

## 5. Diskussion

### 5.1. Unterschiede im Ausmaß der Neuinfektion der Ferkel im Bezug auf die beiden Fütterungsgruppen und mögliche Wirkungsmechanismen der Fütterung des *Enterococcus faecium*

Der Einsatz von Probiotika in der Fütterung von Schweinen hat in der letzten Zeit maßgeblich an Bedeutung gewonnen, da die in der Tierernährung früher üblichen Leistungsförderer wegen der möglichen Induzierung bzw. Selektion von Antibiotikaresistenzen in zunehmendem Maße in die Kritik geraten sind. Immer mehr Leistungsförderer werden von der europäischen Kommission für Gesundheit und Verbraucherschutz verboten. Aus diesem Grund werden dringend sichere Alternativen gesucht. Probiotika können als solche Alternativen angesehen werden. Gerade im Hinblick auf Chlamydieninfektionen, insbesondere wenn man die steigende Zahl an Tetrazyklin-resistenten *C. suis*-Stämmen betrachtet, sind alternative Verfahren von Nöten (Dugan *et al.*, 2004). Ein Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es deshalb, einen möglichen infektionsmindernden Effekt der Fütterung mit einem *Enterococcus faecium*-Präparat auf die Chlamydien-Neuinfektion von Ferkeln aufzuzeigen.

Nachdem der Infektionsstatus der Muttersauen in der Probiotikagruppe und der Kontrollgruppe ermittelt war, konnte das Ausmaß der Carry-over-Infektion der Ferkel im Gruppenvergleich analysiert werden. Ferkel aus der Kontrollgruppe zeigten mit 17/20 (85%) eine deutlich höhere Infektionsrate im Gegensatz zu den Nachkommen der Probiotikagruppe mit 12/20 (60%) (Abb. 9). Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurden zudem wesentlich häufiger alle drei untersuchten Proben des einzelnen Tiers positiv getestet (Abb. 10). Die deutlichste Reduktion im Gruppenvergleich mit 25% gab es bei der Ileum- und Fäzesprobe. Beim Vergleich der Kolonprobe waren in der Probiotikagruppe 20% weniger Chlamydien zu detektieren. Eine signifikante Reduktion wurde bei der Altersgruppe der 14-Tage alten Ferkel nachgewiesen (Abb. 12). Im Gruppenvergleich der aufaddierten Mittelwerte der semiquantitativen Auswertung der IHC sieht man sowohl im *Colon ascendens* als auch im *Colon descendens*, dass bei den Tieren der Probiotikagruppe durchschnittlich weniger Enterozyten infiziert waren (Abb. 14). Die Gesamtheit der beobachteten Effekte lässt den Schluss zu, dass die Unterschiede zwischen der Probiotika- und der Kontrollgruppe durch die Fütterung mit dem probiotischen *Enterococcus faecium*-Stamm bewirkt wurden. Es sind

grundsätzlich drei Mechanismen denkbar, durch welche die Fütterung mit dem *Enterococcus faecium* Präparat auf die Chlamydien-Neuinfektion Einfluss nehmen könnte: (a) Verminderung der Infektionsrate oder Blockierung während der Phase der Endozytose; (b) Reduzierung der Vermehrung in den infizierten Wirtszellen; (c) erhöhte Aktivität der intestinalen Immunzellen gegenüber *Chlamydia*-infizierten Zellen.

Der initiale Schritt der Chlamydieninfektion ist die rezeptorvermittelte Endozytose. Als Rezeptor dienen nach heutigem Wissensstand mit großer Wahrscheinlichkeit Glykosaminoglykane (Taraktchoglou *et al.*, 2001). Eine Rezeptorkonkurrenz wäre denkbar. Diese wurde z.B. an einem porcinen *in-vitro*-Mucusmodell für den intestinalen Mucusrezeptor (80 kDA Glykoprotein) mittels Ko-Infektion von *Enterococcus faecium* 18C23 und enterotoxischen *E. coli* bewiesen (Jin *et al.*, 2000). Ebenso könnte eine verringerte Infektionsrate durch die vom *Enterococcus* gebildeten antimikrobiellen Substanzen bedingt sein, die eine Wirkung gegen Chlamydien haben (Audisio *et al.*, 2001; Elmer und McFarland, 2001; Saavedra *et al.*, 2003). Obgleich eine kürzlich erschienene Studie zeigte, dass keines der acht bei Enterokokken bekannten Bakteriozine in dem von uns verwendeten Stamm vorhanden ist (Foulquie Moreno *et al.*, 2003). Ebenso zeigte der Stamm keine antimikrobielle Aktivität gegen gram-negative Bakterien (Filho-Lima *et al.*, 2000).

Die Verhinderung oder Reduktion der Replikation der Chlamydien in der Zelle durch das Probiotikum ist unserer Einschätzung nach der wahrscheinlichste Mechanismus, aber auch derjenige über den am wenigsten bekannt ist. Das Hauptproblem ist, dass nach aktuellem Wissensstand nur sehr wenig über die Interaktion zwischen Epithelzelle und Probiotikum geklärt ist. So gibt es z.B. Hinweise, dass Sekretionsprodukte von Laktobazillen zu einer Aktivierung des eukaryotischen Transkriptionsfaktor NFκB führen (Bai *et al.*, 2004). Frühere Studien bewiesen auch die Interaktion zwischen Epithelzelle und probiotischem Keim (Mack *et al.*, 1999; Lu und Walker, 2001; Dahan *et al.*, 2003). Diese Interaktionen zwischen probiotischem Keim und Zelle könnte dazu führen, dass eine der vielfältigen Interaktionen der Chlamydien mit ihrer Wirtszelle gestört wird (Krull *et al.*, 1999; Scidmore und Hackstadt, 2001; Coombes *et al.*, 2002; Scidmore *et al.*, 2003). Da es sich bei Vertretern der *Chlamydiaceae* um obligat intrazelluläre Bakterien handelt ist es sehr gut vorstellbar, dass eine Änderung im Expressionsmuster der Wirtszelle nicht ohne Einfluss für die Replikation der Chlamydien bleibt.

Als dritte Möglichkeit wäre eine schnellere Eliminierung des Erregers dadurch möglich, dass die probiotische Behandlung zu einer Aktivierung des Immunsystems führt (Perdigon *et al.*, 1995; Perdigon *et al.*, 2003). Diese Möglichkeit scheint ausgeschlossen werden zu können, da

gleichzeitig durchgeführte immunologische Untersuchungen an der von uns untersuchten Tierpopulation keine Hinweise auf eine erhöhte Aktivität der Immunzellen oder eine vermehrte Antikörperproduktion ergaben (Scharek *et al.*, 2005).

Schließlich gilt es noch einen indirekten Effekt zu berücksichtigen, den die Fütterung mit dem probiotischen *Enterococcus faecium* auf die Infektion mit Chlamydien haben könnte. Der indirekte Einfluss kann in einer besser und schneller eingestellten Eubiose der intestinalen Flora der Ferkel bestanden haben. Die Fütterung mit dem probiotischen Präparat führte schneller zu einer Besiedelung des Darms mit kommensalen Bakterien. Frühere Studien an keimfreien Tieren zeigten, dass Kommensale zum Einen die Entwicklung der Epithelzellen, aber auch das gastrointestinale lymphatische System eines gesunden Darms positiv beeinflussen (Falk *et al.*, 1998; Umesaki und Setoyama, 2000). Betrachtet man Studien, die Salmonelleninfektionsversuche von gnotobiotischen Mäusen und herkömmlichen Mäusen vergleichen, sieht man, dass die Gnotobioten bei gleicher Infektionsdosis im Gegensatz zu den herkömmlichen Mäusen versterben (Silva *et al.*, 1999). Im Hinblick auf Chlamydieninfektionen scheint ein solcher Mechanismus gut vorstellbar wenn man die Unterschiede bei oralen Infektionsversuchen mit Chlamydienstämmen bei keimfreien Ferkeln und Absatzferkeln betrachtet (Rogers und Andersen, 1996; Rogers und Andersen, 2000). In beiden Studien wurden dieselben Stämme in gleicher Infektionsdosis eingesetzt. Im Fall der Gnotobioten entwickelten die Tiere ein massives Krankheitsbild einer gastrointestinalen Infektion, wohingegen die Absatzferkel keine klinischen Symptome zeigten. Eine Infektion war auch auf Grund der hohen Infektionsdosis ( $10^9$  IFU/ml) jedoch bei den Absatzferkeln nachweisbar.

## **5.2. Nachweis von Chlamydieninfektionen in einer geschlossenen Population von Muttersauen und ihren Nachkommen**

Chlamydien sind in der Lage sämtliche Organsysteme, den Magen-Darmtrakt eingeschlossen, zu infizieren. Diesem kommt als Habitat des Erregers eine besondere Bedeutung zu. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit konventionellen als auch mit modernen molekularbiologischen diagnostischen Methoden den Schweinedarm einer geschlossenen Population (Kontrollgruppe und Probiotikagruppe) systematisch auf vorhandene Chlamydieninfektionen zu untersuchen. Zum Einen wurde der Trägerstatus der Muttersauen aus konventioneller Haltung festgestellt, zum Anderen wurden von *Chlamydia*-positiv

getesteten Muttersauen die Ferkel auf das Ausmaß der Carry-over-Infektion und etwaige Unterschiede in den beiden genannten Fütterungsgruppen untersucht.

In Übereinstimmung mit anderen Studien (Szeredi *et al.*, 1996; Hoelzle *et al.*, 2000) wurde bei den von uns untersuchten Muttersauen ein hoher Prozentsatz an latent infizierten Därmen diagnostiziert. Bei dreimaliger Untersuchung von Fäzesproben der Muttersauen war bei 16/22 (73%) der Tieren eine Chlamydieninfektion nachweisbar. Der Unterschied zwischen der einmaligen Beprobung mit 6/22 (27%) *Chlamydia*-positiven Tieren und der dreimaligen Untersuchung bestätigte die zwingende Notwendigkeit, beim Screening auf latente Infektion mit Chlamydien eine wiederholte Untersuchung durchzuführen. Dies trifft in besonderem Maß auf die Untersuchung von Ausscheidungsprodukten und Tupferproben zu. Als Hauptursache für die Diskrepanz zwischen einmaliger und dreimaliger Beprobung ist die intermittierende Ausscheidung des intrazellulären Erregers zu sehen.

Um eine möglichst realistische Sicht über das Ausmaß der Neuinfektion der Ferkel *Chlamydia*-positiv getesteter Muttersauen zu bekommen, wurden von jeder der zehn Muttersauen (fünf aus jeder Fütterungsgruppe) vier Ferkel randomisiert ausgewählt. Diese wurden systematisch untersucht mittels Anzucht, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und im Fall der Immunhistochemie (IHC) und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) vier Ferkel von sechs Muttersauen auf eine Neuinfektion mit Chlamydien. Der häufigste Nachweis der Chlamydieninfektion bei den Nachkommen, der mittels PCR durchgeführt wurde, gelang in Proben des Dickdarms mit 26/40 (65%) *Chlamydia*-positiv getesteten Tieren im Vergleich zu 11/40 (28%) im Dünndarm. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Literaturangaben, nach denen der Dickdarm häufiger infiziert ist als der Dünndarm (Zahn *et al.*, 1995). Ebenso übereinstimmend fanden wir die Inklusionen in den *Chlamydia*-infizierten Zellen nur oberhalb der Basalmembran, dass heißt in den Enterozyten (Zahn *et al.*, 1995; Szeredi *et al.*, 1996; Nietfeld *et al.*, 1997; Chae *et al.*, 1999). Alle untersuchten Ferkel waren klinisch gesund. Moderate histopathologische Veränderungen waren sowohl bei *Chlamydia*-positiven als auch bei *Chlamydia*-negativen Ferkeln zu sehen. Das bekräftigt den Sachverhalt, dass Chlamydien in gesunden Schweinen nicht primär darmpathogen sind, ihnen aber im Hinblick auf Ko-Infektionen mit anderen darmpathogenen Bakterien, Viren und Parasiten eine Rolle zukommt (Pospischil und Wood, 1987; Koudela *et al.*, 1990; Carrasco *et al.*, 2000). Der Chlamydieninfektion des Darms sollte wegen der häufigen latenten Infektion und der Rolle als Habitat deshalb eine besondere Aufmerksamkeit zukommen (Shewen, 1980; Nietfeld *et al.*, 1997; Guscetti *et al.*, 1998).

Infizierte Enterozyten waren mittels IHC und FISH sowohl einzeln als auch in proliferierenden Clustern nachzuweisen (Abb. 12 und 15) (Pospischil und Wood, 1987; Chae *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu anderen Studien war in der von uns untersuchten Population der Anteil an *Chlamydia*-positiven Schweinen unter 4 Wochen mit 21/40 (53%) wesentlich höher (Zahn *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu anderen Studien, die *Cp. abortus*, *C. pecorum*, *Cp. psittaci* und *C. suis* im Schweinedarm nachgewiesen haben (Hoelzle *et al.*, 2000; Hotzel *et al.*, 2004), konnten wir in der von uns betrachteten Population nur Infektionen mit *C. suis* diagnostizieren. In einem weiteren Fütterungsversuch mussten viele der von uns als *Chlamydia*-positiv diagnostizierten Muttersauen aus dem Versuch ausgeschlossen werden, da diese Fruchtbarkeitsstörungen zeigten, insbesondere das Phänomen des Umrauschen. Dieser Sachverhalt deutet für uns darauf hin, dass *C. suis* gleichsam wie *Cp. abortus* zu Reproduktionstörungen führen kann und diesem Erreger demnach keine untergeordnete Rolle zukommt (Eggemann *et al.*, 2000). Ein durchgeführter aerogener Infektionsversuch von Schweinen mit *C. suis* bewies zudem, dass Vertreter dieser Spezies als virulent anzusehen sind (Sachse *et al.*, 2003).

Bei fünf Ferkeln gelang der Nachweis der Chlamydien in der Zellkultur. In fünf Mukosaproben waren die Chlamydien in der zweiten Passage sichtbar, bei drei dieser Tiere war der Erreger auch in den Fäzesproben nachweisbar. Im Zuge der weiteren Passagierung kam es nicht wie erwartet zu einer Vermehrung des Erregers, sondern zu einer Reduktion. Die angezüchteten Primärisolate konnten somit nicht als Typstämme etabliert werden. Dies ist ein Sachverhalt, der unter Forschern bestens bekannt ist, aber in der Öffentlichkeit wenig diskutiert wird. Eine mögliche Erklärung für den Verlust des Erregers wäre eine entstehende persistierende Infektion in der Zellkultur. Dieser Vorgang, bei dem nicht regelgerechte Chlamydienstadien gebildet werden, wurde bei intestinalen Chlamydien des Schafes beschrieben (Philips und Clarkson, 1995). Die gebildeten aberanten Formen lassen sich mit konventionellen Nachweisverfahren nicht darstellen und sind auch nicht infektiös. In der zitierten Veröffentlichung wird der Vorgang der Persistenz dem Zusatz von Cycloheximid zum Zellkulturmedium zugeschrieben. Ein Phänomen, das auch schon Spears und Storz (1979) in den 80er Jahren beschrieben haben. Sie zeigten auf, dass bestimmte Chlamydienstämme mit der Bildung von kryptischen Einschlüssen auf den Zusatz von Cycloheximid reagierten. Neue Studien bewiesen im Gegensatz dazu, dass eine effektive Vermehrung von Chlamydien porcinen Ursprungs ohne den Zusatz von Cycloheximid kaum möglich ist (Schiller *et al.*, 2004). Weitere Möglichkeiten für das Absterben könnten eine

ungenügende Mykoplasmen-Eliminierung in den klinischen Proben gewesen sein oder ein nicht optimal auf den Stamm abgestimmtes Zellkulturmedium. Abgesehen von dem Fehlschlagen der Stammetablierung erwies sich der kulturelle Erregernachweis nicht als besonders sensitiver Nachweis für porcine Chlamydien. Gründe hierfür können ebenfalls in der nicht ausreichenden Mykoplasmen-Eliminierung der aufgearbeiteten Proben liegen, in den geringen Infektionstitern des Probenmaterials, einer Infektionsminderung durch hohen Antibiotikaeinsatz oder einer ungeeigneten Wirtszelllinie liegen. Wie die Arbeit von Schiller *et al.* (2004) zeigte, ist die Wahl der Zelllinie von entscheidender Bedeutung. So ließ sich der *C. suis* S45 Stamm, der in den 60er Jahren aus dem Schweinedarm isoliert wurde, mit signifikant besserem Ergebnis in CaCo-Zellen, einer aus einem Colocarzinom generierten Zelllinie, als in VERO-Zellen kultivieren. Dies könnte begründet sein am Mangel oder der ungenügenden Ausbildung der zur Endozytose nötigen Rezeptoren. Wahrscheinlich ist dies auch der Grund, warum sich in vergleichenden Studien der Kultivierung in embryonierten Hühnereiern und Zellkultur sich die Hühnereier als wesentlich sensitiver erwiesen (Leonhard *et al.*, 1988).

Die Sequenzanalyse und das Aligment der generierten PCR-Produkte (16S RNA-Gen; *ompA*-Gen) der Isolate zeigte eindeutig die Zugehörigkeit zu der Spezies *C. suis*. Aus den erstellten Stammbäumen ist die enge Verwandtschaft der Spezies *C. suis* mit den humanpathogenen *C. trachomatis* ersichtlich. Für die zooanthroponotische Gefahr, die von *C. suis*-Spezies ausgeht, gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch nur wenige Hinweise (Longbottom und Coulter, 2003). Es gibt aber Berichte darüber, dass bestimmte Krankheitssymptome bei landwirtschaftlichem Personal, das Umgang mit Schweinen hat, gehäuft vorkommen (Bazala und Renda, 1992). Desweiteren gilt zu berücksichtigen, dass die VS4-Epitope (kodiert von *ompA*-Gen) von *C. trachomatis* und *C. suis* identisch bzw. fast identisch sind. Dieses Epitop wird in der humanen Serodiagnostik mittels mAk genutzt um eine *C. trachomatis* Infektion festzustellen. Die Übereinstimmung in diesem Epitop führt zu einer Kreuzreaktivität und kann in der Routinediagnostik zu einer Speziesfehldiagnose führen (Everett *et al.*, 1999; 2000). Den Stammbäumen (Abb. 7 und 8) ist zu entnehmen, dass die beiden Isolate der Ferkel, die von Muttersau 14 stammen, identisch waren. Dies spricht für den Sachverhalt, dass die Ferkel fäkal-oral von ihren Müttern infiziert wurden.

Mit Hilfe der PCR konnte bei einem hohen Prozentsatz (29/40, 73%) der Ferkel eine Carry-over-Infektion des Darms mit Chlamydien festgestellt werden. Bei der angewendeten PCR handelt es sich, mit einer Nachweisgrenze von  $<1$  IFU, um ein sehr sensitives Verfahren (Sachse und Hotzel, 2003). Ebenso wurden zur Aufarbeitung der klinischen Proben nur hoch spezialisierte und auf das Probenmaterial zugeschnittene DNA-Extraktionskits verwendet, die eine hohe Reinheit der DNA durch Adsorption und folgende Elution gewährleisten. Diese beiden Gründe reduzierten die Möglichkeit des Vorkommens an falsch negativen Ergebnissen auf ein Minimum. Die Sequenzanalyse der zufällig ausgewählten PCR-Produkte führte in jedem Fall zu der Diagnose *C. suis*. Da alle ausgewählten PCR-Produkte sequenzanalysiert werden konnten, wurde auch die Möglichkeit des Vorhandenseins falsch positiver Proben auf ein Minimum reduziert. Die Möglichkeit der Kreuzkontamination und „run-to-run“ Kontamination, die durch die hohe Nachweisempfindlichkeit der PCR gegeben ist, wurde durch Einhaltung eines strikten Proben-, Prozeß- und Arbeitsplatzmanagements minimiert (Peeling und Brunham, 1996; Kaltenbock *et al.*, 1997). Die Spezifität der Nested-PCR wurde durch die zusätzlich durchgeführte „16S signature sequence“ PCR validiert. Das Fehlschlagen der Weiterdifferenzierung mit Hilfe des Oligonukleotids S45241 bei den meisten Proben (11/17 bei Muttersauen; 17/29 bei Ferkeln) ist auf die fehlende Übereinstimmung im 3' Bereich durch die Insertion eines anderen Basentriplets dieser Stämme zurückzuführen. Der Oligonukleotidprimer S45241 wurde nur an einem einzigen Stamm (*C. suis* S45) generiert. Die Vertreter der Spezies *C. suis* zeichnen sich, wie man auch den Stammbäumen entnehmen kann, durch eine recht hohe Spezies-Heterogenität aus. Aus diesem Grund wurde bei der Modifikation des ursprünglichen Protokolls auf diesen Differenzierungsprimer verzichtet (Sachse *et al.*, 2003; Sachse und Hotzel, 2003).

Das Verfahren der IHC wurde zur Visualisierung der Chlamydien im Gewebe genutzt. Diese Methode ist ein exzellentes Werkzeug, um Chlamydien im Darm dazustellen und eröffnet die Möglichkeit einer semiquantitativen Auswertung. Die Aussagekraft der PCR wird wesentlich aufgewertet, da mit Hilfe der IHC eine tatsächliche Infektion und nicht die bloße Ausscheidung bewiesen wurde. Nachteilig an dieser Methode ist die mangelnde Fähigkeit, eine Speziesdiagnose stellen zu können. Dieser Sachverhalt wurde bedingt durch die Verwendung eines gattungsspezifischen Antikörpers (Ak), da für den veterinärmedizinischen Bereich keine speziesspezifischen Ak erhältlich sind. Diese sollten entwickelt werden, damit in der Veterinärmedizin ebenfalls mit der IHC eine Speziesdiagnose gestellt werden kann. Die semiquantitative Auswertung des Ausmaßes der Infektion zeigte eine stärkere Besiedlung des

*Colon descendens* als des *Colon ascendens*. Dies ist auf den Sachverhalt der reduzierten Peristaltik und des geringeren Chymustransportes zurückzuführen. Es ist zudem wahrscheinlich, dass die Infektion je nach Immunlage des Tieres und Virulenz des Stammes aszendierend fortschreiten kann. Somit wird bei natürlichen Infektionen im Gegensatz zu experimentellen Infektionen seltener eine Infektion des Dünndarms gefunden (Zahn *et al.*, 1995; Rogers und Andersen, 1996; Szeredi *et al.*, 1996; Rogers und Andersen, 2000). Als Grund ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die hohe Infektionsdosis (bis  $10^9$  IFU/ml) der Challengeversuche im Gegensatz zu den natürlichen Infektionsdosen zu betrachten. Vergleicht man die Mittelwerte der Referenzstrecke (1 mm), so sieht man, dass das Ausmaß der Infektion großen interindividuellen Schwankungen unterworfen ist (Abb. 13). Diese interindividuellen Schwankungen könnten durch die unterschiedlichen Immunlagen der einzelnen Tiere, unterschiedliche natürliche Infektionsdosis und durch Virulenzunterschiede in den Stämmen bedingt worden sein.

Das an der Zellkultur neuentwickelte hierarchische Oligonukleotidsonden-Set kam neben der IHC zur Visualisierung der Chlamydien zum Einsatz, weil mit der Methode der FISH, unter Verwendung dieser Sonden, eine Diagnose bis zur Speziesebene möglich ist. Das Charakteristikum der FISH, nur metabolisch aktive, also sich vermehrende Chlamydien nachweisen zu können, kann als weiterer Vorteil dieser Methoden gegenüber der IHC angesehen werden. Zum Anderen sollte geprüft werden, ob sich die *in-vitro* entwickelten und getesteten Sonden auch zum *in-vivo* Einsatz eignen. Die Ergebnisse aus den Hybridisierungsexperimenten bestätigten die Speziesdiagnose *C. suis* und zeigen, dass das angewandte Oligonukleotidsonden-Set ein exzellentes Werkzeug zum speziespezifischen Chlamydiennachweis im Gewebe ist.

An einer Gruppe von 24 Ferkeln wurden die Verfahren der Anzucht, PCR, IHC und FISH zum Nachweis der Chlamydieninfektion angewendet. Im Vergleich zu den anderen durchgeführten Nachweismethoden scheint die Anzucht in BGM-Zellen zur Diagnose einer latenten Chlamydieninfektionen des Schweinedarms nicht als sichere Nachweismethode geeignet, denn mit dieser Methode des Chlamydiennachweises konnten nur fünf Ferkel als *Chlamydia*-positiv ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnte mit der PCR bei 18/24 Tieren eine Chlamydieninfektion diagnostiziert werden. Mit der Methode der IHC gelang der Chlamydiennachweis bei 14/24 Tieren. Die geringere Sensitivität dieser Methode ergab sich aus dem Sachverhalt, dass für den positiven Nachweis in den Chlamydieninklusionen eine

ausreichende Menge an Ag vorhanden sein musste. Auch durch die Fixierung können die Ag denaturiert werden, wodurch eine Anlagerung der Ak nicht mehr stattfinden konnte. Ebenso wurde bei der PCR, durch Aufarbeitung der abgelösten Mukosa, ein größeres Areal an Gewebe auf etwaige Chlamydieninfektion untersucht. Das schlechtere Abschneiden der FISH gegenüber der IHC wurde höchstwahrscheinlich durch die Eigenschaft verursacht, dass nur metabolisch aktive Chlamydien detektierbar sind. Die Übereinstimmung der positiven und negativen Ergebnisse im Vergleich der vier Untersuchungsmethoden lag jedoch bei 100% (Abb.17). Das heißt, dass alle Tiere die in der Anzucht positiv waren auch in der FISH *Chlamydia*-positiv waren. Die positiven Tiere der FISH waren in der IHC positiv und diese wiederum waren in den PCR-Untersuchungen als Chlamydienträger diagnostiziert. Dieses spricht dafür, dass es nur wenige falsch positive und falsch negative Ergebnisse in der untersuchten Population gibt.

Der Vergleich der Methoden zeigte, dass die Anzucht in BGM-Zellen zum Nachweis einer latenten Chlamydieninfektion des Darms beim Schwein nicht als sicheres diagnostisches Verfahren gelten kann. Die besten Ergebnisse konnten mit der PCR erzielt werden. Diese Methode, insbesondere bei der Untersuchung von Ausscheidungs- oder Tupferproben, sollte als Methode der Wahl bei der Einzeltierdiagnostik gelten. Wenn man bei der Herdendiagnose die PCR-Untersuchung von gepoolten Proben vornehmen würde, wäre dieses Verfahren aus finanzieller Sicht tatsächlich einsetzbar. Bei der Untersuchung von Gewebeproben sind sowohl die IHC und die FISH mit guter diagnostischer Sicherheit einsetzbar. Der Vorteil der FISH gegenüber der IHC besteht in der Möglichkeit zu einer Speziesdiagnose zu gelangen, solange der speziesspezifische Ak nicht auf dem Markt ist. Der Vorteil der Oligonukleotidsonden gegenüber den Ak liegt in der einfacheren und sicheren Herstellung. Somit kann man die FISH als die zukunftsreichere Methode bewerten.

### 5.3. Schlussfolgerungen

An Hand der von uns untersuchten Schweinepopulation konventioneller Herkunft lässt sich der angenommene hohe Prozentsatz an latenten Infektionen des Darms mit Chlamydien bestätigen. *Chlamydia suis* war bei unseren Untersuchungen die beim Schwein dominierende Spezies. Weiterhin konnte ein hoher Prozentsatz an vertikaler Infektion nachgewiesen werden.

Um eine Chlamydieninfektion an Hand der Untersuchung von Ausscheidungsprodukten nachweisen zu können, bedarf es der wiederholten Untersuchung. Zum Chlamydiennachweis der latenten Darminfektion scheint die Anzucht in BGM-Zellen als ungeeignet. Das Nachweisverfahren der Polymerase-Kettenreaktion erwies sich als die sensitivste Methode. Aber auch die Verfahren der Immunhistochemie und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung führten bei der Untersuchung von Gewebe zu sehr zufrieden stellenden Ergebnissen.

Der beobachtete Unterschied in der Infektionsrate in beiden Fütterungsgruppen kann als infektionsmindernder Effekt angesehen werden, der durch die Fütterung mit *Enterococcus faecium* hervorgerufen wurde.