichtet. Die rekombinanten Proteine TA4-2, 3Etmic und SO7 besitzen diese Aminosäuresequenz N-terminal. Die Expression der drei rekombinanten *Eimeria tenella* Proteine konnte mittels Western Blot sowohl in den transformierten *Escherichia coli* Stämmen als auch in den transformierten Salmonellenstämmen nachgewiesen werden. Die Blockierung von nicht spezifischen Bindungen der Membran mit dem RGS-Antikörper bzw. mit dem konjugierten, sekundären Antikörper war erfolgreich, da so gut wie keine Hintergrundreaktionen auf den Membra-

nen zu beobachten sind. Einigen Proben weisen auf der Membran außer den Banden im Größenbereich der rekombinanten Proteine noch weitere Banden auf. Bei höher liegenden zusätzlichen Banden kann es sich um Multimere der rekombinanten Proteine handeln. Bei Banden, die sich unterhalb der Größe des rekombinanten Proteines befinden, liegen vermutlich abgebaute oder unvollständig synthetisierte, rekombinante Proteine vor. Treten die Banden sowohl bei den rekombinanten Proben als auch bei den mitgeführten Kontrollen auf, so kann es sich um Wirts- oder Vektorproteine handeln, an die sich die Antikörper unspezifisch anlagern können.

Aufgrund der Konstruktion des Expressionsplasmides wurden 3Etmic, TA4-2 und SO7 zusammen mit sechs Histidinen am N-Terminus exprimiert, und konnten so mit Hilfe von Ni-Chelat-Affinitätschromatographie isoliert werden. Für die Aufreinigung wurden die *Escherichia coli* Konstrukte mit pQE-30 als Vektor verwendet. Die Ausbeute von isoliertem SO7 war deutlich geringer als die von TA4-2 und 3Etmic. Dieser Unterschied kann eventuell auf den folgend beschriebenen Kontrollmechanismus der Expression zurückgeführt werden.

*Escherichia coli* Stämme mit einer *lacI<sup>q</sup>* Mutation, wie z. B. der verwendete XL1-Blue produzieren genug "lac" Repressor um eine Transkription effizient zu blockieren. Durch die Zugabe von IPTG werden die "lac Repressor Proteine" inaktiviert, so kann dann durch die RNA-Polymerase der Wirtszelle eine Transkription der vom Promoter flußabwärts liegenden Sequenz erfolgen. Dieser Kontrollmechanismus kann bei der Expression von nicht toxischen Proteine verwendet werden. Ist das exprimierte Protein jedoch toxisch für die Zellen, kann eine "unkontrollierte" Expression vor der Induktion mittels IPTG dazu führen, dass entweder die Kultur nur schwach wächst, oder dass es zur einer Selektion von Verlust Mutanten kommt, welche schneller wachsen als Bakterien mit dem korrektem Plasmid. Beide Möglichkeiten haben eine geringe Expression des rekombinanten Proteins zur Folge. Es kann nicht ausgeschlossen werden das es sich bei dem rekombinanten Protein SO7 um ein toxisches Protein handelt.

Ein direkter Vergleich der Expressionsstärke von dem rekombinanten Protein SO7 und TA4-2 bzw. 3Etmic war durch den Wegfall der SDS-PAGE Auswertung bei SO7 nicht möglich (siehe Anfang des Kapitels). Beim Expressionsnachweis der rekombinanten Salmonellen durch den Immunoblot fiel das Antigen SO7 durch ein gegenüber TA4-2 und 3Etmic schwächer ausgeprägtes Signal auf (siehe Abbildung 4.14 auf S. 63). Dies deutet auf eine geringere Expression des rekombinanten Proteines SO7 hin.

Damit die isolierten Proteine, welche später im Tierversuch bzw. im ELISA eingesetzt werden, dem Parasiten-Protein bezüglich der Proteinstruktur gleichen, ist eine Isolierung unter nativen Bedingungen vorteilhaft. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mußte unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidin, 8 M Harnstoff) durchgeführt werden, da zuvor erfolgte Aufreinigungen unter nativen Bedingungen nur eine geringe Ausbeute an rekombinanten Proteinen ergaben. Eukaryontische Proteine, welche intrazellulär in *Escherichia coli* exprimiert werden, werden häufig in Form von unlöslichen "inclusion bodies" (Einschlußkörper) abgelegt. Starke Denaturantien wie z. B. 6 M Guanidin oder 8 M Harnstoff lösen die "inclusion bodies" komplett, und ermöglichen so eine Bindung zwischen dem "6xHis-tagged Protein" und der Ni-NTA-Matrix. Um die isolierten Proteine zu regenerieren bzw. damit sie sich wieder in ihre native Form

”zurückfalten” können, wurde eine Dialyse durchgeführt.

Imidazol wurde zur Erhöhung der Reinheit der Proteinisolierung in geringen Konzentrationen zu den Puffern dazugegeben. Durch seine Histidin ähnliche Strukturformel lagert sich das Imidazol an die Ni-NTA-Matrix an. Nur Proteine, welche spezifisch an die Ni-NTA-Matrix binden, sind in der Lage das Imidazol zu verdrängen. Somit sind die Bindungsstellen für unspezifische Proteine durch das Imidazol blockiert, und sie können durch die Waschschriffe problemlos entfernt werden. Die Bindung der spezifischen Proteine an die Säule wurde durch den niedrigen pH-Wert des Elutionspuffers gelöst. Bei pH-Werten von 4,5 - 5,3 verliert das Histidin seine Fähigkeit an die positiv geladenen Säule zu binden. Die Aufreinigung der rekombinanten Antigene TA4-2, SO7 und 3Etmic unter dem Einsatz starker Denaturantien ergab eine gute Ausbeute an relativ reinen Proteinen.

Bei der Verwendung von starken Denaturantien verändern die isolierten Proteine während ihrer Aufreinigung ihre räumliche Struktur. Diese Veränderung kann irreversibel sein, so das eine Renaturierung, z. B. in Form einer Dialyse, nicht oder nur teilweise zur nativen Form des Proteins führt. Diese neue räumliche Struktur der isolierten Proteine kann zur Folge haben, dass bei einem Tierversuch das Immunsystem des Tieres auf eine andere Art und Weise von dem denaturiert, gereinigten Protein angesprochen wird als wenn das native Protein verabreicht worden wäre. Zum Beispiel könnten Antikörper gebildet werden, die gegen die neue räumliche Struktur der denaturiert, gereinigten Proteine gerichtet sind und somit eine neue Domäne übernommen haben, die nicht bei dem nativ aufgereinigten Protein vorhanden ist.

Den Versuchstieren wurde zur Bildung von Antikörpern u. a. rekombinante Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten oral verabreicht. D. h. die so behandelten Tiere bilden Antikörper, die gegen das Expressionsprotein, das mit einem nativen Originalprotein des Parasiten vergleichbar ist, gerichtet sind. Im ELISA wurde für den Nachweis der induzierten Antikörper das denaturiert, gereinigte Antigen verwendet. Der ELISA kann nur dann funktionieren, wenn das rekombinante Antigen nicht durch die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte Aufreinigung so verändert wurde, dass die Domänen der im Versuch gebildeten Antikörper nicht mehr passen.

Wird diese Schlussfolgerung auf die Ergebnisse des ELISAs übertragen, müssen ”negative” Ergebnisse hinterfragt werden. Denn ”negativ” kann somit bedeuten, es sind keine Antikörper vorhanden, oder die vorhandenen Antikörper passen nicht zu dem im ELISA eingesetzten Antigen.

Also kann trotz des ”negativen” ELISA Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden, dass die Küken nach der oralen Gabe der rekombinanten Salmonellen spezifische Antikörper gegen die rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic und SO7 gebildet haben. Zudem wenn im ELISA der Nachweis von Antikörpern, welche mit isolierten, rekombinanten Proteinen beim Tier induziert wurden gelang, dagegen der Nachweis von Antikörpern hervorgerufen durch die Expression von rekombinanten Salmonellen nicht.

Diese Schlußfolgerung wird durch die folgenden Arbeiten von Brothers und Miller unterstützt. Brothers reinigte rekombinantes TA4-Protein aus *Escherichia coli* für einen ELISA mit monoklonalen Antikörpern (Ptn 7.2A4/4 und Ptn 9.9D12) auf. Bedingt durch eine Unlöslichkeit des rekombinante TA4-Proteins, mußte dies zuerst mit

Hilfe von Harnstoff gelöst werden, um dann durch eine Renaturierung wieder in seine aktive Form überführt zu werden. Die Immunreaktionsfähigkeit des renaturierten, rekombinanten TA4-Protein betrug im ELISA 10 - 30 %, relativ gemessen zu einem TA4-Antigen, welche aus *Eimeria tenella* gereinigt wurde. Unerwarteterweise reagierte nur noch einer der zwei monoklonalen Antikörper mit dem rekombinanten TA4-Protein im ELISA. Dies erklärten sich die Autoren durch einen Konformationsunterschied zwischen dem aus *Eimeria tenella* gereinigtem Antigen, und dem rekombinanten, renaturiertem TA4-Antigen. Die unterschiedlichen Konformationen der Proteine können durch zahlreiche Faktoren bedingt werden, wie z. B. inkomplettes Renaturieren, falsche Disulfid-Brücken, usw. (Brothers et al., 1988). Später arbeitete Miller mit dem Expressionsprodukt GX3262, dem eine cDNA aus sporulierten Oozysten von *Eimeria tenella* zugrunde lag. Im Tierversuch wurde ein Wochen alten Küken gereinigtes, rekombinantes Antigen subcutan verabreicht. Die Aufreinigung des rekombinanten Antigens erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Die Wirkung der unterschiedlichen Immunisierungsprotokolle wurde nach einer Belastungsinfektion mit *Eimeria tenella* anhand der caecalen Läsionen beurteilt. Von den neun Präparationen, die getestet wurden, zeigten nur drei ein positives Ergebnis. Diese Widersprüchlichkeit in der Aktivität der unterschiedlichen Präparationen kann laut den Autoren das Ergebnis einer "unrichtigen" Faltung des Moleküls während der Aufreinigung sein, oder ein Hinweis darauf, dass das Molekül instabil ist (Miller et al., 1989). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von Brother und Miller unterstützen die Annahme, dass natives Originalprotein und denaturiert isoliertes Protein unterschiedliche Immunantworten induzieren, obwohl mit den isolierten Proteinen vor der Applikation eine Renaturierung durchgeführt worden ist.

Hierzu finden sich in der Literatur unterschiedliche, sich zum Teil widersprechende Angaben. Tomley untersuchte außer dem Antigen Etmic1 ein weiteres Mikronemen Protein, das sogenannte Etmic2. Ein Pellet aus Etmic2 exprimierenden *Escherichia coli* wurde mit einer 6 M Guanidin Lösung resuspendiert, und unter denaturierenden Bedingungen an einer Ni-Affinitätssäule gereinigt. Das Protein wurde anschließend gegen PBS dialysiert. Mit dem aufgereinigten rekombinanten Etmic2 wurden Kaninchen immunisiert. In einem Western Blot mit *Eimeria tenella* Merozoiten und dem gewonnen spezifischen Kaninchen-Antiserum konnten Banden beobachtet werden. D. h. mit einem denaturiert isolierten, rekombinanten Antigen induzierte Antikörper reagieren im Western Blot mit Eimerien "Original-Antigenen", also nativen Proteinen. (Tomley et al., 1996).

Das Schlüssel-Schloß-Prinzip der Reaktion zwischen Antigen und Antikörper ist ein komplexes Geschehen, dass durch viele Faktoren beeinflusst wird. Zum Beispiel durch die Methode der Gewinnung des Antigens. Die Abklärung, ob die negativen Ergebnisse des ELISAs ihre Ursache in der Aufreinigung des Antigens besitzen, ist z. B. durch eine biochemische Untersuchung der Proteine möglich oder durch die Verwendung von Original-Parasiten-Proteinen im ELISA.

## 5.2. Tierversuch

Attenuierte rekombinante *Salmonella typhimurium* Stämme können in Form einer Lebenvakzine zur Immunisierung von Versuchstieren mit rekombinanten Antigenen eingesetzt werden. Durch ihre Fähigkeit abortive Infektionen zu erzeugen, erfolgt die Stimulation humoraler und zellulärer Immunantworten, die sowohl gegen das rekombinante Antigen als auch gegen die Salmonellen-Antigene gerichtet sind. Da Salmonellen ebenso wie die Oozysten von Eimerien den Darm als Eintrittspforte bei der Infektion benutzen, und sich u. a. in der Leber ansiedeln, erschienen sie als Vektor für die Expression von *Eimeria tenella*-Antigenen besonders geeignet. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete *Salmonella typhimurium* Stamm *Zoosaloral H* ist ein doppelt attenuierter Impfstamm, der nach oraler Verabreichung in der Lage ist, in die Milz und Leber vorzudringen und dort zu persistieren. Auf der eine Seite soll die Mutation nicht reversibel sein, auf der anderen Seite soll der Stamm eine Immunantwort auslösen (Curtiss III et al., 1993). Die Entwicklung von definiert attenuierten *Salmonella*-Stämmen führte in den letzten Jahren zu einer zunehmenden und erfolgreichen Nutzung dieser Bakterienstämme als Träger für unterschiedliche virale, bakterielle und auch parasitäre Antigene.

Arbeiten der Gruppe von Professor Lucius haben gezeigt, dass eine Applikation rekombinanter Proteine durch Lebend-Salmonellen schützende Immunantworten hervorruft, während eine Impfung mit den entsprechenden, in *Escherichia coli* hergestellten Proteinen erfolglos war (Mueller-Schollenberger et al., 2001). Entscheidend für die Wirkung der Salmonellen ist wahrscheinlich die Tatsache, dass sie ausgeprägte T-Zell-Antworten des  $T_h1$ -Typus induzieren (Comoy et al., 1997).

Zur Ermittlung des immunogenen Potentials, der in dieser Arbeit entwickelten rekombinanten *Salmonella typhimurium*-Konstrukte wurden unterschiedliche Versuchsansätze in zwei Studien (Tierversuch Budapest und Stuttgart) durchgeführt. Im Tierversuch Budapest wurden den Tieren oral die rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidaten TA4 und 3Etmic verabreicht.

Eine subcutane Applikation der rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic und SO7 erfolgte im Tierversuch Stuttgart, teilweise kombiniert mit der oralen Verabreichung der *Salmonella typhimurium*-Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7. Weitere orale Applikationsintervalle mit den rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7 wurden im Tierversuch Stuttgart getestet.

Die Versuchsgruppen aus den zwei Studien unterscheiden sich in den folgenden Punkten:

1. rekombinantes Antigen (TA4-2, 3Etmic oder SO7)
2. Applikation (subcutan, oral oder kombiniert)
3. Applikationsintervall

In Tierversuch Budapest wurden den Versuchsgruppen 1 und 2 die rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidaten TA4 bzw. 3Etmic am 1., 14. und 21. Lebenstag oral verabreicht.

Da der *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidat SO7 zum Zeitpunkt des Tierversuches Budapest noch nicht vorlag wurde die dreimalige orale Applikation des Impfstoff-Kandidaten SO7 beim Tierversuch Stuttgart nachgeholt. Die entsprechende Versuchsgruppe ist die Gruppe 1 im Tierversuch Stuttgart. Durch die wiederholte orale Verabreichung des rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stammes wurde versucht, den Titer der Antikörper-Antworten der Tiere zu erhöhen.

Bei den Versuchsgruppen 2 und 3 aus dem Tierversuch Stuttgart wurden die Empfehlungen des Herstellers von *Zoosaloral H* bei der oralen Applikation der rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7 berücksichtigt.

Die subcutane Verabreichung der rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic und SO7 (Versuchsgruppe 6, 7 und 10 im Tierversuch Stuttgart) wurde durchgeführt, da für den ELISA "Positivkontrollen" benötigt wurden. Durch die wiederholte, subcutane Applikation der rekombinanten Antigene kombiniert, mit CFA, wurde versucht eine maximale Antikörper Antwort bei den Tieren zu induzieren.

Die Proben der Tiere aus Versuchsgruppe 8 und 9 aus dem Tierversuch Stuttgart und die Versuchsgruppe 4 aus dem Tierversuch Budapest fungierten bei der Auswertung der Immunantworten als "Negativkontrollen".

Bei den Versuchsgruppen 4 und 5 aus dem Tierversuch Stuttgart wurden zwei Applikationsformen kombiniert, d. h. die Tiere wurden am 14. Lebenstag mit dem rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidaten TA4 oder SO7 oral behandelt, und am 35. Lebenstag wurde ihnen das entsprechende rekombinante Antigen subcutan verabreicht. Durch die subcutane Applikation wurde versucht den Titer der induzierten Antikörperantworten zu erhöhen.

Beim Tierversuch Budapest wurde die Versuchsgruppe 5 mit einem handelsüblichen Antikokzidium behandelt. Diese Versuchsgruppe diente zur Abklärung, ob und wenn ja inwieweit die Immunantwort der Tiere durch die Verabreichung von Antikokzidien beeinflusst wird. Sie kann im weiteren Sinne als eine zusätzliche "Negativ-Kontrollgruppe" angesehen werden.

Bei beiden Tierversuchen wurden Stallkontrollen durchgeführt (Versuchsgruppe 11 bei Tierversuch Stuttgart bzw. 3 bei Tierversuch Budapest). Diese Tiere wurden als Indikator für Störungen, deren Ursache außerhalb des Versuches liegen, mitgeführt.

### **5.2.1. Immunantwort auf Salmonellen**

Der Impfstoff *Zoosaloral H* wurde als Vektor für die rekombinanten *Eimeria tenella* Antigene eingesetzt. Die rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstoff-Kandidaten präsentieren dem Immunsystem der Versuchstiere neben ihren Salmonellen-Proteinen auch das jeweilige rekombinante Antigen. Durch diese Kopplung wirken sich Faktoren, die die Immunantwort auf die Gabe der Salmonellen beeinflussen, auch automatisch auf die Immunreaktion gegenüber den rekombinanten Antigenen aus.

Die orale Applikation der drei Impfstoff-Kandidaten erfolgte am 1., 14. und 21. Lebenstag der Küken, oder nur einmalig am 14. Lebenstag. Bei der Wahl der Applikationstermine wurden die Empfehlungen des Herstellers des verwendeten zugelassenen, attenuierten *Salmonella typhimurium* Impfstammes berücksichtigt.

Die Applikation am Schlupftag der Küken erfolgte um eine frühzeitige Kolonisation des Darmes zu erreichen (Linde et al., 1990). Das orale Applikationsvolumen betrug am ersten Lebenstag nur 0,2 ml anstatt 0,5 ml, da die Kropfgröße der Eintagsküken berücksichtigt wurde.

*Zoosaloral H* ist im Organismus nicht vermehrungsbegrenzt und kann zu einer Persistenz und Ausscheidung in den ersten 2 Wochen nach der Immunisierung führen. Die Persistenz des Impfstammes *Zoosaloral H* wurde an Eintagsküken untersucht. Der Impfstamm war nach oraler Applikation von  $9 \times 10^8$  KBE sowohl in Kloakentupfern als auch in Leber, Milz und Blinddarm nachweisbar. Der letztmalige Nachweis war am 9. bzw. 10. Tag nach der Impfstoffgabe. Diese Ergebnisse zur Persistenz und Ausscheidungsdauer des Impfstammes wurden im Rahmen von Praxiserprobungen mit über 5000 Küken der Mastichtung sowie Küken und Junghennen der Legerichtung bestätigt. Weitere Informationen über Verträglichkeit und Wirksamkeit können der "Produktinformation *Zoosaloral H*" entnommen werden (Impfstoffwerk, 1997). Die Stärke einer Immunantwort ist u. a. von der Persistenz des verwendeten attenuierten Salmonellenstammes abhängig. Außer der Persistenz beeinflussen der genetische Hintergrund und die Natur der Attenuierung der unterschiedlichen *Salmonella* Impfstämme die Immunantworten tiefgreifend (Kohler et al., 2000). Dunstan und seine Mitarbeiter entdeckten hierzu weitere Faktoren. Sie verglichen sechs unterschiedlich attenuierte Mutanten von rekombinanten *Salmonella typhimurium* Impfstämmen, welche das C-Fragment des Tetanus-Toxin exprimierten. Fünf der sechs Stämme welche die Peyerschen Platten besiedelten, induzierten vergleichbare Immunantworten. Die Mutante mit der schwächsten Besiedlung der Peyersche Platten induzierte die niedrigste Antwort und war nicht schützend. Unterschiede in der Besiedlung der Milz zeigten keine Korrelation zur Immunisierungsstärke. Dunstan folgerte, das die Immunisierungsstärke nicht mit der relativen Invasivität korreliert, sondern mit der Besiedlung der Peyerschen Platten.

Beim Tierversuch Budapest wurde die Ausscheidung der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und 3 Etmic untersucht (siehe Kapitel Material und Methoden, S. 45). In den Kotproben konnte noch 14. Tage nach der oralen Applikation rekombinanter *Salmonella typhimurium* nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt). Die Ergebnisse der Kotreisolierung geben Hinweise über die Persistenz und Ausscheidung des Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4, und über die Stabilität der Expression des rekombinanten Antigenes (siehe Kapitel Ergebnisse, S. 59).

Zur Abklärung ob die Expression der rekombinanten *Eimeria tenella* Antigene die Vermehrungsrate des attenuierten *Salmonella* Stammes nachteilig beeinflussen, wurde die Generationszeit der Salmonellenstämme untersucht. Die Generationszeiten von den Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 bzw. 3Etmic und dem Salmonellen-Kontrollstamm Zlux207.1 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Hierfür wurde bei den zu untersuchenden Bakterienstämme die optischen Dichte der Bakteriensuspensionen über eine Zeitspanne von 4 Stunden gemessen (Daten nicht aufgeführt).

Beim Tierversuch Budapest wurden die Tiere in Anlehnung an die Ergebnisse von Cárdenas und Clements (Cardenas und Clements, 1993) am 1., 14. und 21. Lebenstag geimpft. Durch die mehrmalige Infektion der Tiere mit Salmonellen im Abstand von drei Wochen wurde versucht, die humorale Immunantwort zu verstärken. Hassan (Hassan

und Curtiss III, 1994) stellte bei oralen Vakzinierungsversuchen mit einem avirulentem *Salmonella typhimurium* Stamm fest, dass die Induktion eines Schutzes vom Alter der Tiere und vom Vakzinierungsschema abhängig ist. Eine Vakzinierung in der zweiten und vierten Lebenswoche war effektiver bezüglich des Schutzes der Tiere bei einer Belastungsinfektion, als eine Vakzinierung am zweiten und vierzehnten Lebenstag der Tiere. Vermutlich spielte das Alter der Tiere zum Impfzeitpunkt eine Rolle, denn Küken sind an ihrem ersten Lebenstag weniger immunkompetent als in ihrer zweiten Lebenswoche. Hassan (Hassan und Curtiss III., 1996) stellte bei weiteren Versuchen fest, dass eine Impfung in der ersten und dritten Lebenswoche weniger effektiv ist, als eine in der zweiten und vierten Lebenswoche. Als Ursache, außer der geringeren Immunkompetenz der Küken in der ersten Lebenswoche, können maternale Antikörper in Frage kommen. Salmonellen-Impfungen von Hühnern induzieren lang verbleibende *Salmonella*-spezifische Antikörper, welche ins Ei abgegeben werden, und als Immunglobulin G im Eigelb nachweisbar sind. Der Titer von maternalen IgG und IgA war bei den Nachkommen-Küken in der ersten Lebenswoche am höchsten, und fiel dann mit steigendem Alter ab. Bei einer Impfung in der ersten Lebenswoche reduzieren die *Salmonella*-spezifischen maternalen Antikörper die Impfwirksamkeit. Die Versuche von Hassan ergaben, dass Impfungen in der zweiten und vierten Lebenswoche, unabhängig vom Vorhandensein oder Fehlen von maternalen Antikörpern, einen exzellenten Schutz aufbauten.

Bei den Tierversuchen Stuttgart und Budapest wurden die Salmonellen aus folgendem Grund am ersten Lebenstag oral verabreicht. Eine Verabreichung am ersten Lebenstag der Tiere, die sogar noch vor der ersten Nahrungsaufnahme erfolgt, hat den Vorteil, daß sich noch keine Darmflora bei den Tieren entwickelt hat. So können sich die Impfsalmonellen ohne den störenden Einfluss einer Konkurrenzflora im Darm ansiedeln.

Die Induktion einer systemischen humoralen Immunantwort gegen *Salmonella Enteritidis* wurde bei der Impfung von Hühnern mit *Zoosaloral H* untersucht. Die Tiere wurden am 1., 14. und 21. Lebenstag oral mit einer Dosis von  $10^8$  KBE geimpft. Vor und nach den Impfterminen wurden Blutproben gezogen und auf Antikörper gegen *Salmonella* Antigen LPS untersucht. Die orale Impfung von Küken mit *Zoosaloral H* induzierte eine systemische humorale Immunreaktion. Die Tiere reagierten auf jede Impfung mit einem weiteren Anstieg der IgG-Titer gegen LPS von *Salmonella typhimurium*. Nach der ersten Impfung lagen die Titerwerte circa ein log<sub>2</sub>-Stufe über dem Wert vor der Impfung (Bauerfeind et al., 1996).

Im Tierversuch Budapest konnten sowohl im Serum als auch in der Gallenflüssigkeit der Tiere gegen LPS gerichtete Antikörper nachgewiesen werden. Somit induzierte die orale Applikation am 1, 14. und 21. Lebenstag eine Salmonellen-spezifische Immunantwort auf die Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und 3Etmic. Das Fehlen der Immunantwort bei dreimaliger Gabe des Salmonellen-Impfstoff-Kandidat SO7 im Tierversuch Stuttgart ist wahrscheinlich auf den Tierversuch selbst zurückzuführen, da das gleiche Applikationsintervall bei dem TA4 bzw. 3Etmic Konstrukt im Tierversuch Budapest zu einer Immunantwort führte. Hierbei muß berücksichtigt werden das der Tierversuch Stuttgart und Budapest sich bezüglich des Tiermaterials unterscheiden. Der maternale Immunstatus der Küken aus Tierversuch Stuttgart kann das Fehlen der gegen LPS gerichteten Antikörper verursacht haben (siehe Ende Kapitel 2.2.1). Oder der rekombi-

nante Salmonellen-Impfstoff-Kandidat SO7 verfügt nicht über das gleiche Potential wie die Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und 3Etmic. Z. B. könnte durch die Klonierung die Vitalität des Impfstoff-Kandidaten SO7 vermindert worden sein. Hinweis dafür gibt die niedrige Expressionsrate von dem rekombinanten Protein SO7, die sowohl im Western Blot als auch bei der Aufreinigung des Proteines beobachtet wurde.

Die Ursache für das Ausbleiben der Immunantwort auf das rekombinante Antigen SO7 kann durch einen weiteren Tierversuch, bei dem alle drei Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten parallel getestet werden, und durch eine Untersuchung der Generationszeit, abgeklärt werden.

Bei den dreimal oral geimpften Tieren im Tierversuch Stuttgart waren die Ergebnisse bezüglich der gegen LPS gerichteten Antikörper negativ. Auch die einmalige Applikation am 14. Lebenstag der Tiere konnte keine LPS-spezifischen Antikörper hervorrufen. Weder die einmalige Applikation der Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7, noch die des Kontrollstammes Zlux207.1 führte zu einem positiven ELISA-Ergebnis.

Die Tierversuche Stuttgart und Budapest unterscheiden sich nicht nur bezüglich des Tiermaterials, sondern auch bezüglich des Zeitpunktes der Probenentnahme. Die Probenentnahme erfolgt beim Tierversuch Stuttgart am 35. Lebenstag der Tiere und beim Tierversuch Budapest am 60. Lebenstag. Ob dies eine Erklärung für die unterschiedliche ELISA-Ergebnisse der zwei Tierversuche ist, kann vielleicht durch Beantwortung der folgenden Frage geklärt werden. Wie lange kann ein induzierter Antikörper-Titer im Tier nachgewiesen werden?

Hassan (Hassan et al., 1990) untersuchte die Antikörper-Antwort von Hühnern, welche experimentell mit *Salmonella typhimurium* infiziert wurden. Dazu wurde ein indirekter ELISA entwickelt, mit dem der Titer von gegen LPS gerichteten IgG im Serum der Tiere gemessen werden konnte. Der IgG-Titer stieg nach der Verabreichung bis zur vierten Woche markant an, und war auch noch vier Monate später nachweisbar. Desweiteren zitiert Mockett (Mockett und Rose, 1986) das Lee et al. (1981) davon berichteten, dass ihnen der Nachweis von gegen *Salmonella typhimurium* gerichteten IgA aus Gallenflüssigkeit über einen Zeitraum von 6 Wochen bei infizierten Hühnern gelungen ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Probenentnahme in den Tierversuchen Stuttgart und Budapest zu einem Zeitpunkt erfolgt ist, an dem gebildete Antikörper noch vorhanden sein müßten.

Aus einer Veröffentlichung von Roland und seine Mitarbeiter geht deutlich hervor, dass zwischen dem induzierten Antikörper-Titer und der schützenden Wirkung kein eindeutiger Zusammenhang besteht. Sie verabreichten Hühnern einen rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stamm, welcher *Escherichia coli* O78-LPS exprimiert. Die Applikation erfolgte am 1. Lebenstag durch Besprühen in einer Inhalationsbox und am 14. Lebenstag oral. Die zweimalige Verabreichung führte zur Induktion von Serum-Immunantworten gegenüber dem *Salmonella typhimurium* und dem *Escherichia coli* O78. Zur Auswertung der Serum-Immunantwort wurde ein ELISA verwendet. Obwohl eine strenge Korrelation zwischen der robusten Antikörper-Antwort und dem geringen Auftreten von Läsionen bei der anschließend durchgeführten Belastungsinfektion festgestellt wurde, gab es ein paar Tiere, die keine messbare Antikörper-Antwort im ELISA besaßen und trotzdem geschützt waren. Desweiteren traten ein paar Tiere auf, deren An-

tikörper-Antwort im ELISA messbar war, während ihre Ergebnisse bei der Belastungsinfektion denen der unbehandelten Tiere entsprachen (Roland et al., 1999). Diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von rekombinanten *Salmonella* zur Vakzinierung von Tieren noch relativ am Anfang steht.

### 5.2.2. Immunantwort auf die relevanten *Eimeria tenella* Antigene

Die erworbene Immunität spielt beim Schutz gegen Eimerien eine wichtige Rolle. Sowohl die Beendigung einer Erstinfektion, als auch der Schutz gegenüber Sekundär - Infektionen unterliegen einer strengen immunologischen Kontrolle. Infektionen mit einer Eimerien-Spezies induzieren einen Spezies-spezifischen Schutz gegen nachfolgende Belastungsinfektionen. Durch welche Komponenten des Immunsystems wird dieser Schutz gebildet?

Eine Infektion mit Eimerien induziert die Produktion von spezifischen Antikörpern (Rose, 1982), (Davis, 1981). Bei einem Infektionsversuch mit Hühnern, denen  $10^4$  *Eimeria tenella* Oozysten oral verabreicht wurde, konnte ab dem 9. - 10. d nach Applikation spezifisches IgG gemessen werden. Der Höhepunkt reichte vom 11. - 15. d, und ab dem 30. d. sank der Titer unter die messbare Grenze des ELISAs (Mockett und Rose, 1986).

Rhalem und seine Mitarbeiter kamen bei ihren Untersuchungen zu den gleichen Ergebnissen. Nach einer oralen Infektion mit  $10^4$  sporulierten *Eimeria tenella* Oozysten konnte ab dem 11. d im Serum eine ansteigende IgG-Antwort mittels ELISA gemessen werden, die ihren Höhepunkt am 15. d erreicht hatte (Rhalem et al., 1993).

Die folgenden Beobachtungen weichen von den oben aufgeführten Ergebnissen ab. Untersuchungen bezüglich der Kinetik einer humoralen Antikörper-Antwort auf Kokzidiose haben gezeigt, dass die Antikörper eine Woche nach der Infektion auftreten, und nach circa 4 Wochen einen Höhepunkt erreichen, welcher dann absinkt (Davis, 1981).

Außer den humoralen Antikörpern wird durch eine Infektion mit Eimerien auch die Bildung von sekretorischen Antikörpern (überwiegend IgA) induziert. Abgesehen davon, dass die Bedeutung der humoralen Antikörper bei einer Kokzidiose noch nicht restlos geklärt ist, schreiben einige Wissenschaftler den sekretorischen Antikörpern eine wichtigere Rolle zu, da sich die sekretorischen Antikörper am "Ort des Geschehens" befinden (Davis, 1981).

IgAs werden mit ihrer sekretorischen Komponente im apikalen Muzin eingesetzt, entweder werden sie direkt durch das Epithelium sezerniert, oder als Anteil der Gallenflüssigkeit ins Darmlumen transportiert (Davis, 1981). 1976 wurde die Synthese von IgA und auch von IgG und IgM durch die Gallenblasenwand nachgewiesen (Rammensee, 1984). In der Literatur variieren die quantitativen Angaben von IgA in der Gallenflüssigkeit erheblich (Rammensee, 1984). Rose fand durch in vivo-Versuche mit Gallengangsdrainagen heraus, dass zwar ein Teil des IgA der Gallenflüssigkeit dem Serum entstammt, aber der größte Anteil wird von der Gallenblasenwand gebildet (Rose et al., 1981). Inwieweit IgA in der Gallenflüssigkeit als Mass für das intestinale Geschehen überhaupt verwendet werden kann, ist noch nicht geklärt.

Wie sieht es mit spezifischem IgA im Falle einer Eimerien-Infektion aus? Wiesner untersuchte die intestinale Anti-Sporozoiten Aktivität von Vögeln, die gegen *Eimeria tenella* immunisiert waren. Nach einer Gabe von  $5 \times 10^4$  *Eimeria tenella* Oozysten wurde das IgA in der Gallenflüssigkeit mittels eines indirekten Fluoreszenz-Test bestimmt. Der Titer war am 9. d nach Verabreichung am höchsten. Um die Bedeutung des IgA-Titers abzuklären, wurden Sporozoiten nach einer Infektion aus dem Darm reisoliert. Bei den immunisierten Tieren wurde eine geringere Sporozoiten Anzahl im Lumen des Dünndarmes gefunden. Doch die Bedeutung dieser Beobachtung bezüglich der Immunität wurde dadurch in Frage gestellt, dass der IgA-Titer in der Gallenflüssigkeit, und somit auch der Effekt bei immunisierten Tieren stark schwankte (Davis, 1981).

Mockett konnte nach einer Applikation von *Eimeria tenella* Oocysten eine kurze spezifische IgA-Antwort in der hepatischen Gallenflüssigkeit nachweisen. Zum erstenmal 7 - 9 d nach Applikation, und dann vom 9. - 10. d in Form eines Höhepunktes. Ein kleiner Betrag konnte noch am 14. und 15. d gemessen werden, doch danach waren alle Proben negativ (Mockett und Rose, 1986).

Rhalem gelang der Nachweis von IgA in der Gallenflüssigkeit, am 5., 7. und 9. d nach einer Verabreichung von  $10^4$  Oozysten per os. Das IgA persistierte, und war auch noch nach einer zweiten und dritten Infektion der Tiere nachweisbar (Rhalem et al., 1993).

Der Konsens aus den angegebenen Arbeiten ist, dass eine humorale als auch sekretorische Immunglobulin-Antwort bei einer Kokzidiose circa 2 Wochen nach der Infektion zu erwarten ist. Die Probenentnahme bei den Tierversuchen Stuttgart und Budapest erfolgte maximal 3 Wochen nach der letzten Applikation.

Das spezifische Antikörper -humorale und sekretorische - nach einer Eimerien-Infektion bei den erkrankten Tieren gefunden werden, ist durch zahlreiche Experimente bewiesen. Über die Bedeutung der Antikörper bezüglich des Schutzes der Tiere vor erneuten Infektionen gibt es noch keine einheitlichen Aussagen.

Argumente für die Beteiligung der humoralen Antikörper sind, dass nicht-immune Tiere durch einen passiven Transfer von Serum einen Schutz aufbauen, und das Serum von geschützten Tieren Sporozoiten in vitro neutralisiert.

Dagegen spricht, dass Tiere, die mit totem Parasitenmaterial immunisiert wurden, zwar identische serologische Antworten wie nach einer Infektion zeigten, jedoch eine volle Empfänglichkeit für eine orale Infektion erhalten blieb. Desweiteren konnte bei hyperimmunen Tieren in jedem Stadium der Immunität sowohl die Abwesenheit als auch die Anwesenheit von beachtlichen Mengen an Antikörpern im Serum beobachtet werden.

Auch wenn die Immunität bei Eimeriosen noch nicht vollständig geklärt ist, wird das bisherige Wissen von *Eimeria tenella* Infektionen für die Entwicklung einer Vakzine eingesetzt. Zur Identifizierung der zu den gebildeten Antikörpern passenden Antigene wurden die Antikörper mit Parasitenproteinen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien getestet. Den identifizierten Antigenen wurde eine immunogene Rolle zugesprochen, durch die sie interessant für die Entwicklung einer Vakzine werden. Die verwendeten Antigene TA4, SO7 und Etmic gehören zur dieser Gruppe von Antigenen.

Neuere Methoden zur Auffindung eines Antigen-Kandidaten berücksichtigen die Beteiligung der T-Zellen bei der Immunität gegenüber Eimerien. Z. B. identifizierten Breed

und seine Mitarbeiter neun Fraktion von Sporozoiten-Antigenen von *Eimeria tenella* über ihre Fähigkeit, eine T-Zellen Antwort in vivo und in vitro zu stimulieren. Eine dieser neun Fraktionen zeigte bei einem Impfversuch mit Hühnern eine signifikante Reduzierung der Darmläsionen im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrollgruppe (Breed et al., 1999).

Die rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic und SO7 induzierten bei subcutaner Applikation kombiniert mit CFA spezifische IgG-Antikörper im Serum der Tiere. Ähnliche Ergebnisse wurden durch eine Kombination aus oraler Applikation der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten, und subcutaner Applikation der rekombinanten Antigene erlangt. Die Induktion von spezifischen Antikörpern durch die Antigene TA4, SO7 und 3Etmic bestätigen ihre Rolle als Antigen-Vakzine-Kandidaten. Ob die gebildeten, spezifischen Antikörper über eine schützende Funktion verfügen, kann nur über eine Belastungsinfektion abgeklärt werden.

Bei einer Kokzidiose werden unterschiedliche spezifische Antikörper gebildet. Ist die Immunität auf ein einzelnes Antigen bzw. Antikörper zurückzuführen, oder auf die Kombination der unterschiedlichen spezifischen Antikörper? Crane und seine Mitarbeiter überprüften die Antikörper-Antwort im Serum von Hühnern mittels eines "Ein Phasen-Fluoreszenz-Immunoassays". Hühner, welche über eine längere Periode Lebend-Kokzidien ausgesetzt wurden, zeigten genauso wie Tiere, die mit einer Kombination aus Sporozoiten-Präparationen und CFA immunisiert wurden, spezifische Antikörper gegen das Protein CheY-SO7'. Eine Immunisierung mit dem rekombinanten Fusion-Protein CheY-SO7' aus *Escherichia coli* führte zu keiner Induktion von spezifischen humoralen Antikörpern. Diesen Sachverhalt erklärten sich die Autoren dadurch, dass die Immunität der geimpften Tiere aus Zell-vermittelte-Mechanismen resultiert. Das hat wiederum zur Folge, daß die Immunität durch das Antigen CheY-SO7' unvollständig ist, d. h. sie ruft nur einen partiellen Schutz bei den Tieren hervor und dieser kann nicht mit einer Chemotherapie konkurrieren. Sie schlagen daher für eine Vakzine mit ausreichender Wirksamkeit den Einsatz von mehreren Antigenen vor (Crane et al., 1991). Für diesen Ansatz bieten sich die Antigene TA4, SO7 und Etmic an.

Der Weg der Verabreichung eines Antigens und die daraus resultierende Präsentation des Proteins werden als wichtige Parameter für die Induktion protektiver Immunantworten betrachtet. In dieser Arbeit wurden die heterogenen *Eimeria tenella* Antigene entweder oral oder subcutan verabreicht. Ein Teil der Tiere wurde sowohl oral als auch subcutan behandelt. Bei oraler Gabe handelte es sich um einen TA4, SO7 oder 3Etmic exprimierenden *Zoosaloral H* Stamm, während bei einer subcutanen Verabreichung die aufgereinigten, rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic oder SO7 zusammen mit CFA appliziert wurden. Bei den Antigenen TA4 und SO7 wurde auch eine Kombination der oralen und subcutanen Applikation getestet.

Eine orale Applikation der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4, SO7 und 3Etmic am 1., 14. und 21. Lebenstag führte zur keiner Bildung von gegen die rekombinanten Antigenen gerichteten, spezifischen IgG im Serum bzw. IgA in der Gallenflüssigkeit der Tiere. Auch eine einmalige Verabreichung der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7 am 14. Lebenstag der Tiere ergab keine spezifische Antikörperantwort auf die rekombinanten Antigene. Die Punkte, die für die fehlende

Bildung der gegen LPS gerichteten Antikörper (siehe Seite 88) angesprochen wurden, treffen auch auf die rekombinanten Antigene und ihre Antikörperinduktion zu.

Die Arbeitsgruppe um Kim konnte mit einem *Escherichia coli* Vakzinestamm, welcher die Expression eines *Eimeria acervulina* Antigen (= p250) besaß, eine signifikante gegen das rekombinante Merozoiten Antigen gerichtete IgG-Antwort induzieren. Die Impfdosis betrug  $10^9$  KBE, und von den Hühnern wurde vor der Immunisierung und 14 d nach der Immunisierung Serum gewonnen (Kim et al., 1989). Dieses Ergebnis ist ein Beispiel von zahlreichen Arbeiten, die den Nachweis erbrachten, dass ein bakteriellen Vektor in der Lage ist, spezifische Antikörper gerichtet gegen sein Fremdprotein hervorzurufen.

Neben dem Ort der Antigen-Präsentation ist auch die Antigen-Dosis und die Zeitspanne der Präsentation wichtig. Welche Antigen-Dosis ist notwendig um eine humorale bzw. sekretorische Antikörper-Antwort auszulösen? Karem stellte fest, dass die notwendige Antigen-Menge von Tier zu Tier variiert. Das hängt davon ab wie schwer sich die Salmonellen-Infektion entwickelt. Zudem ist eine Wirtsantwort auf eine geringe Antigen-Menge davon abhängig, ob das Tier überhaupt die genetische Fähigkeit zum Reagieren besitzt. Das bedeutet wie stark unterliegt die Antikörperbildung einer genetischen Kontrolle (Karem et al., 1995).

Die Arbeitsgruppe um Lillehoj stellte ebenfalls fest, dass die Induktion von Immunantworten, welche das Tier vor einer Neuerkrankung schützen, von der Erbsubstanz des Wirtstieres abhängig ist. Aus ihren Ergebnissen folgern sie, dass außer der Art und Weise der Antigen-Präsentation auch der "B-Haplotyp" (=Chromosomensatz) die Entwicklung des Impfschutzes bei einer Immunisierung von Hühnern mit einem rekombinanten Antigen beeinflusst (Lillehoj et al., 1990).

Die Forschungsgruppe um Crane, wie bereits erwähnt (siehe S. 91), untersuchte ein Derivat von SO7 (CheY-SO7') im Tierversuch, und konnte selbst durch Erhöhung der Antigen-Dosis bzw. der Anzahl der Dosen keine Verbesserung erzielen (Crane et al., 1991). Hierzu finden sich in der Literatur unterschiedliche, sich zum Teil widersprechende Angaben. Z. B. arbeiteten Kim und seine Mitarbeiter nicht nur mit dem rekombinanten Merozoiten-Antigen p250 von *Eimeria acervulina* (siehe S. 91), sondern auch mit Fragmenten des Antigenes. Sie immunisierten Hühner mit unterschiedlichen Dosen des Merozoiten-Oberflächen-Antigens p150, welches einem Anteil des Antigenes p250 entsprach. Die Applikation erfolgte kombiniert mit CFA bzw. iCFA (sekundäre Applikation 7 d nach erster) intramuskulär. Antikörper waren 14 Tage nach der ersten Applikation messbar und erreichten ihr Maximum am 21. Tag. Die Höhe der Antikörper-Antwort war von der Immunisierungsdosis abhängig. Ein Optimum der spezifischen Antikörper-Antwort konnte mit einer Dosis von 3 - 6  $\mu\text{g}$  / Huhn erreicht werden (Kim et al., 1989)

Auch bei Hühnern, welchen subcutan eine Fraktion von Sporozoiten-Antigenen von *Eimeria tenella* verabreicht wurde, konnten Breed und seine Mitarbeiter eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Dosis und dem Effekt auf die Lymphozyten nachweisen. So zeigten die Tiere mit der höchsten Antigen-Dosis die höchste T-Zellen Aktivierung (Breed et al., 1999). Interessanterweise fanden sie bei den anschließenden Belastungsinfektionen keine Abhängigkeit zwischen der Impfdosis und dem Grad des Schutzes - ausgewertet anhand der Entwicklung von Darmläsionen.

Einige Wissenschaftler vertreten die Ansicht, dass der entscheidende Punkt zur Aktivierung einer Immunantwort die initiale Menge an Antigen ist, die dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) präsentiert wird. Diese Ansicht wird durch die Ergebnisse von Chen und seine Mitarbeiter bestätigt. Durch den Einsatz eines *nirB*-Promotors in *Salmonella* konnte die Expression des Antigens erhöht werden. Sie vermuten, dass die beobachtete Steigerung der Immunantwort auf den Vektorwechsel, d. h. auf die dadurch bedingte erhöhte Expression, zurückzuführen ist. Andere Wissenschaftler kommen zu dem Schluss, dass eine lange Persistenz der *Salmonella* im mucosalen Immunsystem, speziell in den Peyerschen Platten, für die Induktion der mucosalen Immunantwort notwendig ist. Eine Methode, das Antigen dem GALT zu präsentieren ist ein Vektor zu verwenden, welcher über einen Tropismus für die Peyerschen Platten verfügt, wie z. B. *Salmonella enterica* (Chen und Schifferli, 2000).

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass das meiste Antigen des injizierten Materials katabolisiert wird, bevor es eine Zielzelle erreicht. In der Regel werden 50 - 1000  $\mu\text{g}$  eingesetzt (Schmid et al., 2000). Die Applikationsdosis der gereinigten, rekombinanten Antigene TA4-2, SO7 und 3Etmic betrug 50  $\mu\text{g}$ .

Die Effizienz einer Immunisierung wird durch den Wirt, Route der Injektion, Adjuvants und der "intrinsic nature" des Antigen beeinflusst (Schmid et al., 2000). Als Routen der Injektion wurden die orale Applikation der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten und die subcutane Applikation der rekombinanten Antigene TA4-2, SO7 und 3Etmic untersucht. Bei der subcutanen Verabreichung kam das Adjuvants CFA zum Einsatz.

Adjuvantien werden als nichtspezifische Stimulatoren der Immunantwort bezeichnet. Ihre noch nicht ganz geklärte Wirkung wird durch zwei Komponenten erreicht. Eine Komponente, wie z. B. Mineralöle in FA, schützen das Antigen vor dem schnellem Abbau im Körper des Tieres. Diese "Depot-Wirkung" verursacht, dass die Antigene für eine Immunantwort länger zur Verfügung stehen. Die zweite Komponente, stimuliert die Immunantwort unspezifisch. Bei CFA übernehmen diese Aufgabe abgetötete Tuberkelbakterien. Sie führen zu einer starken, lokalen Entzündungsreaktion, die wiederum eine Synthese von IL-1 in Makrophagen induziert, und dadurch die Aktivität von  $T_h$ -Zellen stimuliert (Schmid et al., 2000). FA ist bekannt für die Stimulierung von starken und langanhaltenden Immunantworten (Schmid et al., 2000). Bei den Tieren, welche subcutan gereinigtes Antigen TA4-2, SO7 oder 3Etmic zusammen mit CFA verabreicht bekamen, konnte eine spezifische IgG-Antwort nachgewiesen werden.

Comoy und seine Mitarbeiter stellten bei Versuchen mit Mäusen, welchen ein rekombinantes Antigen subcutan oder i.p. verabreicht wurde fest, dass eine Immunisierung mit dem Antigen keine Antikörper-Antwort auslöste. Eine Verabreichung des rekombinanten Antigens zusammen mit CFA induzierte einen hohen Titer an spezifischen IgG, unabhängig von der Applikationsart (Comoy et al., 1997). Bei der vorliegenden Arbeit konnten gegen das rekombinante Antigen gerichtete Antikörper nur bei den subcutan (in Kombination mit CFA) behandelten Tieren nachgewiesen werden. Vielleicht sind die rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten ohne Adjuvants nicht in der Lage, das Immunsystem zur Bildung von Antikörpern zu stimulieren.

Die Wissenschaftler Lillehoj und Jenkins arbeiteten auch mit dem rekombinanten

Merozoiten Antigen p150. Eine intramuskulären Verabreichung zusammen mit CFA rief eine antigenspezifische, systemische und intestinale Immunantwort hervor (Lillehoj und Jenkins, 1989).

In weiteren Versuchen verglich Lillehoj die intramuskulären Applikation des rekombinanten Merozoiten Antigen p250 mit der oralen Verabreichung des rekombinanten *Escherichia coli* Stammes. Untersucht wurde unter anderem die humorale und sekretorische Antikörper-Antwort mittels ELISA und die T-Zellen-Proliferation. Die Dosis des rekombinanten *Escherichia coli* betrug  $10^9$  KBE. Bei der intramuskulären Applikation wurde CFA bzw. iCFA eingesetzt. Beide Applikationsformen resultierten in humorale Antikörper- und Antigen-spezifische-T-Zellen-Antworten, wobei bei der intramuskulären Applikation beide Formen der Immunantwort höher waren als wie bei einer oralen Verabreichung (Lillehoj et al., 1990).

In den Tierversuchen Stuttgart und Budapest weichen die Ergebnisse der Antikörperantwort gerichtet gegen die Eimerien-Antigene bei den unterschiedlichen Applikationsgruppen voneinander ab. Die orale Verabreichung der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4, SO7 und 3Etmic führten zu keiner im ELISA messbaren spezifischen Immunantwort. Bei den subcutan und kombiniert behandelten Versuchsgruppen konnte eine Induktion der spezifischen IgG-Antwort nachgewiesen werden.

Stabel entwickelte einen rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stamm mit der Expression eines Antigens von *Brucella abortus*. In einem Tierversuch wurde Mäusen das Konstrukt entweder oral verabreicht, oder das gereinigte, rekombinante Antigen wurde subcutan appliziert. Die hohe humorale Immunantwort (IgG), ausgewertet durch einen ELISA, konnte bei beiden Applikationsformen gemessen werden. Die oral immunisierten Tiere entwickelten die spezifisch gegen das rekombinante Antigen gerichteten Antikörper langsamer, als die parenteral immunisierten Tiere. Eine zweite orale Dosis des rekombinanten Salmonellen Stammes am 14. oder 21. Tag hatte keinen Effekt auf den bereits existierenden Serum-Titer. Zusätzlich wurde über eine Aufbereitung des Intestinums die IgA-Antwort überprüft. Die oral geimpften Tiere zeigten am 23. Tag einen Höhepunkt von IgA, gerichtet gegen das rekombinante Antigen. Dieser Höhepunkt war im Vergleich zu dem IgA-Höhepunkt gerichtet gegen das auch untersuchte Salmonellen-Endotoxin-Antigen deutlich niedriger (Stabel et al., 1990) Möglicherweise waren die Immunantworten in Form von Antikörpern bei den oral behandelten Versuchsgruppen unter der Nachweisgrenze des ELISAs oder im Falle des IgA war der Höhepunkt zum Zeitpunkt der Probennahme vorüber. Diese Erklärungen können sowohl auf den Tierversuch Stuttgart als auch auf den Tierversuch Budapest zutreffen.

Im Tierversuch Stuttgart wurde außer einer zweimaligen subcutanen Applikation auch eine Kombination der oralen und subcutanen Applikation getestet. Das heißt, die erste Antigenpräsentation erfolgte am 14. Lebenstag durch die orale Gabe des rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stammes, während die zweite Antigenpräsentation durch die subcutane Verabreichung des rekombinanten Antigenes zusammen mit CFA am 35. Lebenstag erfolgte. Die Applikationszeitpunkte entsprechen denen der Versuchsgruppen mit einer zweimaligen subcutanen Applikation von rekombinanten Antigen und CFA.

Bei den kombinierten Versuchsgruppen wurde eine spezifische Immunantwort gerich-

tet gegen TA4 bzw. SO7 gemessen. Die Ergebnisse der kombiniert behandelten Versuchsgruppe liegen im Größenbereich der subcutan behandelten Versuchsgruppen. Entweder ist die einmalige subcutane Applikation des rekombinanten Antigenes mit CFA am 35. Lebenstag der Tiere für eine im ELISA messbare Antikörperantwort ausreichend, oder die Stimulierung des Immunsystems am 14. Lebenstag durch die orale Gabe des rekombinanten *Salmonella typhimurimu* Stammes führt zu einer vergleichbaren Antikörperantwort, wie eine zeitgleiche subcutane Verabreichung von rekombinanten Antigenen und CFA. Da die Versuchsgruppe 2 aus Tierversuch Stuttgart mit einer einmaligen oralen Gabe des rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stammes am 14. Lebenstag zur keiner im ELISA messbaren Antikörperantwort führte, liegt der Verdacht nahe, dass die Ergebnisse der kombinierten Versuchsgruppen 4 und 5 überwiegend auf die einmalige subcutane Gabe des rekombinanten Antigenes mit CFA zurückzuführen sind.

Es gibt generell sehr unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung der Immunantwort auf die Gabe von rekombinanten Eimerien-Antigenen. Daraus folgt, dass jedes rekombinante Antigen für sich allein betrachtet werden muß. Dafür müssen spezifische Tests entwickelt werden. Die Resultate anderer rekombinanter Eimerien-Antigene können nur zur groben Orientierung dienen, z. B. bezüglich der Dosis, dem Applikationszeitpunkt und der Applikationsanzahl.

### 5.2.3. ELISA

Die Seren und die Gallenflüssigkeit der Versuchstiere wurden auf Immunglobuline G und A gerichtet gegen LPS, oder gegen die rekombinanten Antigene TA4-2, SO7 und 3Etmic untersucht.

Bei der Untersuchung der Gallenflüssigkeit und der Seren der Versuchstiere, die dreimal oral mit den rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten behandelt wurden, ist bei dem Impfstoff-Kandidaten SO7 im Gegensatz zu TA4 und 3Etmic kein spezifischer LPS-Titer nachweisbar. Es muss dabei beachtet werden, dass der rekombinante Salmonellen-Impfstoff-Kandidat SO7 im Gegensatz zu den anderen zwei Impfstoff-Kandidaten im Tierversuch Stuttgart getestet wurde, somit sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar.

Die positiven Ergebnisse aus Tierversuch Budapest bezüglich gegen LPS gerichteten IgA und IgG beweisen, dass eine dreimalige orale Verabreichung der Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten zur Induktion einer spezifischen Antikörperantwort führt.

Bei den Versuchsgruppen mit einer einmaligen oralen Applikation des rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4, SO7 oder des Kontrollstammes Zlux207.1 sind im ELISA keine gegen die rekombinanten Antigene gerichteten Antikörper nachgewiesen worden. Auch die ELISA-Ergebnisse der gegen LPS gerichteten IgA und IgG waren bei diesen Versuchsgruppen negativ. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine einmalige Applikation in der zweiten Lebenswoche der Tiere nicht zur Stimulierung einer spezifischen Antikörper-Antwort ausreicht. Das trifft sowohl auf Antworten gerichtet gegen LPS, als auch gegen die rekombinanten Antigene zu. Auch das Fehlen LPS spezifischer Antikörper-Antworten bei den Versuchsgruppen, die zuerst oral und dann subcutan behandelt wurden, kann darauf zurückgeführt werden, dass eine einma-

lige orale Verabreichung der rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten TA4 und SO7 am 14. Lebenstag der Tiere nicht ausreicht.

Spezifisch gegen die rekombinanten Antigene TA4-2, 3Etmic und SO7 gerichtetes IgG konnte im Serum von Tieren aus Tierversuch Stuttgart, welche entweder zweimal subcutan oder kombiniert oral und subcutan behandelt wurden, nachgewiesen werden. Bei den oral applizierten Versuchsgruppen ergab die spezifische Antikörper-Untersuchung, gerichtet gegen die rekombinanten Antigene, bei beiden Tierversuchen negative Ergebnisse. Die oben bei der LPS spezifischen Immunantwort angesprochenen Punkte können auch auf die spezifisch gegen die rekombinanten Antigene gerichtete Immunantwort angewendet werden. Das nur bei den subcutan behandelten Tieren ein Nachweis von spezifischen Antikörpern gelang, kann an dem Einsatz von unter denaturierten Bedingungen gewonnenem "coating-Antigen" liegen (siehe Kapitel "Expression der rekombinanten TA4, 3Etmic und SO7 Proteine", S. 82).

Redman vermutet, dass ein im ELISA verwendetes "coating-Antigen" die Ursache für eine Unterschätzung der Höhe an Antikörpern sein kann. Denn die induzierten Antikörper der immunisierten Tiere sind spezifisch für das verabreichte rekombinante Antigen der Salmonellen, und somit weniger effizient in der Bindung an das native Antigen, das im ELISA als "coating-Antigen" eingesetzt wurde (Redman et al., 1996).

Bei einem "idealen" Test besteht eine deutliche Trennung von positiven und negativen Ergebnissen, das heißt die "Trennungslinie" liegt zwischen dem höchsten negativen Ergebnis und dem niedrigsten positiven Ergebnis. Solche "idealen" Test sind eher selten und es liegen in der Regel "typische" Test vor, bei denen sich die positiven und die negativen Ergebnisse überschneiden. Bei diesen Tests ändert sich beim Verschieben der "Trennungslinie" das Verhältnis von falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen. Ein Test mit einem hohen Anteil an falsch-positiven Ergebnissen wird als nicht spezifisch bezeichnet, während ein Test mit einem hohen Anteil an falsch-negativen Ergebnissen als unempfindlich bezeichnet wird (Tizard, 2000). Bei der Auswertung der ELISA-Ergebnisse aus Tierversuch Stuttgart wurden die Versuchsgruppen 6 und 7 als "Positivkontrolle" und die Versuchsgruppen 8 und 9 als "Negativkontrolle" herangezogen. Die "Trennungslinie" zwischen der "Positivkontrolle" und "Negativkontrolle" kann ohne Überschneidungen gezogen werden. Die Mittelwerte der untersuchten Versuchsgruppen liegen entweder im Bereich der Negativkontrolle oder in dem Bereich der Positivkontrolle, somit ist eine Auswertung der ELISA-Ergebnisse eindeutig.

Innerhalb von Versuchsgruppen gibt es Tiere mit ELISA-Ergebnissen, die mehr oder weniger stark vom Mittelwert der Gruppe abweichen. Dies ist bei den Versuchsgruppen 4 und 5 aus Tierversuch Stuttgart der Fall. Extrem hohe oder niedrige Werte innerhalb einer Reihe üblicher, mäßig unterschiedlicher Messwerte dürfen unter gewissen Umständen vernachlässigt werden. Bei Extremwerten kann es sich um Ausreißer handeln.

Ein Ausreißer ist eine Beobachtung, die deutlich von den anderen Werten derselben Stichprobe abweicht (Keller, 1999). Für das Auftreten von Ausreißern gibt es verschiedene Gründe. Zum Beispiel die natürliche (inhärente) Variabilität. Es sollte versucht werden, Ursachen für die extreme Abweichung zu finden oder sich andererseits von der Richtigkeit dieser Werte zu überzeugen (Keller, 1999). Eine Ursache für das Auftreten

von Ausreißern bei der Antikörperuntersuchung kann darin liegen, dass polyklonale Antikörper bestimmt wurden. Bei polyklonalen Antikörpern schwankt die Antikörpermenge und -qualität von Tier zu Tier, und innerhalb eines Tieres von einem Zeitpunkt zum anderen, stark (Schmid et al., 2000).

Da der berechnete Testquotient von Gruppe 4 und 5, bei der statistischen Sicherheit  $\alpha=0,05$ , die bei dem Stichprobenumfang  $n=10$  entsprechende Schranke nicht erreicht bzw. überschreitet, ist anzunehmen, dass die geprüften Extremwerte der gleichen Grundgesamtheit entstammen wie die übrigen Werte (Sachs, 1968). Zudem sind Ausreißer umso unwahrscheinlicher, je kleiner die Stichproben sind.

Werden bei der Betrachtung der Ergebnisse von den kombiniert behandelten Versuchsgruppen die Extremwerte berücksichtigt, zum Beispiel indem nicht der arithmetische Mittelwert sondern der Median bestimmt wird, sprechen die Ergebnisse der kombiniert behandelten Gruppen deutlicher auf die veränderte Berechnung an, als die der Positivkontrolle (Versuchsgruppe 6 und 7), siehe Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1.: Vergleich arithmetischer Mittelwert und Median von Tierversuch Stuttgart

Versuchsgruppe	Arithmetischer Mittelwert	Median
4	1,44	1,76
6	1,52	1,49
5	1,03	1,23
7	1,35	1,39

Bei der Auswertung von der Versuchsgruppe 10 im Tierversuch Stuttgart sind zwei Werte der "Negativkontrolle" (Versuchsgruppe 9) relativ hoch. Sie liegen jedoch unter den Werten der Versuchsgruppe 10, die als "Positivkontrolle" fungiert. Da der berechnete Testquotient von Gruppe 9 bei der statistischen Sicherheit  $\alpha=0,05$  die bei dem Stichprobenumfang  $n=10$  entsprechende Schranke nicht erreicht bzw. überschreitet, ist anzunehmen, dass die geprüften Extremwerte der gleichen Grundgesamtheit entstammen wie die übrigen Werte (Sachs, 1968).

Liegen kleine Stichproben vor, die nicht streng normalverteilt sind, dann sind verteilungsfreie Tests oft wirksamer als die sonst optimalen parametrischen Tests (Sachs, 1968). Der auf dem sogenannten Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierende Rangtest von Mann und Whitney ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum parametrischen t-Test (Sachs, 1968).

Die aufgeführte Prüfstatistik ist als formalisierte Datenbeschreibung aufzufassen. Sie gibt lediglich eine grobe Übersicht über die Ergebnisse des Tierversuches Stuttgart wieder. Die angeführten Wahrscheinlichkeits- und Signifikanzaussagen treffen im strengen Sinne nicht zu.

Die durch die rekombinanten Salmonellen-Impfstoff-Kandidaten hervorgerufenen spezifischen Immunantworten erlauben keine Aussage über den Schutz, den sie im Tier aufbauen. Dies schützende Wirkung der Konstrukte kann über eine Belastungsinfektion untersucht werden.

### 5.3. Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Eimerien Antigene TA4, SO7 und 3Etmic als rekombinante Proteine eines attenuierten *Salmonella typhimurim* Stammes hergestellt, und ihre immunologische Wirkung bei Hühnern untersucht. Bisher haben trotz umfangreicher Forschungsarbeiten nur wenige Impfstoffe gegen Tierparasitosen Marktreife erlangt oder bieten konkrete Aussichten für eine wirtschaftliche Nutzung. Ursachen für die Schwierigkeiten bei der Entwicklung von antiparasitären Vakzinen sind wahrscheinlich die Komplexität der Effektormechanismen des Wirtes und die Existenz von Evasionsmechanismen der Parasiten. Wenn es gelingt, Immunantworten des Wirtes gezielt zu verstärken und in eine Richtung zu manipulieren, die dem Effekt lebender, attenuierter Parasiten entspricht, können antiparasitäre Impfungen mit rekombinanten Proteinen wesentlich effizienter sein. Die Eimerien-Antigene TA4, SO7 und 3Etmic wurden deshalb in einen attenuierten *Salmonella typhimurium* Stamm kloniert. Die Ergebnisse der durchgeführten orientierenden Immunisierungsexperimente können für die Optimierung folgender Tierversuche verwendet werden. Zur vollständigen Abklärung der Wirkung der Konstrukte ist eine Tierversuch einschließlich Belastungsinfektion notwendig. Bei der Immunität gegenüber Eimerien wird die zelluläre Immunität vermehrt angesprochen, darum ist es vorteilhaft, neben einer Antikörper-Untersuchung auch eine Überprüfung der zellulären Immunität durchzuführen. Interessant ist auch ein kombinierter Einsatz der Eimerien-Antigene oder die Verwendung von Antigenen aus verschiedenen Eimerien-Entwicklungsstadien, z. B. Sporoziten und Schizonten (Jenkins, 1998).

Bei den Tierversuchen wurde den rekombinanten Antigenen TA4 und SO7 der Vorzug gegeben, da das Antigen 3Etmic in der Literatur schwerpunktmäßig zur Klärung des Immungeschehens eingesetzt wird und nicht wie die Antigene TA4 und SO7 als Antigen für Vakzine angesehen wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden die Grundlage für die Entwicklung eines rekombinanten Salmonellen Impfstoffes gegen die Eimeriose des Huhnes, mit dem Ziel, die Tiere durch die einmalige Applikation eines Kombinationsimpfstoffes vor zwei wichtige Krankheiten - Salmonellose und Kokzidiose - der Geflügelhaltung zu schützen.