

Aus dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

---

**Untersuchungen zu den immunmodulatorischen Eigenschaften des  
Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF 68) auf die zelluläre  
Immunität beim Schwein während eines Experiments mit *Salmonella*  
*enterica* Serovar *Typhimurium* DT104**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Hassan Mafamane  
Tierarzt aus Marokko

Berlin 2008

Journal Nr.: 3262

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Gruber  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K. D. Weyrauch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Probiotics, enterococcus faecium, salmonella typhimurium, pigs, immunity

Tag der Promotion: 27.03.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-598-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Gewidmet

**Petra Hachtmann**

„Go confidently in the direction of your dreams! Live the life you've imagined. As you simplify your life, the laws of the universe will be simpler“

**Henry David Thoreau (1817 - 1862)**



<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
2.1. Darmkanal des Schweins.....	3
2.1.1. Anatomische Anordnung und Besonderheiten .....	3
2.1.2. Histologischer Aufbau des Darmkanals .....	4
2.1.3. Darmkanal als Ökosystem .....	5
2.2. Zelluläre Immunität.....	6
2.2.1. Wichtige Gewebe des Immunsystems .....	6
2.2.1.1. Milz .....	6
2.2.1.2. Tonsillen .....	7
2.2.1.3. Blut.....	8
2.2.1.4. Lymphknoten.....	10
2.2.1.5. Das darmassoziierte Immunsystem.....	12
2.2.1.5.1. Die intraepithelialen Lymphozyten (IEL).....	13
2.2.1.5.2. Die <i>Lamina propria</i> .....	15
2.2.1.5.3. Die Peyerschen Platten und ihre immunologische Funktion.....	15
2.3. Differenzierungsantigene des Schweins.....	18
2.4. Salmonellen.....	21
2.4.1. Mikrobiologische Einordnung der Salmonellen .....	21
2.4.2. Pathogenese der Salmonelleninfektion .....	21
2.4.2.1. Die Resistenzlage des Individuums gegenüber Infektionserregern .....	21
2.4.2.2. Die Pathogenität der Salmonellenserovare.....	22
2.4.2.3. Virulenzfaktoren der Salmonellen .....	23
2.4.3. Akute und latente Salmonelleninfektion .....	24
2.5. Probiotika .....	24
2.5.1. Geschichte und Definition.....	24
2.5.2. Die häufig eingesetzten Probiotika.....	26
2.5.3. Wirkungsmechanismen von Probiotika .....	27
2.5.3.1. Allgemein.....	27
2.5.3.2. Diskutierte Wirkungsmechanismen von Probiotika.....	28
2.5.3.2.1. Allgemeine Wirkungsmechanismen .....	29
2.5.3.2.1.1. Die Besiedlung des Magen-Darm-Trakts .....	29
2.5.3.2.1.2. Veränderungen des intestinalen Milieus .....	31
2.5.3.2.1.3. Veränderungen der Enzymaktivität.....	32
2.5.3.2.1.4. Veränderungen der Darmmorphologie und Transportphysiologie.....	33
2.5.3.2.1.5. Konkurrenzen um Nährstoffe.....	33
2.5.3.2.2. Spezielle Wirkungen auf das Immunsystem.....	34
2.5.3.2.2.1. Wirkung auf das unspezifische Immunsystem .....	34
2.5.3.2.2.2. Wirkung auf das spezifische Immunsystem.....	35
2.5.4. <i>Enterococcus faecium</i> .....	39
2.5.4.1. Allgemeine Eigenschaften .....	39
2.5.4.2. Wirkungsweise des Probiotikums <i>E. faecium</i> .....	41
<b>3. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>43</b>
3.1. Material.....	43
3.1.1. Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	43
3.1.1.1. Reagenzien.....	43
3.1.1.2. Mikroorganismen .....	44
3.1.1.2.1. Das Probiotikum <i>Enterococcus faecium</i> SF68 (NCIMB 10415).....	44
3.1.1.2.2. <i>Salmonella typhimurium</i> DT104.....	44

## Inhaltsverzeichnis

3.1.1.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	45
3.1.1.3.1. Primäre monoklonale Antikörper .....	45
3.1.1.3.2. Nachweisantikörper .....	46
3.1.1.4. Verbrauchsmaterialien .....	47
3.1.1.5. Geräte .....	47
3.1.2. Lösungen .....	48
3.1.3. Studiendesign .....	49
3.1.3.1. Versuchstiere .....	49
3.1.3.2. Interventionsstudien .....	51
3.1.3.3. Versuchsdäten .....	51
3.1.3.4. Infektion mit <i>Salmonella</i> .....	52
3.1.3.5. Tötung der Tiere .....	52
3.1.3.6. Probenentnahme und –transport .....	53
<b>3.2. Methoden .....</b>	<b>54</b>
3.2.1. Isolierung von Immunzellen aus den verschiedenen Organen .....	54
3.2.1.1. Isolierung mononuklearer Zellen aus Peripherblut .....	54
3.2.1.2. Isolierung von Immunzellen aus der Milz .....	55
3.2.1.3. Isolierung der Immunzellen aus den Peyerschen Platten .....	55
3.2.1.4. Isolierung von Immunzellen aus mesenteriiellen Lymphknoten .....	56
3.2.1.5. Isolierung von Immunzellen aus Tonsillen .....	56
3.2.1.6. Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) .....	56
3.3. Durchflusszytometrische Messungen .....	57
3.3.1. Grundlage der Durchflusszytometrie .....	57
3.3.2. Nachweis und Differenzierung von Lymphozytensubpopulationen (Immunphänotypisierung) ..	60
3.3.2.1. Prinzip der Phänotypisierung .....	60
3.3.2.2. Durchführung .....	61
3.4. Statistische Auswertung.....	66
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>69</b>
4.1. Phänotypisierung der Immunzellen aus dem Blut mittels Durchflusszytometrie .....	69
4.1.1. Ergebnisse der Blutanalyse am 21. Lebenstag (vor Salmonellen-Infektion) .....	76
4.1.1.1. CD8 $\beta$ <sup>+</sup> Subpopulation .....	77
4.1.2. Ergebnisse der Phänotypisierung von Immunzellpopulationen aus den Blutproben nach der experimentellen Salmonellen-Infektion .....	78
4.1.2.1. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	78
4.1.2.2. CD8 $\beta$ <sup>+</sup> -Zellen .....	80
4.2. Ergebnisse der Phänotypisierung der Immunzellpopulationen aus Milzgewebe .....	83
4.2.1. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	85
4.2.2. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> -Zellen .....	86
4.2.3. CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	88
4.3. Ergebnisse der Phänotypisierung der Immunzellpopulationen aus den ilealen Peyerschen Platten (Distale PP) .....	92
4.3.1. CD16 <sup>+</sup> -Zellen .....	94
4.4. Ergebnisse der Phänotypisierung der Immunzellpopulationen aus den jejunalen Peyerschen Platten (prox. PP) .....	97
4.4.1. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> -Zellen .....	100
4.4.2. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	102
4.4.3. CD21 <sup>+</sup> -Zellen .....	103

4.5. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von intraepithelialen Lymphozyten (IEL).....	106
4.5.1. CD1 <sup>+</sup> -Zellen.....	108
4.5.2. CD3 <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> -Zellen.....	110
4.5.3. CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> -Zellen.....	112
4.5.4. CD8 $\beta$ <sup>+</sup> -Zellen.....	114
4.5.5. CD45 <sup>+</sup> -Zellen.....	116
4.6. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von Immunzellen aus den mesenterialen Lymphknoten.....	119
4.6.1. CD14 <sup>+</sup> -Zellen.....	121
4.6.2. CD16 <sup>+</sup> -Zellen.....	122
4.7. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Immunzellen aus den Tonsillen.....	124
4.7.1. CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen.....	126
4.7.2. CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> -Zellen.....	128
4.7.3. TCR1 <sup>+</sup> -Zellen ( $\gamma\delta$ -T-Zellen).....	129
4.7.4. CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	131
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>134</b>
5.1. Das Studiendesign.....	134
5.1.1. Das Schwein als Tiermodell.....	135
5.1.2. Versuchsdiät.....	135
5.1.3. Auswahl der Salmonelleninfektionsdosis und der Infektionsmethode.....	135
5.1.4. Auswahl der Proben und Tötungszeitpunkte.....	139
5.1.5. Auswahl der untersuchten Immunzellpopulation.....	141
5.2. Einfluss der probiotischen Supplementierung auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation.....	143
5.2.1. CD8 <sup>+</sup> -Zellen und CD16 <sup>+</sup> -Zellen.....	143
5.2.2. CD45 <sup>+</sup> -Zellen: Anteil der Leukozyten im Darmepithel.....	147
5.2.3. CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> -Zellen.....	148
5.2.4. CD16 <sup>+</sup> -Zellen.....	150
5.3. Integrative Analysen weiterer Ergebnisse innerhalb der Forschergruppe.....	154
5.4. Mögliche Mechanismen der Immunmodulation durch Probiotika.....	155
5.5. Einordnung der Ergebnisse und Ausblick.....	160
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>162</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>165</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>167</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>197</b>
<b>10. DANKSAGUNG.....</b>	<b>202</b>
<b>11. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>203</b>



**Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen**

Soweit nicht anders aufgeführt wurden SI-Einheiten ("Système International d'Unités") verwendet.

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
ANOVA	Varianzanalyse
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation (Zellulären Differenzierungsantigen)
CFU	colony forming unit (Koloniebildende Einheit)
DC	dendritische Zellen
DTT	DL-Dithiothreitol
E.	<i>Enterococcus</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FACS	fluorescence activated cell Scanning ( Durchfluscytometer)
FAE	follikelassoziertes Epithel
Fc <sub>γ</sub> R	Fc <sub>γ</sub> -Rezeptor
FITC	Fluoresceinthiozyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulich)
GALT	gut associated lymphoid tissue ( darmassoziertes lymphatisches Gewebe)
HEV	hohe Endothelvenolen
HBSS	Hank`s gepufferte Salzlösung
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
INF (γ)	Interferon (gamma)
Ig	Immunglobulin (e)
IL	Interleukine
KGW	Kilogramm Körpergewicht
Lac	<i>Lactobacillus</i>
Lp	Lamina Propria
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MHC I	Major Histocompatibility Complex ( Haupthistokompatibilitätskomplex I)

## Abkürzungen

---

MLK	mesenteriale Lymphknoten
M-Zellen	microfold bearing bzw. Membranous cell
NK	Natural Killer
nm	Nanometer
PBMC	Periphere Blutmononukläre Zellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PP	Peyersche Platten, Peyersche Streifen
Prox.	Proximal
SD	Standardabweichung
SED	subepitheliale Domregion
SSC	Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)
SWC	Swine leukocyte workshop cluster (porzine Differenzierungsantigene)
T <sub>H</sub>	T-Helfer Zelle
TcR	Zell-Rezeptor
T <sub>s/c</sub>	T-suppressor/ zytotoxische-Zellen
T <sub>r</sub>	regulatorische T-Zellen
TM	Trockenmasse

### 1. Einleitung

Um die Verlusten aufgrund von Durchfallerkrankungen in der Ferkelproduktion und -aufzucht so gering wie möglich zu halten und um bessere Aufzuchtleistungen zu erzielen, werden seit nahezu 50 Jahren Antibiotika in der Schweineproduktion eingesetzt (KYRIAKIS et al., 1999). Antibiotika-Rückstände in den Lebensmitteln tierischer Herkunft und zunehmende Resistenz-Probleme sowie das neue Bewusstsein der Verbraucher, welches den Einsatz von Antibiotika zunehmend ablehnt, waren u. a. Gründe, die im Jahr 2006 zu einem absoluten Verbot aller antibiotischen Leistungsförderer in der Tierproduktion seitens der EU-Kommission führten.

Um den Gesundheitsstatus der Jungtiere in der Schweineproduktion zu verbessern und um die Produktionseffizienz zu erhöhen, traten andere Additiva an die Stelle der Antibiotika, welche direkt auf die Modifikation der intestinalen Flora ausgerichtet sind. U. a. finden Enzyme, pflanzliche Futterzusatzstoffe, organische Säuren, seltene Erden, Präbiotika, Probiotika und Synbiotika heute Einsatz in der Schweinfütterung.

Besonders den Probiotika werden viele positive Einflüsse auf die Gesundheit zugesprochen, sie erfreuen sich deshalb zunehmender Beliebtheit, nicht nur in der Tierfütterung, sondern auch in der Humanernährung.

Ein Probiotikum wird als „lebender mikrobieller Futterzusatz“ definiert, der eine vorteilhafte Wirkung auf den Wirtsorganismus hat, indem er dessen intestinales mikrobielles Gleichgewicht verbessert (FULLER, 1989).

Positive Wirkungen von Probiotika auf den Magen-Darm-Trakt sind seit langem beschrieben: Neben den positiven Effekten bei Durchfallerkrankungen, Antibiotika-assoziiertes Diarrhöe (SIITONEN et al., 1990), infektiös-bedingter Diarrhöe vor allem durch Rotaviren bei Kindern (HUANG et al., 2002) wurden Probiotika auch in der Allergie-Prävention (atopische Dermatitis) eingesetzt (KALLIOMÄKI et al., 2001). Hinweise auf die Wirksamkeit von Probiotika bei Reisediarrhöe, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Reizdarmsyndrom sowie bei *Helicobacter pylori*-bedingter Gastritis mehrten sich (BORRUEL et al., 2002; CINDORUK et al., 2007).

Die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen von Probiotika sind zum größten Teil noch unbekannt. Neben einer positiven Modulierung der Darmflora, einer Verbesserung der Transportmechanismen im Darmepithel und der Beeinflussung der Krypten- und Zotten-Morphologie im Darm werden auch immunmodulatorische Eigenschaften als Wirkungsmöglichkeit postuliert.

## **Einleitung**

---

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines integrativen Projektes<sup>1</sup> der Freien Universität Berlin, an dem mehrere Institute fachübergreifend zusammen arbeiten, um die möglichen Wirkungsmechanismen von Probiotika aufzuklären.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Challenge-Experiments mit *Salmonella typhimurium* DT104 die Auswirkung einer probiotisch supplementierten Fütterung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) auf die zelluläre Immunität von Ferkeln zu untersuchen.

Unter standardisierten Bedingungen wurde zu diesem Zweck das Futter von Sauen und Ferkeln mit dem o. g. Probiotikum supplementiert. Im Alter von 28 Tagen wurden Ferkel eines Wurfes mit einer definierten Menge an *Salmonella typhimurium* DT104 intragastral infiziert. Proben aus Blut, Milz, Lymphknoten, Tonsillen, sowie aus anatomisch definierten Lokalisationen im Darm wurden nach der Tötung der Tiere entnommen. Aus diesen Proben wurden jeweils die Immunzellen isoliert. Durch den Einsatz des Verfahrens der Durchflusszytometrie war es möglich, die Anzahl und die Zusammensetzung der Immunzellen in jedem Organ zu studieren und mit der einer Kontrollgruppe (ohne Probiotikum-Fütterung) zu vergleichen.

---

<sup>1</sup> DFG-Forschergruppe (For 438): Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein.

## 2. Literaturübersicht

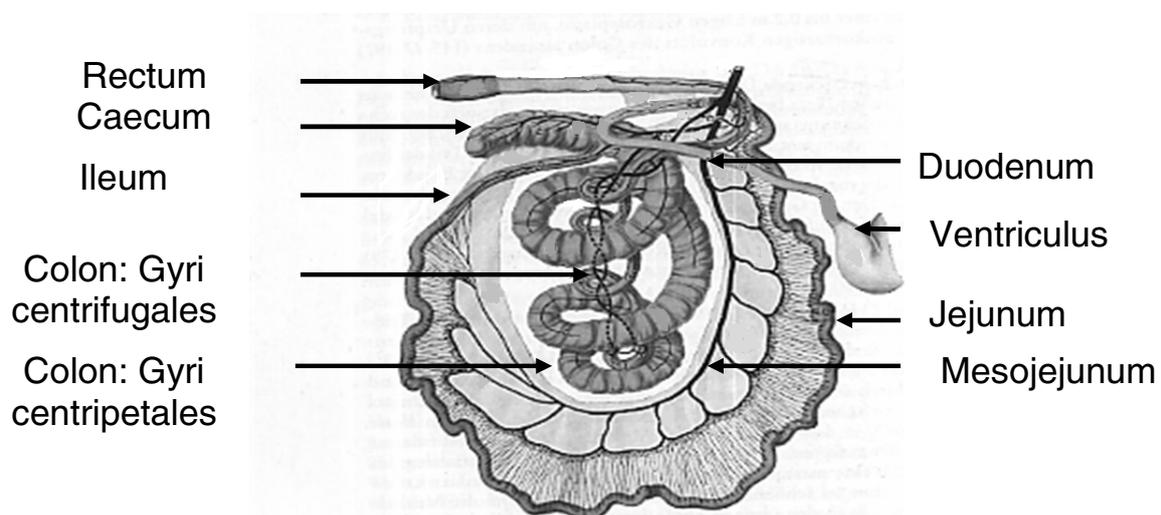
### 2.1 Darmkanal des Schweins

#### 2.1.1. Anatomische Anordnung und Besonderheiten

Der Darmkanal setzt sich beim Schwein aus dem Dünndarm (*Intestinum tenue*), dem Dickdarm (*Intestinum crassum*) sowie einem Afterkanal (*Canalis analis*) zusammen. Der Dünndarm wird in drei anatomisch definierte Abschnitte unterteilt: den Zwölffingerdarm (*Duodenum*), den Leerdarm (*Jejunum*), der der längste Abschnitt ist, und den Hüftdarm (*Ileum*), den kürzesten Abschnitt. Beim Dickdarm unterscheidet man den Blinddarm (*Caecum*), den Grimmdarm (*Colon*) und den Mastdarm (*Rectum*). Das Dickdarmkonvolut ist im Vergleich zu anderen Säugetieren besonders angeordnet. Die Verlängerung des *Colon ascendens* führt zu einer spiralförmigen Aufrollung mit zentripetalen und zentrifugalen Windungen, die sich zum sog. Kolonkegel turbanartig auftürmen (NICKEL, 1987). Der Dickdarm dient der Nachfermentation enzymatisch verdauter Substanzen (SIMON et al., 2001). Die abrupte Verengung des Kolonkegels in seinem unteren Teil führt zu einem Rückstau der Futtermassen und begünstigt damit den langsam ablaufenden Zellulose-Abbau (Abb. 2.1. Darmkanal des Schweins)

Das Schwein gehört zu den omnivoren Tieren. Seine Darmlänge beträgt das 15-fache seiner Körperlänge und ist somit deutlich länger als bei den Carnivora.

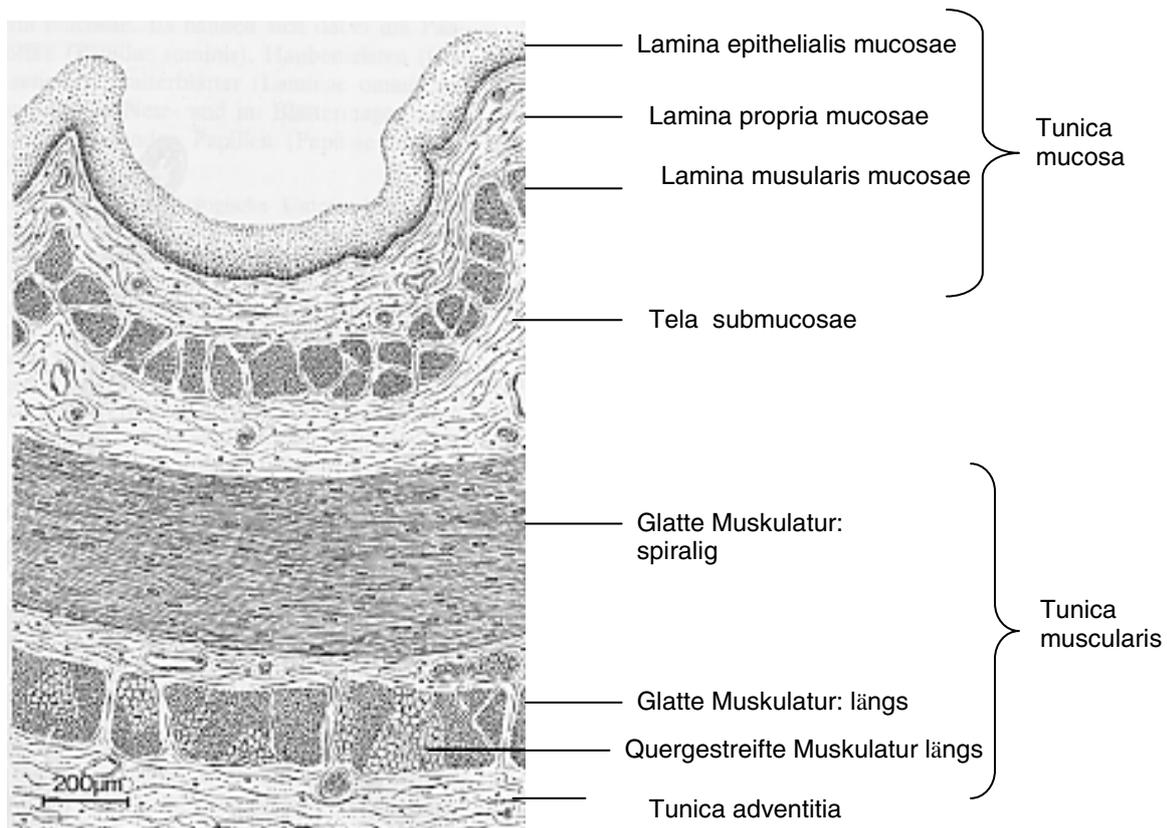
Neben seiner Funktion als Absorptionsfläche für Nährstoffe und Wasser (SCHWARZ, 1962; SMOLLICH & MICHEL, 1992) fungiert der Verdauungskanal als eines der größten und wichtigsten Organe der Immunabwehr.



**Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Darmkonvolutes des Schweins modifiziert nach NICKEL & SCHUMMER (1987)

### 2.1.2. Histologischer Aufbau des Darmkanals

Ungeachtet der verschiedenen funktionellen Aufgaben der einzelnen Darmabschnitte liegt der Wandstruktur des Darms ein einheitlicher Bauplan zugrunde. Die innerste Schicht bildet die Schleimhaut (*Tunica mucosa*), sie kleidet die Gesamtheit des Darmkanals lumenwärts aus. Ihr liegt die lockere *Tela submucosa* auf, die die Schleimhaut von der Muskelhaut, (*Tunica muscularis*) abgrenzt und große Lymph- und Blutgefäße sowie den submucösen Nervenplexus (*Meissnerscher Plexus*) einschließt. Die *Tunica muscularis* besteht aus einer inneren Schicht zirkulärer glatter Muskelfasern (*Stratum circulare*) und einer äußeren Schicht longitudinaler, glatter Muskelfasern (*Stratum longitudinale*). Zwischen den beiden Muskelschichten liegt der Auerbachplexus (*Plexus myentericus*) im elastischen *Stratum intermusculare* eingebettet. Zur Bauchhöhle hin wird die Darmwand von der dünnen *Tunica serosa* bzw. der *Tunica adventitia* in serosafreien Körperteilen ausgekleidet. (Abb. 2.2)



**Abb. 2.2** Histologischer Aufbau des Oesophagus nach MOSIMANN & KOHLER (1990)

Durch die Einfaltung der Darmschleimhaut bilden sich sog. Krypten oder Darmdrüsen. Durch Ausstülpungen der *Lamina propria mucosae* bilden sich im Bereich des Dünndarmes sog.

Zotten. Durch die Zotten- und Kryptenbildung wird eine erhebliche Oberflächenvergrößerung erreicht. Beim Schwein sind die Zotten im *Duodenum* als mittellang und dick, im *Jejunum* als lang und dünn und im *Ileum* als kurz und dünn beschrieben (REITER et al., 2006). Die Länge der Zotten und die Tiefe der Krypten hängen neben dem Alter der Tiere auch von der Fütterung ab (HALL et al., 1989; HAMPSON et al., 1986).

### 2.1.3. Darmkanal als Ökosystem

Während der embryonalen Phase ist der Fetus keimfrei (SCHULZE et al., 1978), aber schon während der Geburt kommt das Neugeborene mit den Keimen aus der Umwelt in Berührung. Die Etablierung der gastrointestinalen Mikroflora erfolgt in Beziehung zur Umwelt (ROLLE & MAYER, 2002). Vor allem Vaginalflora, Hautflora, Fäkalmaterial, Milch, Zitzenkanal sowie Kolostrum sind die Hauptquellen der Keime, die sich im Magendarmkanal des Neugeborenen ansiedeln. Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien, Propionibakterien, Bifidobakterien und Hefen siedeln sich bereits während der ersten Lebensstunden an und bilden die sog. Erstflora (SMITH & JOHN, 1963), während Laktobazillen sich erst zu einem späteren Zeitpunkt ansiedeln. Nachdem sich der pH-Wert im Magen niedrig eingestellt hat, ca. drei Tage nach der Geburt, wird die Vermehrung der Coli-Bakterien, Streptokokken, Mirkokokken und Clostridien im Dünndarm unterdrückt, zugunsten der Laktobazillen, die sich nun stark vermehren und zahlenmäßig überwiegen.

Durch die Produktion von Milchsäure helfen die Laktobazillen, den pH-Wert aufrecht zu erhalten (WIEHLER, 1989). Ab einem Alter von vier Tagen sind ausreichend anaerobe Bedingungen im Dickdarm erreicht, so dass die Ansiedlung von *Bacteroides spp.* erfolgt. Eine stabile Darmflora baut sich auf. Diese Darmflora wird von Bakterien, Protozoen und Hefen gebildet. Es wird geschätzt, dass über 400 Bakterienarten im Verdauungstrakt vorkommen, wovon die meisten noch nicht bekannt sind. Im Magen von Schweinen gibt es  $10^7$  bis  $10^9$  Bakterien pro Gramm Mageninhalt, wobei die Laktobazillen dominieren. Die Dichte der Mikroorganismen (Mikroorganismen pro Gramm Darminhalt) nimmt im Verlauf des Verdauungstraktes zu. Während im Dünndarminhalt ca.  $10^3$  bis  $10^7$  Zellen pro Gramm Trockenmasse enthalten sind, sind es ca.  $10^{12}$  Keime pro Gramm Trockenmasse im Dickdarm. Entlang des Verdauungstraktes ändert sich auch die Zusammensetzung der Mikroflora. Im vorderen Dünndarm dominieren funktionell Milchsäurebakterien, während die Bakterien im Dickdarm vorwiegend den strikt anaeroben Bakterienarten angehören (LESER, 2002). Es sind fast ausschließlich obligat anaerobe gramnegative und grampositive Bakterien vorhanden. Zu diesen gehören vor allem Arten der Gattung *Bacteroides*, *Eubacterium*,

## Literaturübersicht

---

*Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* und *Clostridium*. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass unser Wissen über die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes in erster Linie auf der Analyse luminaler Proben basiert. Es ist aber bekannt, dass ein erheblicher Teil der Bakterien mit der Darmschleimhaut assoziiert ist und in enger Wechselwirkung mit ihr steht (SIMON et al., 2004). Dies erschwert wesentlich die Einschätzung der tatsächlich relevanten Besiedlung.

**Tabelle 2-1** Gesundheitsfördernde Effekte der residenten Mikroflora im GI nach Berg (1996)

Antagonistische Beziehung von Mikroorganismen	Detoxifizierende Effekte auf Toxine	Weitere gesundheitsfördernde Effekte
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Bakteriophagie durch Protozoen, Viren und Bakterien</li><li>➤ Mykophagie durch Protozoen</li><li>➤ Antagonismus durch Bakterieninterferenz</li><li>➤ Kolonisationsresistenz gegenüber pathogenen Mikroorganismen</li><li>➤ Nahrungskonkurrenz</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Deteoxifizierung von Mykotoxin durch Bakterien (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>) und Protozoen</li><li>➤ Detoxifizierung von Endotoxin durch <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Bildung von Vitamin K und B-Komplex</li><li>➤ Umwandlung von präkarzinogenen und karzinogenen Substanzen in nichtcarcinogene</li><li>➤ Aufrechterhaltung der Mukosabarriere und Darmperistaltik durch Bildung von Energieträgern wie Buttersäure, Milchsäure und Glutamin</li><li>➤ Stimulation des Immunsystems durch immunogene Peptide (Propionibakterien, Eubakterien...)</li></ul>

## 2.2. Zelluläre Immunität

### 2.2.1. Wichtige Gewebe des Immunsystems

Milz, Lymphknoten, Tonsillen, darmassoziiertes Immunsystem

#### 2.2.1.1. Milz

Die Milz, ein peripheres, sekundäres lymphatisches Organ, liegt im Abdomen und grenzt an Magen, Zwerchfell, Pankreas und Colon, mit denen sie über Bänder verbunden ist. Sie besteht aus einem Geäst verzweigter Gefäße, die mit lymphatischem Gewebe, der weißen Pulpa, überzogen sind. Der Bereich der roten Pulpa, benannt nach ihren großen, blutgefüllten Gefäßen, dient als Blutfilter zur Entfernung alter Erythrozyten durch Makrophagen der Milz (Erythrophagozytose).

Der Blutstrom wird durch die sog. Randzone an der weißen Pulpa vorbeigeführt, deren Zellen für die immunologische Überwachung des Blutes sorgen (MEBIUS & KRALL, 2005). Zwar ähnelt der Bau der Milz dem der Lymphknoten, jedoch fehlen der Milz afferente Lymphgefäße, die Antigen über die Lymphe ins Organ transportieren. Antigen, das in der Milz ankommt, stammt daher ausschließlich aus dem Blut (CRIVELLATO et al., 2004).

Die weiße Pulpa ist kompartimentiert in die periarterielle Lymphscheide, die T-Zell-Region, die dendritische Zellen enthält, und in eine damit verzahnte folliculäre B-Zell-Region, in deren Keimzentren sich B-Zellen vermehren, mit folliculären dendritischen Zellen. Die Randzone, welche die periarterielle Lymphscheide und Follikel umgibt, enthält strategisch günstig positionierte Makrophagen und dendritische Zellen, die Antigene aus dem durchfließenden Blutstrom aufnehmen und durch die Nähe zu B- und T-Zellen eine adaptive Immunantwort auslösen können. Außerdem befinden sich in der Randregion ruhende B-Zellen, die auch als antigenpräsentierende Zellen fungieren können, sich aber von folliculären B-Zellen unterscheiden (MEBIUS & KRALL, 2005; VAN DEN EETEWEGH et al., 1992). NK-Zellen kommen in der Milz hauptsächlich in der roten Pulpa vor, bilden aber einen geringen Lymphozytenanteil in dem Kompartiment der weißen Pulpa (VAN DEN EETEWEGH et al., 1992).

Die Milz dient also einerseits zur Phagozytose von alten Erythrozyten, andererseits werden in der Randregion auch pathogene Keime phagozytiert, die anschließend in der weißen Pulpa adaptive Immunreaktionen auslösen, so dass antigenspezifische B-Zellen und damit Antikörper, aber auch antigenspezifischen T-Lymphozyten gebildet werden (MEBIUS & KRALL, 2005).

Die Milz des Schweins besteht aus verhältnismäßig ausgewogenen Anteilen lymphatischen Gewebes und Blutgewebe zur Blutspeicherung (HALEY et al., 2003). Bei Menschen besteht die Milz aus einem weitaus höheren Anteil an lymphatischen Gewebe und einem geringeren Anteil Blutspeichergewebes.

### **2.2.1.2. Tonsillen**

Die Rachengegend ist reich an Lymphzentren, die sich teilweise zu Tonsillen zusammenlagern. Alle Tonsillen zusammen werden auch als lymphatischer (Waldeyerscher) Rachenring bezeichnet (LOEFLER et al., 2002). Beim Schwein sind die *Tonsilla veli palatini* und *Tonsilla tubaria* besonders gut ausgebildet. Gegen die Umgebung sind die Tonsillen durch eine Bindegewebskapsel abgegrenzt. Sie besitzen zahlreiche Blutgefäße aber nur

efferente Lymphgefäße. Die *Noduli lymphatici* der Tonsillen stehen in einer engen Beziehung zum Oberflächenepithel, welches die innere Auskleidung bildet.

Die Lymphozyten durchwandern das Deckepithel und gelangen so in die unmittelbare Nähe der Oberfläche, wo sie Kontakt mit Antigenen aufnehmen können. In den Tonsillen bilden sich ähnlich wie in den Lymphknoten, sekundäre Lymphfollikel aus. Die immunologischen Funktionen der Tonsillen sind zahlreich. Durch die Tonsillen wandern Lymphozyten, Zytokine und chemotaktische Moleküle, die eine schnelle Immunantwort ermöglichen (HORTE & YOON 2003). Die Produkte der Plasmazellen, die Antikörper, gelangen auf die Schleimhautoberfläche und bieten so Schutz vor pathogenen Keimen.

Die Quantifizierung der Lymphozytensubpopulation innerhalb der Tonsillen des Schweins wurde in zahlreichen Studien beschrieben. Je nach Alter und Immunstatus der untersuchten Schweine waren die Angaben sehr unterschiedlich (BOEKER et al., 1999; SALLES & MIDDLETON, 2000; TERZIĆ et al., 2002).

T-Lymphozyten machen etwa 75% aller in den Tonsillen vorhandenen Lymphozyten, B-Lymphozyten weniger als 25% aus. Ca. 92% aller T-Lymphozyten setzten sich aus 2% CD4+, 47% CD8+ oder 43% CD4+CD8+ und ca 8%  $\delta\gamma$ -T-Zellen zusammen. (BOEKER et al., 1999; SALLES & MIDDLEZON, 2000).

### **2.2.1.3. Blut**

Die Vorläufer der Lymphozyten wandern während der Fetalentwicklung aus den blutbildenden Geweben (fetale Leber) in das Knochenmark ein, differenzieren sich dort weiter aus, um wieder in den Blutkreislauf einzutreten. Aus Stammzellen entwickeln sich die myeloische und die lymphatische Zelllinie. Ein Teil der Lymphozyten durchwandert den Thymus, wo sie lernen, Selbst-Antigen und Fremd-Antigen zu unterscheiden (sog. Prägung) (STAINES et al., 1994).

Unreife Thymozyten tragen keine oberflächlichen Antigenrezeptoren. Auf dem Weg zur Medulla des Thymus beginnen sie, diese zu exprimieren und migrieren dann als reife T-Lymphozyten in den Blutstrom, in die Lymphbahn und in das periphere Lymphgewebe (ABBAS et al., 1996). Lymphozyten im Blutstrom tendieren dazu, in zwei Populationen zu segregieren: eine Gruppe zirkuliert zwischen dem Blutstrom und dem systemischen lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz und Knochenmark); die andere Population zirkuliert zwischen dem Blutstrom und den mukosalen lymphoiden Geweben (STRAW et al., 1999).

Die Angaben in der Literatur über die Zusammensetzung peripherer Blutlymphozyten-Subpopulationen beim Schwein variieren. So wird die Gesamtzahl von Lymphozyten im Blut mit  $10^7/\text{ml}$  Blut angegeben (BINNS et al., 1982). Davon sind 10-20 % B-Zellen, 40-70 % T-Zellen, die E-Rosetten formen und 30-40 % Null-Zellen, die keine E-Rosetten formen (T-Zellen lagern sich in Rosetten an Schafererythrozyten, bekommen damit eine höhere Dichte und lassen sich mittels Ficoll-Dichtegradient von den restlichen Leukozyten trennen).

Die Gesamtheit der peripheren Blutlymphozyten setzt sich demnach zusammen aus  $\alpha\beta$ -T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und B-Zellen, sowie Zellen die weder B- noch T-Zellen sind und Natural-Killer-Aktivität zeigen (YANG & PARKHOUSE, 1996).

CD2 ist ein Adhäsionsmolekül, das LFA-3 bindet und von aktivierten T-Zellen und Natural Killer exprimiert wird (PESCOVITZ et al., 1984; PESCOVITZ et al., 1998). In einer Studie zur Phenotypisierung porciner Lymphozytenoberflächenmarker konnte gezeigt werden, dass sich CD2 nicht als Pan-T-Zellmarker eignet, da CD2 auch von NK- und B-Zellen exprimiert wird, CD3 kann hingegen als Pan-T-Zellmarker verwendet werden. CD3 ist ein Teil des Rezeptors der T-Zellen und wird auf die T-Zellen während aller Entwicklungsstadien exprimiert. Daher eignet sich CD3 als Pan-T-Zellmarker (YANG & PARKHOUSE, 1996).

Die weitere Differenzierung der Lymphozytensubpopulation im Blut von vier Wochen alten Schweinen nach YANG & PARKHOUSE (1996) ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2-2** Lymphozytensubpopulationen: Prozentualer Anteil an Gesamtlmphozyten (nach YANG & PARKHOUSE, 1996)

Lymphozytensubpopulationen	Prozentualer Anteil an Gesamtlmphozyten
<b><math>\alpha\beta</math>-T-Zellen ( CD2+)</b>	<b>12± 3,7</b>
CD4+CD8-	2,1 ±0,9
CD4+CD8 <sup>low</sup>	2,2 ±1,4
CD4-CD8 <sup>low</sup>	3,7 ±1,4
CD4-CD8 <sup>high</sup>	4 ±1,5
<b><math>\delta\gamma</math>-T-Zellen</b>	<b>23,9± 6,5</b>
CD2+CD8 <sup>low</sup>	2,2±1
CD2+CD8-	1± 1
CD2-CD8-	20,7± 5
<b>NonT- Non B-T-Zellen</b>	<b>31,7 ±12</b>
CD2+CD8 <sup>low</sup>	27,7 ±13,3
CD2+CD8-	2,3 ±1,7
CD2-CD8-	1,8 ±1
<b>B-Zellen</b>	<b>32,4±12,8</b>

Im Vergleich zu anderen lymphatischen Strukturen wie z. B. Milz oder Lymphknoten, sind im Blut weniger  $\alpha\beta$ -T-Zellen und mehr  $\delta\gamma$ -T-Zellen zu finden. Die Zahl der  $\alpha\beta$ -T-Zellen nimmt mit dem Alter zu, der Anteil an  $\delta\gamma$ -T-Zellen bleibt gleich und die Anzahl der NK-Zellen nimmt ab. Ähnliche Tendenzen wurden in anderen Studien beschrieben (SOLANO-AGUILAR et al., 2001; BOEKER et al., 1999).

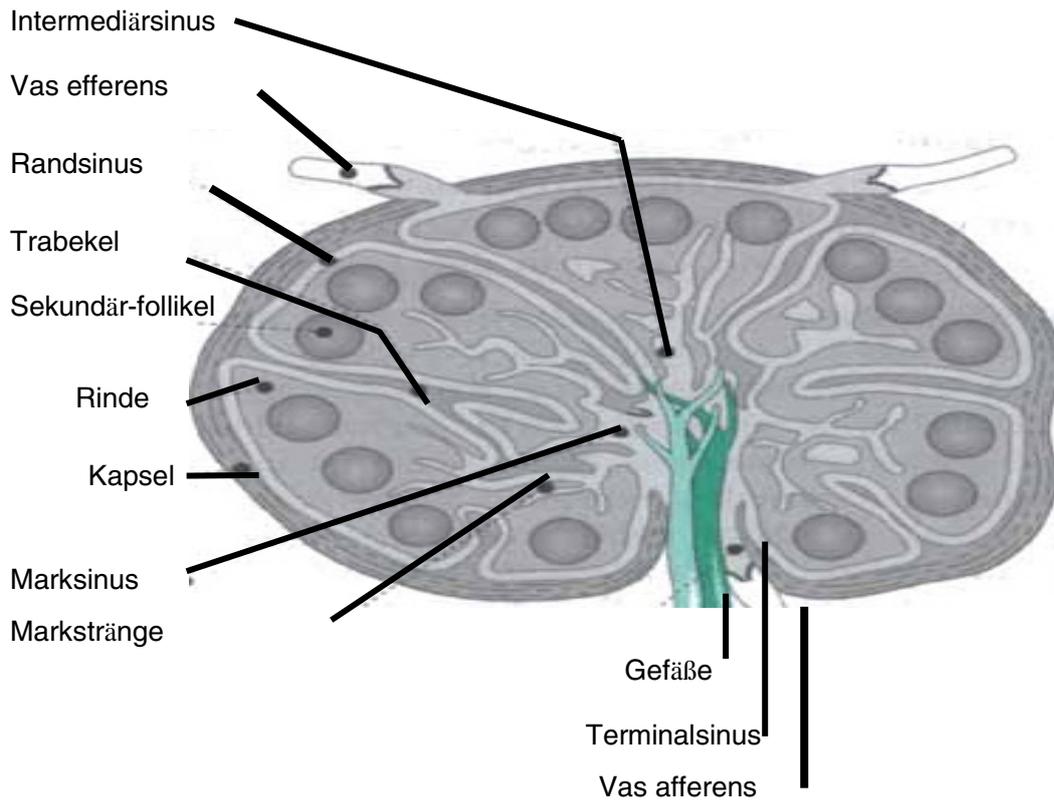
Eine Besonderheit des Schweins stellt der relativ hohe Anteil an  $CD4^+CD8^+$  Zellen dar. Diese besondere Population wird als Resultat extrathymischer, Antigen-abhängiger Reifung angesehen (SAALMÜLLER et al., 2002). Es wurde bewiesen, dass  $CD4^+CD8^+$ -Zellen sensibilisierte Memory-T-Helferzellen sind, die das CD8 auch nach Rückbildung zu kleinen T-Lymphozyten weiterhin exprimieren (SAALMÜLLER et al., 1987; ZUCKERMANN & HUSMANN, 1996). Mit der zunehmenden Differenzierung von Leukozytenoberflächenantigenen und der Verfügbarkeit von Detektionsantikörpern (Nachweisantikörpern) können weitere Subpopulationen unterschieden werden. Beim Schwein werden so zytotoxische  $CD4^-CD8^+$ -T-Lymphozyten anhand der CD5-Expression in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilt.  $CD4^-CD5^-CD8^+$ , die spontane zytolytische Aktivität gegenüber Tumorzellen zeigen, während die zytolytische Funktion von  $CD4^-CD5^+CD8^+$  von der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle abhängt (SAALMÜLLER, 1994).

### **2.2.1.4. Lymphknoten**

Lymphknoten im Mesenterium des Dünndarms (mesenteriale Lymphknoten, MLK) sind die größten Lymphknoten des Körpers und gehören ebenfalls zur Induktorregion des lymphoiden Gewebes der Darmwand (GALT, gut associated lymphoid tissue).

Anatomisch unterscheiden sich die Lymphknoten des Schweins von denen des Menschen durch eine Invertierung, d.h. die Lymphe fließt ins Zentrum des Knotens und verlässt ihn über efferente Gefäße auf der Kapseloberfläche. Lymphozyten verlassen die Lymphknoten über das venöse Blut, so dass sich im Vergleich zum Menschen mehr Lymphozyten in der Blutzirkulation als in der Lymphe aufhalten (BINNS, 1982; BUTLER et al., 1996; HALEY et al., 2003). (Abb. 2.3)

Sie nehmen Antigen von dendritischen Zellen (DC) auf, die von den Peyerschen Platten (PP) oder aus der *Lamina propria* über die Lymphdrainage zu MLK gelangen, wodurch Lymphozyten der MLK aktiviert und differenziert werden. Dendritische Zellen induzieren in MLK hauptsächlich eine Th2-Antwort und induzieren so die Bildung von regulatorischen T-Zellen (Tr-Zellen).



**Abb. 2.3** Schematischer Aufbau eines Lymphknotens modifiziert nach GERSHWIN & KRAKOWKA (1995)

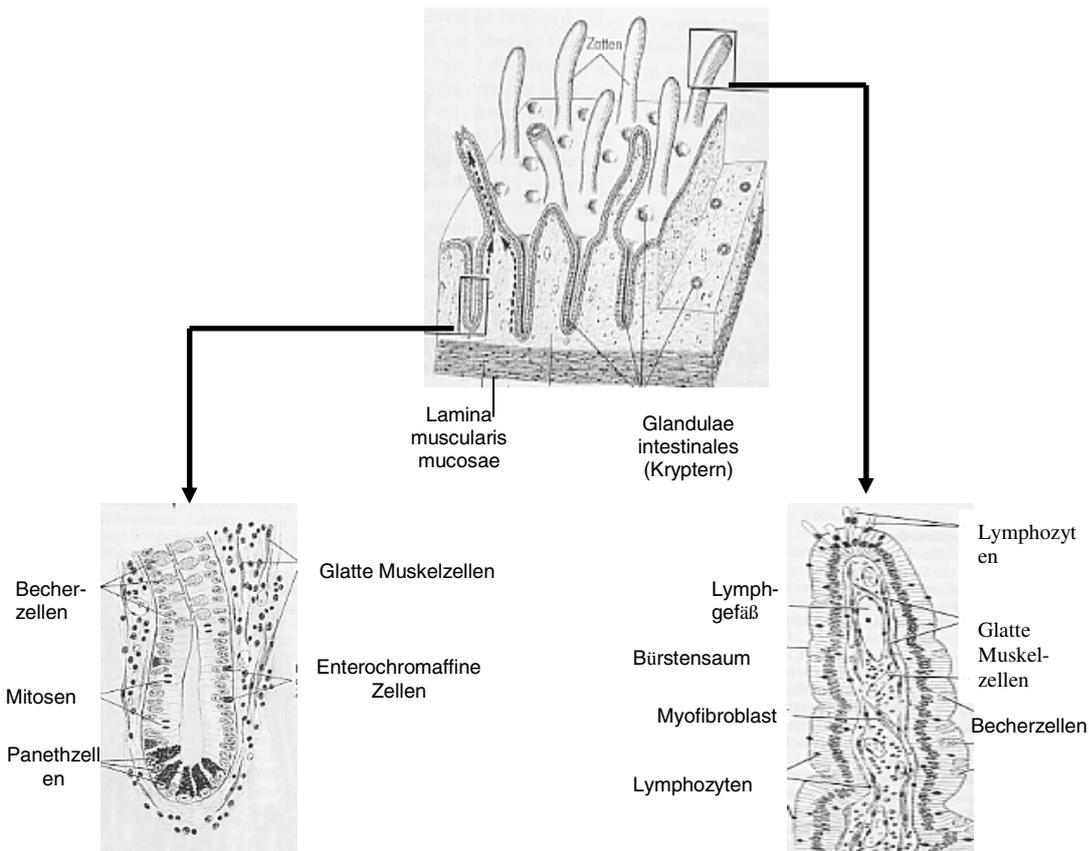
In MLK wird wie in PP auch die Bildung von IgA angeregt (MOWAT, 2003; NEWBERRY & LORENZ, 2006). Mit Antigen beladene dendritische Zellen können die MLK nicht verlassen, so dass die MLK eine Barriere für den Antigenübertritt zwischen lokalem und systemischem Immunsystem darstellt (MACPHERSON et al., 2005). Gleichzeitig verknüpfen MLK die Effektorregion des GALT mit dem systemischen Immunsystem. Beim Schwein gelangen die differenzierten Lymphozyten über spezialisierte Venulen in die Blutbahn (BENNL & HUSBAND, 1981; BINNES & PABST, 1988). Von dort aus wandern die im Darm aktivierten und differenzierten B- und T-Lymphozyten wieder in den Darm zurück (Prozess des „homings“), wo sie sich in speziellen Effektorbereichen ansiedeln und ihre Effektorfunktionen ausüben. Das „homing“ der im Darm geprägten Lymphozyten erfolgt durch die Interaktion des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  (das ausschließlich auf diesen, nicht aber auf peripher induzierten Lymphozyten exprimiert wird) mit MAdCAM 1 (mucosal addressin cell-adhesion molecule 1), das speziell auf Gefäßen mucosaler Oberflächen vorkommt (MOWAT et al., 2003).

### **2.2.1.5. Das darmassoziierte Immunsystem**

Das Schleimhautimmunsystem (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) wird nach seiner anatomischen Lokalisation benannt (BIENENSTOCK et al., 1978). Das mucosale Immunsystem des Darms (gut-associated lymphoid tissue, kurz GALT) und das mucosale Immunsystem der Atmungsorgane (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) stellen zwei sehr wichtige Komponente des Schleimhautimmunsystem, welche miteinander interagieren (NICANDER et al., 1991; JANEWAY & TRAVERS, 1995) und eine bedeutende Barriere gegen fremdes Antigen darstellen.

GALT und MALT bilden den komplexesten Teil des Immunsystems und umfassen beim Menschen ca. 400 m<sup>2</sup> Oberfläche und somit eine 200mal größere Fläche als die Haut. Außerdem enthält das GALT mehr Lymphozyten als die ganze Peripherie des Immunsystems zusammen, wobei 60 % aller Lymphozyten auf den Darm entfallen (GIRRBACH et al., 2006).

Das darmassoziierte Immunsystem unterscheidet sich vom systemischen Immunsystem durch seine Kompartimentierung in Induktor- und Effektorbereiche (MACDONALD & MONTELEONE, 2005). In Gebieten der Immuninduktion werden naive Lymphozyten durch Antigen, das von mucosalen Oberflächen aufgenommen wurde, stimuliert und somit eine Immunantwort „induziert“ (BRANDTZARG & PABST, 2005). Zur Induktorregion gehört das organisierte lymphatische Gewebe der Peyerschen Plaques (PP) und die *Lamina propria*. Oberhalb der Basalmembran, eingebettet in das Darmepithel, liegen die so genannten intraepithelialen Lymphozyten (IEL). (Abb. 2.4)



**Abb. 2.4** Schema zur Struktur der Dünndarmschleimhaut mit intraepithelialen Lymphozyten nach MOSIMANN & KOHLER (1990)

### 2.2.1.5.1. Die intraepithelialen Lymphozyten (IEL)

IEL stellen eine besondere Effektorpopulation dar, mit ca. 80% T-Lymphozyten-Anteil. Ungefähr jede vierte bis sechste Zelle im Epithel ist ein intraepithelialer Lymphozyt (IIJMA et al., 2001). IEL sind mit benachbarten Enterozyten über das Integrin  $\alpha\beta 7$  und über dessen Liganden E-Cadherin verankert. Aufgrund der Länge des Darms bilden IEL die größte Lymphozytenpopulation des Körpers. Sie sind die Zellen des GALT, die wegen ihrer Lage am Darmlumen direkt und schnell mit Bakterien und Nahrungsmittelantigenen in Kontakt kommen.

Anders als CD8- $\alpha\beta$ -Lymphozyten der Peripherie gehören IEL teilweise zum homodimeren CD8- $\alpha\alpha$ -Typ. Darüber hinaus exprimieren 10-15% der intraepithelialen T-Lymphozyten den  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor. Die Differenzierung dieser Zellen läuft teilweise auch außerhalb des Thymus, wahrscheinlich im Epithel ab (MOWAT & VINEY, 1997). Sie verhalten sich anergisch, proliferieren daher kaum auf klassische Stimulation durch Antigen oder Mitogen, schütten aber Zytokine, v. a. des Th1-Typs aus (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996).

## Literaturübersicht

---

Die beiden Polypeptidketten des  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptors besitzen andere Antigenenerkennungseigenschaften als die  $\alpha\beta$ -Polypeptidketten. Im Darmepithel variiert der Anteil der  $\gamma\delta^+$  Zellen zwischen 10 und 20% (YANG & PARKHOUSE, 1997), ca 50% der  $\gamma\delta^+$  Zellen im Epithel sind  $CD8^+CD4^-$  doppelt-negative Zellen (THIELEKE et al., 2003), diese können Antigen nicht im klassischen MHC-Kontext erkennen. Möglicherweise reagieren sie jedoch auf genetisch konservierte Signale wie Hitzeschockproteine oder Lipidantigene von Bakterien. Sie reagieren aber auch auf nicht-klassische MHC-Moleküle wie MICA/ MICB, die auf geschädigten Epithelzellen vorkommen (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996; KABELITZ et al., 2005).

Die konstitutive zytolytische Aktivität der  $CD8^+$ -IEL beschränkt sich fast ausschließlich auf NK-ähnliche, wahrscheinlich Fas-vermittelte Zytotoxizität, so dass sie für eine schnelle Verteidigung gegenüber infizierten und transformierten Epithelzellen sorgen.

Aufgrund dieser Eigenschaften spielen IEL eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere auch durch ihre Wirkung bei der Wundheilung des Darmepithel nach Verletzungen (KABLITZ et al., 2005; MACDONALD et al., 2003). Sie wirken bei der Immunregulation im Darm mit und sind bei der Aufrechterhaltung der oralen Toleranz von großer Bedeutung.

Neben T-Lymphozyten finden sich im Epithel kaum B-Zellen, Plasmazellen oder Makrophagen (MACDONALD, et al., 2003).

Neben ihrer Funktion in der Verdauung und Absorption von Nährstoffen haben die Epithelzellen gewisse Immunfähigkeiten, sie können z. B. Chemokine und Zytokine freisetzen, falls sie durch Pathogene befallen sind. Dadurch werden inflammatorische Zellen an den Infektionsherd gelockt. Außerdem tragen sie durch ihre Zytokin-Synthese auch zur Differenzierung von Effektorzellen bei (*Lamina propria*, IEL) bei (MOVAT et al., 2003; NAGLER-ANDERSON, 2001).

Neben M-Zellen sind auch Epithelzellen an der Antigenpräsentation beteiligt, entweder zusammen mit MHC I-Molekülen oder über nicht-klassische MHC-Moleküle wie CD1. Da intestinale Epithelzellen keine co-stimulatorischen Moleküle exprimieren, wird in den aktivierten  $CD4^+$ -T-Lymphozyten Anergie ausgelöst. Epithelzellen dienen hingegen zytotoxischen  $CD8^+$ -IEL als akzessorische Zellen. Damit sind sie entscheidend bei der Signaltransduktion zu darunter liegenden Immunzellen beteiligt (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996; MOWAT et al., 2003; MOWAT & VINEY, 1997).

Durch die direkte Nähe zu luminalen Antigenen, die aus Nahrungsmitteln und Mikroorganismen stammen, steht das GALT unter der höchsten Antigenlast im Körper. Es muss zwischen harmlosem und pathogenem Antigen (potentiell invasiven Organismen) unterscheiden können (MOWAT et al., 2003). Lebensmittelantigene erzeugen beim gesunden Individuum „orale Toleranz“, d.h. sie werden vom Darmimmunsystem als harmloses Antigen erkannt und lösen daher weder im Darm, noch in der Peripherie eine Abwehrreaktion aus. Die Mechanismen der Toleranz sind komplex. Sie beruhen darauf, dass antigenspezifische T-Zellen zerstört werden oder anergisch werden (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996). Ein Hauptmechanismus der oralen Toleranz ist die aktive Immunsuppression durch eine bestimmte Population der T-Zellen, so genannte T-Suppressor-Zellen (IIJIMA et al., 2001; NAGLER-ANDERSON, 2001; NEWBERRY & LORENZ, 2006).

Im Gegensatz zu Nahrungsmittelantigenen erzeugen Mikroorganismen der Darmflora keine systemische Toleranz. Sobald sie die Barrieren des Darms überschreiten und in die Peripherie gelangen, induzieren sie eine Immunantwort. Lokal im Darm wird durch die Mikroorganismen daher eher immunologische Ignoranz erzeugt (MACDONALD & MONTELEONE, 2005).

### **2.2.1.5.2. Die *Lamina propria***

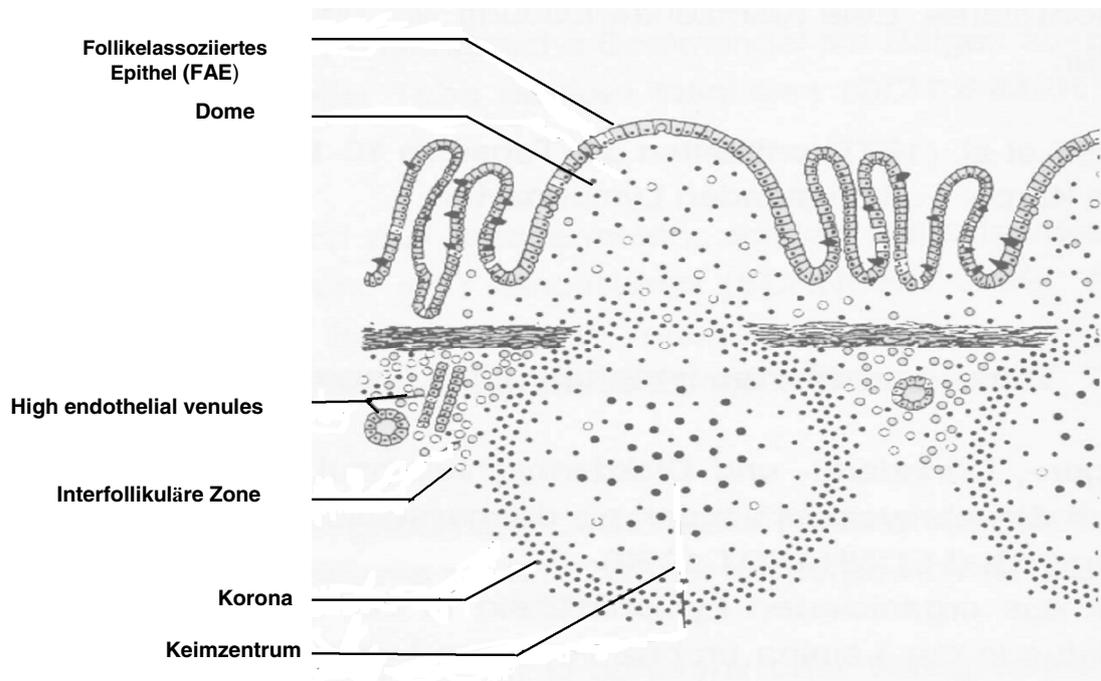
Als lose, aber organisierte Schicht stellt die *Lamina propria* eine der Effektorregionen des GALTs dar. T-Lymphozyten der *Lamina propria* sind hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen vom Gedächtnis-/ Effektortyp, welche die IgA-Produktion der Plasmazellen (30-40% aller Lymphozyten in *Lamina propria*) unterstützen (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996; MACDONALD, 2003; MOWAT et al., 2003).

In der *Lamina propria* befinden sich auch dendritische Zellen, die mit Hilfe ihrer Fortsätze durch tight junctions hindurch (ohne Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Epithels) Antigen aus dem Lumen aufnehmen können und dies den Lymphozyten der *Lamina propria* präsentieren (ALAKOMI et al., 2005; MOWAT, 2003; STAGG et al., 2004). In der *Lamina propria* sind zytotoxische aktive Lymphozyten hauptsächlich NK-Zellen, weniger CD8<sup>+</sup>-Tc-Lymphozyten (ABREU-MARTIN & TARGAN, 1996).

### **2.2.1.5.3. Die Peyerschen Platten und ihre immunologische Funktion**

Die Peyerschen Platten (PP) wurden erstmals 1677 von dem Anatomen Conrad Peyer beschrieben. Es handelt sich hierbei um makroskopisch erkennbare lymphatische Aggregate in der *Tela submucosa*, die beim Schwein auf der antimesenterialen Seite des Darms zu

finden sind (PABST et al., 1988; PABST & BINNS, 1989a). Die Lymphfollikel erreichen in der Regel das Darmepithel und wölben dieses kuppelartig in das Darmlumen vor (Follikel-assoziiertes Epithel (FAE)); (NEUTRA et al., 1987) (Abb. 2.5)



**Abb.2.5** Schematischer Aufbau einer Peyerschen Platte nach PABST (1988)

Diese Ansammlungen von Lymphfollikeln (*Noduli lymphatici aggregati*) weisen strukturelle Ähnlichkeiten wie in den Lymphknoten auf (Abb.2.3.). Makroskopisch könnten die im Dünndarm des Schweins vorhandenen Peyerschen Platten in zwei Formen unterteilt werden: Im Duodenum und Jejunum liegen sporadisch zahlreiche kleine Peyersche Platten vor, sog. diskrete proximale PP, auch jejunalen PP genannt. Im distalen Teil des Jejunums und im Ileum ist eine lange durchgehende, streifenförmige Peyersche Platte vorhanden, welche sich über das *Ostium ileale* ins *Colon* hinein erstreckt und ca. 15% der gesamten Dünndarmlänge einnimmt (BINNS & PABST, 1994; KARARLI, 1995), die auch distale PP bzw. ileale PP genannt wird (POHLENZ et al., 1987; UHR et al., 1993).

Während die Lage der proximalen PP ein Leben lang unverändert erhalten bleibt, variiert ihre Anzahl individuell mit dem Alter. SAHLENDER (1989) untersuchte Hausschweinfeten 20 und 10 Tage vor der Geburt (n=10) und gab eine mittlere Anzahl der prox. PP von 17,6 bzw. 17,8 an. Bei neugeborenen Tieren ermittelte er 13 und bei 10 Tage alten Ferkeln 23 PP. Die Variationsbreite der ermittelten Plattenanzahl lag zwischen 11 und 27. Bei einer Woche alten

Ferkeln ( $n = 6$ ) geben INOUE und SUGI (1978) eine Anzahl von 19,3 PP an, bei 2 Wochen alten Tieren sind es 24. In weiteren Untersuchungen ermittelten sie bei 3 Wochen alten Ferkeln 27, bei 4 Wochen alten 25,7 sowie bei 6 Wochen alten Tieren 27,7 PP im Dünndarm. Die Größe der proximalen PP ist auch sehr variabel, sie reicht von wenigen Millimetern bis ca. 11 cm. Sie nehmen etwa 2,5% der Jejunalschleimhaut ein (SAHLENDER et al., 1989).

Die Lage der ilealen PP ist immer antimesenterial (Uhr et al., 1993). PP sind beim Schwein zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden (CHAPMAN et al., 1974).

Die Größe der PP hängt maßgeblich von verschiedenen Faktoren, insbesondere von den Haltungsbedingungen und der Keimexposition ab. Bei konventionell gehaltenen Tieren z.B. verdreifachte sich die Länge der proximalen und distalen PP von der Geburt bis zum 38. Lebensstag, während sich bei keimfrei gehaltenen Tieren die Länge der ilealen PP verdoppelte und es zu keiner Längenzunahme der proximalen PP kam (PABST et al., 1989b).

Die Auseinandersetzung mit den fremden Antigenen ist anscheinend nicht nur für die Größe der PP wichtig, sondern beeinflusst ebenfalls die zelluläre Zusammensetzung innerhalb der PP. Bei konventionell gehaltenen Schweinen überwiegen B-Lymphozyten in den PP, während bei den keimfrei gehaltenen Tieren mehr T-Lymphozyten vorhanden sind (ROTHKÖTTER & PABST, 1989). Die ileale PP ist bei älteren Tieren nicht mehr vollständig vorhanden, da sie einer Altersinvolution unterliegt. Diese Rückbildung beginnt (bereits im Alter von zwei Jahren) bevor das Wachstum der PP endet, so dass Reste der ilealen PP als verstreute Solitärfollikel zurückbleiben (SAHLENDER et al., 1989). Untersuchungen bei drei bis fünf Jahre alten Schweinen zeigten, dass die ileale PP bis auf einige Follikelaggregationen zurückgebildet war (UHR et al., 1993).

Die mikroskopische Grundstruktur der Peyerschen Platten beim Schwein weist den gleichen Aufbau auf wie bei anderen Säugetieren (POSPISCHIL et al., 1989) und lässt sich in vier Bestandteile unterteilen. Da die PP keine afferenten Lymphgänge besitzen, die sie mit Antigen versorgen könnten, geschieht die Antigenaufnahme durch das Follikel-assoziierte Epithel (MOWAT et al., 2003; NAGLER-ANDERSON, 2001; NEWBERRY & LORENZ, 2006). Das Follikel-assoziierte Epithel enthält aus Epithelzellen differenzierte, spezialisierte M-Zellen, an deren apikaler Seite die für Enterozyten charakteristische Bürstensaummembran und die Mucusschicht fehlt. Anstelle von Mikrovilli finden sich Einfaltungen (microfolds) (MOWAT, 2003; NAGEL-ANDERSON, 2001; NEWBERRY & LORANZ, 2006; SPAHN & KUCHARZIK, 2004). Die M-Zellen nehmen aus dem Darmlumen Antigene über Endozytose auf, schleusen diese durch ihr Zytoplasma und geben sie durch Exozytose an die darunter liegenden subepithelialen dendritischen Zellen ab, die entweder zur benachbarten T-Zell-

Region oder zu B-Zell-Follikeln im Plaque migrieren und dort naive Lymphozyten stimulieren, oder sie gelangen über die Lymphdrainage zu mesenterischen Lymphknoten, wo sie eine primäre Immunreaktion induzieren (NEWBERRY & LORENZ, 2006; NEUTRA et al., 1996; WEYRAUCH & SMOLLICH, 1998). Im Bereich zwischen Epithel und PP, der subepithelialen Domregion (SED), befinden sich Makrophagen und dendritische Zellen. Diese Zellen nehmen das Antigen auf, verarbeiten es gemäß ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen (APC) und präsentieren es den naiven T-Zellen in der interfollikulären Region (IFR) (IWASAKI & KELSALL, 2000).

Dendritische Zellen der PP polarisieren antigenspezifische T-Zellen vornehmlich zur Th2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-10), wodurch auch Tr-Zellen generiert werden (NEWBERRY & LORENZ, 2006). Durch die Stimulation der B-Zellen wird die mucosale Antikörperproduktion angeregt (MOWAT, 2003; NEWBERRY & LORANZ, 2006).

Die Lymphozyten aus den Peyerschen Platten rezirkulieren aus dem Blut in die Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, des weiblichen Genitaltrakts, des Atmungstrakts sowie in die Tränen-, Speichel- und Milchdrüsen (ROUX et al., 1977; BIENENSTOCK & MCDERMOTT, 1978).

Die PP sind ein wichtiges lymphatisches Organ des Organismus, da über den oralen Weg die meisten Antigene aufgenommen werden. Sie sind der Ort, an dem das Immunsystem über die Toleranz gegenüber Antigenen aus Nahrungsbestandteilen oder über die Immunantwort gegenüber pathogenen Antigenen entscheidet.

### **2.3. Differenzierungsantigene des Schweins**

Funktionell unterschiedliche Zellen exprimieren unterschiedliche Proteine. Die immunphänotypischen Proteine an der Oberfläche oder im Inneren der Zellen werden genutzt, um die Zellen biochemisch und funktionell zu ordnen und zu Clusters of Differentiation (CD) zusammenzufassen. Einige CD-Moleküle haben Rezeptoren- oder Signalfunktionen, darüber hinaus spielen manche eine zentrale Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und Adhäsion (ABBAS et al., 1996). Man verwendet Antikörper gegen diese Antigene, um Lymphozytenpopulationen und deren Differenzierungs- oder Aktivierungsgrad zu unterscheiden, wobei nicht jedes Differenzierungsantigen eine CD-Nummer erhält, hierfür muss sein Molekulargewicht bekannt sein, und es muss von mindestens zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAK) erkannt werden (BODMER et al., 1984; SCHLOSSMANN et al., 1994).

Stimmen die CD-Moleküle des Schweins mit den humanen CD-Molekülen in ihren Eigenschaften weitgehend überein, werden sie analog zu den entsprechenden humanen CD benannt (LUNNEY & PESCOVITZ, 1987). Die Bezeichnung SWC (swine leucocyte workshop cluster) wird hingegen angewendet, wenn ein Oberflächenantigen keine Analogie zu dem entsprechenden humanen Molekül aufweist (LUNNEY, 1993; BOEKER et al., 1999). Der erste monoklonale Antikörper gegen porcine Leukozytenmarker war 1984 erhältlich (PESCOVITZ et al., 1984). Im Folgenden sind verschiedene Differenzierungsantigene, sofern sie für diese Arbeit relevant sind, tabellarisch aufgeführt:

**Tabelle 2-3** Differenzierungsantigene des Schweins (Quelle: <http://eis.bris.ac.uk>)

<b>CD-Nr.</b>	<b>Expression auf (u. a.)</b>	<b>Bekannte Funktionen</b>	<b>Referenz</b>
<b>wCD1</b>	Monozyten, Granulozyten, T-Zellen, NK-Zellen	Antigenpräsentation an T-Zellen: Mögliche Rolle bei der Erkennung von Lipiden	Pescovitz et al., 1984; Denham et al., 1994;
<b>CD3</b>	T-Zellen (alle Stadien)	Peptide/ MHC-Antigen- Bindung, Signaltransduktion	Pescovitz et al., 1998b
<b>CD4</b>	T-Helfer Lymphozyten	Corezeptor für MHC II Helferfunktion bei der Antigenerkennung	Pescovitz et al., 1984; Pescovitz et al., 1990; Pescovitz et al., 1985; Pescovitz et al., 1998; Saalmüller et al., 2001
<b>CD8<math>\alpha</math></b>	T-Zellen (mit zytotoxischen/suppressorischen Aufgaben) Tymozyten	Corezeptor für MHC I Helferfunktion bei der Antigenerkennung	Jonjic et al., 1984. Saalmüller et al. 1994 Yang et al., 1997 Zuckermann et al., 1998; Saalmüller et al., 2001
<b>CD8 <math>\beta</math></b>	Zytotoxische T-Zellen	Corezeptor für MHC I Helferfunktion bei der Antigenerkennung	Yang et al., 1997, Saalmüller et al., 2001
<b>CD11R1</b>	Eosinophile Teil der Neutrophilen Teil der NK	$\alpha$ M-Untereinheit des Integrins CR3 (Teil des CD18). Bindet CD54 und Komplementproteine iC3b, vermittelt die Adhäsion und Extravasation von Monozyten und neutrophilen Granulozyten	Haverson et al., 1994 Petruzzelli, 1995; Kumagai et al., 1995
<b>CD14</b>	Granulozyten Monozyten	Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und Lipopolysaccharid-bindendem Protein (LBP). Rolle bei der Clearance von gramnegativem Pathogen	Dato et al., 1992 Haverson et al., 1994 Dominguez et al., 1998 Summerfield et al., 1997; Thacker et al., 2001
<b>CD16</b>	Granulozyten Blutlymphozyten	Bestandteil des niedrigaffinen Fc-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII.	Kim et al., 1997 Sweeney et al., 1996

## Literaturübersicht

	Monozyten,NK	Vermittelt Phagozytose und ADCC sowie Signaltransduktion an NK	
<b>CD18a</b>	Granulozyten Monozyten T-Zellen Periphere B-Zellen NK-Zellen	$\beta_2$ -Untereinheit der Integrine, bindet an CD11a, CD11b, vermittelt Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adäsion	Denham et al., 1998
<b>CD21</b>	B-Zellen: Aktivierte und zirkulierende	Rezeptor für Komplementproteine C3d. Bildet zusammen mit CD19 und CD81 einen Corezeptor für B-Zellen. Involviert in der B-Zellen Proliferation und Aktivierung	Denham et al., 1998; Boersma et al., 2001
<b>CD25</b>	Aktivierte Lymphozyten (T- und B-Zellen)	$\alpha$ -Kette des niedrigaffinen IL-2-Rezeptors. Induziert die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen in Verbindung mit CD122	Denham et al., 1998 Bailey et al., 1992 Kokuho et al., 2000 Sinkora et al., 2001
<b>CD45</b>	Granulozyten Monozyten T- und B-Zellen (naive)	Tyrosinphosphatase Erhöht die Signalvermittlung von B- und T-Zellen	Zuckermann et al., 1994; Schnitzlein et al., 1998; Zuckermann et al., 1998; Zuckermann et al., 2001
<b>CD45 RA</b>	Aktivierte CD8+T-Zellen Aktivierte B-Zellen	Isoform von CD45 mit A-Exon	Zuckermann et al., 1994; Zuckermann et al., 1998; Zuckermann et al., 2001
<b>MHC I</b>	Alle kernhaltigen Zellen	Antigenerkennung in Verbindung mit CD8	Pescovitz et al., 1984 Brodersen et al., 1998
<b>TcR1 (<math>\delta</math> Kette)</b>	$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten	u. a. Zelllysis,	Saalmuller et al., 1989 Davis et al., 1998 Schuberth et al., 1998 Yang et al., 1998

## **2.4. Salmonellen**

### **2.4.1. Mikrobiologische Einordnung der Salmonellen**

Salmonellen gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Die typischen Eigenschaften sind ein gramnegatives Färbeverhalten, Beweglichkeit und Glukoseverwertbarkeit. Die 2-3 µm langen, plumpen Stäbchen der Gattung *Salmonella* werden aufgrund ihrer Körper-(O)- und Geißel-(H)-Antigene nach dem Kaufmann-Withe-Schema eingeteilt und anhand dieser Seroformel als Serovare deklariert. Eine besondere salmonellenspezifische, biochemische Leistung ist die Bildung von Schwefelwasserstoff bei gleichzeitiger Unfähigkeit, Laktose abzubauen (ROLLE & MAYER, 2002).

Die Widerstandsfähigkeit der Salmonellen ist außerordentlich hoch. In proteinreichen Medien (>10 mg/ml) und vorhandenem Sauerstoff können diese mehrere Jahre überleben. Gegenüber üblichen Desinfektionsmitteln reagieren Salmonellen aber empfindlich, solange sie nicht von Schmutzbestandteilen (vor allem Proteinen) eingehüllt werden (SELBITZ et al., 1995).

### **2.4.2. Pathogenese der Salmonelleninfektion**

Die Infektion der Nutztiere mit Salmonellen erfolgt in der Regel auf fäkal-oralem Weg. Salmonellen, die das saure Milieu im Magen unbeschadet überlebt haben, heften sich an die Dünndarmschleimhaut an und vermehren sich in den Krypten des Epithels (SELBITZ et al., 1995). Der weitere Verlauf der Infektion hängt vor allem von folgenden Faktoren ab: I. Resistenzlage des infizierten Individuums, II. Pathogenität und Virulenz des Infektionsstammes, III. Höhe der Infektionsdosis (ROLLE & MAYER, 2002).

#### **2.4.2.1. Die Resistenzlage des Individuums gegenüber Infektionserregern**

Die Resistenzlage des Individuums gegenüber Infektionserregern ist abhängig von verschiedenen biotischen und abiotischen Umweltfaktoren, die zur Immunsuppression führen können [Parasitenbefall, „Crowding“ (Stress durch Ein- und Umställen), Erregeranhäufung durch hohe Tierzahlen, schlechtes Klima, unhygienische Stallverhältnisse, Belastung des Futters durch Fusarien- und Aflatoxine]. Resistenzmindernde Faktoren sind von besonderer Bedeutung bei der Ausprägung der latenten Salmonellose, die zurzeit das Hauptproblem in den Beständen der landwirtschaftlichen Nutztiere bildet.

**2.4.2.2. Die Pathogenität der Salmonellenserovare**

Sie ist umso höher, je stärker die Anpassung der Salmonellen an eine bestimmte Tierart ist. Die Erreger der tierartspezifischen Salmonellose sind für die entsprechende Tierart hoch pathogen, für andere Tierarten in der Regel nicht.

**Tabelle 2-4** Einteilung der Salmonellen nach Wirtsanpassung (ROLLE & MAYER, 2002)

Angepasst an Menschen	Angepasst an bestimmte Tierarten	Keine Anpassung an bestimmte Tierart, aber z. T. Invasivität	Keine Anpassung an bestimmte Tierart nicht invasiv
<i>S. typhi</i>  <i>S. paratyphi</i>	<i>S. dublin</i> Rind	<i>S. enteritidis</i>  <u><i>S. typhimurium</i></u>	Mehr als 2000 Seorovaren
	<i>S. abortusovis</i> Schaf		
	<i>S. abortus equi</i> Pferd		
	<i>S. cholerasuis</i> Schwein		
	<i>S. gallinarum-pullorum</i> Huhn		

Gesunde Individuen müssen hohe Erregermengen ( $10^6$  Keime) aufnehmen, damit sich eine Salmonellose entwickeln kann. Bei empfänglichen Individuen (immunschwache und sehr junge oder sehr alte Tiere) reichen aber kleinere Erregermengen (100 Keime) aus, um eine Salmonellose auszulösen (ROLLE & MAYER, 2002).

Der Mensch infiziert sich in der Regel oral über kontaminierte Lebensmittel. Die primäre Infektionsquelle sind insbesondere von Geflügel (Fleisch und Eier), Rindern und Schweinen stammende Lebensmittel, wobei die Tiere in den seltensten Fällen klinisch erkrankt waren. Die Infektionsdosis für den Menschen liegt bei  $10^4$  bis  $10^5$  Keimen pro Individuum. Wenn sich Salmonellen in stark fetthaltigen Lebensmitteln befinden, sind jedoch Erkrankungen bereits bei Infektionsdosen unter 100 Keimen beobachtet worden. Salmonellen werden in fettreichen Lebensmitteln während der Magenpassage vom Fett umhüllt und sind dadurch besser vor Einwirkungen der Magensäure geschützt (SELBITZ et al., 1995). Durch direkten Kontakt mit Salmonellen ausscheidenden Tieren erfolgt sehr selten eine Übertragung auf den Menschen. Eine direkte oder indirekte Übertragung von Mensch zu Mensch – vor allem von

verschiedenen mehrfach resistenten Salmonellen-Serovaren – kann als Hospitalinfektion bei besonders prädisponierten Personen oder unter hygienisch ungünstigen Bedingungen erfolgen (ROLLE & MAYER, 2002; ROBERT KOCH INSTITUT, 2001).

### 2.4.2.3. Virulenzfaktoren der Salmonellen

Die Virulenzfaktoren der Salmonellen sind sehr vielfältig. Neben der Motilität gehören besonders Endotoxine dazu. Diese Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), die Bestandteil der äußeren Membran der Erreger sind und u. a. mit dem Absterben der Mikroorganismen, aber auch durch Komplementwirkung oder unter Antibiotikagabe freigesetzt werden. Die Endotoxine entfalten nach Absorption durch die Darmwand ihre Wirkung im gesamten Körper. Es kann zum Schock kommen. Eine Besonderheit der hoch virulenten Salmonellenstämme ist das Vorkommen zusätzlicher Pathogenitäts-Inseln. Dies sind lange instabile Segmente, die den apathogenen Stämmen fehlen (OCHMAN et al., 1996). Die Transkription dieser Gene erfolgt bevorzugt in intrazellulärer Umgebung (CIRILLO et al., 1998).

Die Salmonellen-Pathogenitäts-Insel-1 (*spi 1*) kodiert unter anderem für Proteine des Typ III-Sekretionsapparates. Mit dessen Hilfe werden Proteine, die wichtig für die Invasion in Epithelzellen sind, aus den Salmonellen ausgeschleust. Weiterhin kodieren Gene der *spi 1* für Regulatorproteine der Invasionsgene. Die Expression der Regulatorproteine und die Sekretion der Invasionsproteine werden durch äußere Faktoren wie O<sub>2</sub>-Spannung und die Osmolarität der Umgebung beeinflusst und sind abhängig vom Wachstumsstadium der Salmonellen (LUNDBURG et al., 1999). Die *spi 2* ist wichtig für das Überleben der Salmonellen in Makrophagen (OCHMAN et al., 1996). Aktuelle Untersuchungen differenzieren drei *spi*-Loci (FIERER & GUINEY, 2001). Die Autoren postulieren folgende Funktionen: die *spi 1* ist wichtig für die Invasion der Epithelzellen; die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom kann durch *spi 2* beeinflusst werden, während die *spi 3* für die Anpassung der Salmonellen an eine Umgebung mit niedrigen Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen und niedrigem pH-Wert (Phagolysosom) Bedeutung besitzt und ein dem Nramp-1 der Säugetiere ähnliches Protein der Bakterien kodiert (KEHRES et al., 2000). Das Phagosom stellt die Vakuole dar, mit der die Salmonellen in die phagozytierenden Zellen aufgenommen werden; die Lysosomen enthalten die abbauenden Enzyme der Phagozyten; beide Vakuolen verschmelzen zum Phagolysosom, um die aufgenommenen Erreger abzutöten.

Weitere Virulenzgene liegen als Plasmide vor (*spv*-Gene), die es den Salmonellen ermöglichen, nach dem Passieren der Darmbarriere Milz und Leber zu infizieren und sich dort rapide zu vermehren. Die Genexpression wird durch Stress induziert, insbesondere Nährstoffmangel und Wachstum in der stationären Phase sind für deren Hochregulation verantwortlich. Außerdem wird sie bei intrazellulärer Lokalisation der Bakterien gefördert (GULIG et al., 1997). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer erhöhten Vermehrung der Salmonellen führen, sind jedoch z. Z. noch ungeklärt. Mit Hilfe der Produkte der Virulenzgene können die Salmonellen in den Endosomen der Phagozyten der Lyse entgehen, indem sie die Formierung von Phagolysosomen verhindern (GARVIS et al., 2001) und sich intrazellulär vermehren (GOVONI et al., 1999).

### **2.4.3. Akute und latente Salmonelleninfektion**

Nach einer Inkubationszeit von fünf bis 72 Stunden äußert sich die akute Salmonellose mit Diarrhoe. Weitere klinische Symptome sind unter anderem Fieber, Übelkeit, Erbrechen und akute Schmerzen im Abdomen (ROLLE & MAYER, 2002). Die Behandlung erfolgt in der Regel symptomatisch durch Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich. Eine Antibiotikatherapie ist nur bei gleichzeitiger Bakteriämie erforderlich, da Antibiotika die Bakterienausscheidung verlängern, die normalerweise nach drei bis sechs Wochen beendet ist (SELBITZ et al., 1995; ROBERT KOCH INSTITUT, 2001). Leider konnte noch keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.

Die latente Infektion stellt ein bedeutendes Problem dar, da sie klinisch nicht erkannt werden kann. Hierbei ist die Infektionsdosis nur gering; trotzdem kann ein Teil der aufgenommenen Salmonellen die Darmbarriere passieren und durch den Lymph- und Blutstrom in andere Organe – vor allem Leber und Milz – disseminieren. Später einwirkende, resistenzmindernde Faktoren können zum Ausbruch einer akuten Salmonellose oder zur Etablierung von Dauerausscheidern führen (ROLLE & MAYER, 2002).

## **2.5. Probiotika**

### **2.5.1. Geschichte und Definition**

Bereits zu Beginn der Zivilisation erkannten die Menschen den Nutzen der kultivierten Milchprodukte; darauf deuten beispielsweise zahlreiche Hinweise in den heiligen Schriften des Hinduismus hin. Der erste Wissenschaftler jedoch, der die Bedeutung der Darmflora

(Bakterien) für die Verdauung erkannte, war THEODOR ESCHERICH. Er isolierte im Jahr 1885 aus dem Darm das Bakterium *Coli communale*, später nach ihm *Escherichia coli* benannt. Der russische Bakteriologe ILJA METSCHNIKOFF fand vor 90 Jahren, dass bulgarische Bauern ein überdurchschnittlich hohes Alter erreichen, er sah einen Zusammenhang zwischen dieser Beobachtung und ihrer an Joghurt reichen Diät. METSCHNIKOFF dachte, dass die Produkte der Darmflora den Prozess der Alterung beschleunigen, darauf basierend schlug er eine Diät vor, die große Mengen an fermentierter Milch (Milchsäure) beinhaltet, um die Vermehrung der Darmflora zu hemmen (METSCHNIKOFF et al., 1907).

Der Begriff „probiotisch“ stammt aus dem Griechischen (Probios, für das Leben). Er wurde von LILLY und STILWELL (1965) zum ersten Mal benutzt, um Substanzen zu beschreiben, die von Ciliaten (*Colpidium campylum*) produziert werden und das Wachstum anderer Protozoen (*Tetrahymena pyriformis*) stimulieren. PARKER definierte 1974 Probiotika als Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der Darmflora beitragen (Antibiotika nicht ausgeschlossen). Auf der Grundlage von PARKER stellt FULLER (1989) eine engere Definition der Probiotika, wonach Probiotika als lebende mikrobielle Futterzusätze gelten, die den Organismus durch eine Verbesserung des Gleichgewichts seiner Darmflora positiv beeinflussen. HAVENAAR und HUIS (1992) erweiterten diese Definition, um außer reinen Bakterienkulturen auch gemischte Kulturen und Nahrungsmittel sowie andere Stoffgruppen einzuschließen. Durch GÖRKE und LIEBLER-TENONIO (2001) wurde die grundlegende Definition von FULLER dem erweiterten Kenntnisstand entsprechend durch den Halbsatz „oder den Wirtsorganismus direkt beeinflussen“ ergänzt. Da sich die Wirksamkeit von Probiotika auch auf darmunabhängige Anwendungsgebiete (KNEIFEL, 2005), sowie auf Erhöhung der zotechnischen Leistungen (VAN BELLE et al., 1990) erstreckt, stellte KNEIFEL (2005) eine allgemeiner gefasste Definition für Probiotika. Danach sind Probiotika Mikroorganismen, die das Wohlbefinden von Tieren und Menschen fördern bzw. einen gesundheitlichen Nutzen haben. Prebiotika hingegen sind nach GIBSON und ROBERFROID (1995) nicht verdauliche Lebensmittelinhaltsstoffe, die den Wirtsorganismus günstig beeinflussen, so dass das Wachstum und/oder die Aktivität einer begrenzten Zahl an Bakterien selektiert stimuliert und auf diese Weise die Gesundheit der Wirtsorganismen verbessert wird (GIBSON & ROBERFROID, 1995). Prebiotika sind meistens nichtverdauliche Polysaccharide, z.B. Fruktose- Oligosaccharide, die zu einer Erhöhung der Bifidobakterien-Anzahl im Colon führen (GIBSON & ROBERFROID, 1995) sowie unidirektionale Mannitfluxe im Jejunum ansteigen lassen (BREVES et al., 1997). Synbiotika

sind eine Kombination aus Pro- und Prebiotika, wobei durch metabolische Aktivität die Implantierung der Probiotika im Gastrointestinaltrakt verbessert wird (KAUR et al., 2002).

### **2.5.2. Die häufig eingesetzten Probiotika**

Zu den derzeit eingesetzten Probiotika gehören Mikroorganismen unterschiedlicher Art. Neben grampositiven Bakterien (z. B. *Lactobacillus spp.*), gramnegativen Bakterien (z. B. *E. coli*) gehören auch Hefen (z. B. *Saccharomyces boularii*) und Schimmelpilze.

Beim Einsatz in der Tierernährung spielt neben positiven gesundheitlichen Aspekten auch die Verbesserung der zootechnischen Leistung eine große Rolle. Futtermittelrechtlich sind Probiotika als Futterzusatzstoffe zur Stabilisierung der Darmflora eingeordnet und bedürfen einer Zulassung durch die Kommission der Europäischen Gemeinschaft. Die Präparate können sowohl lebende als auch tote Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte oder Sporen enthalten. Neben Monopräparaten sind auch Mischpräparate mit mehreren Arten von Mikroorganismen verschiedener Gattungen im Handel.

Die Richtlinie 70/524/EWG zu den Zusatzstoffen in der Tierernährung und die Richtlinie 87/153/EWG zur Beurteilung von Zusatzstoffen regeln die Zulassungsvorschriften für Probiotika. Eine Reihe von Anforderungen wird an Mikroorganismen gestellt, damit sie als Probiotika genutzt werden können (FULLER, 1989; COLLINS & GIBSON, 1999; JADAMUS, 1999; SIMON et al., 2001; GALDEANO & PERDIGON, 2004).

Probiotika müssen apathogen sein und dürfen keine Toxine bilden, sie dürfen nicht invasiv sein, d. h. nicht über die Blutbahn z.B. Muskelpartien besiedeln, weil für die weitere Verwertung der Tiere eine Unbedenklichkeit der Schlachtprodukte unerlässlich ist. Ferner dürfen Probiotika die Gesundheit des Wirtes und der Person, der mit dem Präparat umgeht, nicht beeinträchtigen. Durch den Einsatz von Probiotika muss eine Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika ausgeschlossen sein. Ein Probiotikum muss unter einer Vielzahl von unterschiedlichen Umweltbedingungen und in verschiedenen Medien überleben. Es muss eine Stabilität gegenüber industriellen und technischen Prozessen in der Produktion der Futtermittel (z. B: Pelletierung, Lagerung) besitzen. Eine Unempfindlichkeit gegenüber Speichel- und Verdauungsenzymen, Magensäure und Sekreten der Darmanhangsdrüsen wird vorausgesetzt, sowie die Fähigkeit zur Anhaftung (Adhäsion) und Besiedlung (Kolonisation) an Darmepithelzellen. Ein Probiotikum soll gute sensorische Eigenschaften haben und nach Möglichkeit an die physiologische Darmflora des Wirtes

angepasst sein. Es soll antimikrobielle Substanzen bilden können. Lebensfähige Probiotika sollten nur in geringer Menge ausgeschieden werden, und sie sollten in der Umwelt nur eine geringe Lebensfähigkeit haben. Es dürfen nur Stämme zugelassen werden, die sich in ihrem Resistenzverhalten nicht von dem der Feldstämmen unterscheiden. Dass ein einzelnes Probiotikum nicht über alle Eigenschaften gleichzeitig verfügen kann, ist anzunehmen (DUNNE, 2001). Mit dem Einsatz von Probiotika in der Veterinärmedizin werden unter anderem eine verbesserte Futterverdaulichkeit, gesteigerte Wachstumsraten, die Verhütung von Durchfallerkrankungen und eine allgemeine positive Wirkung auf das Immunsystem beabsichtigt (ALEXOPAULOS et al., 2001; REID et al., 1988; FULLER et al., 1999).

Das in dieser Arbeit eingesetzte Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 ist zugelassen. Nach der Verordnung (EG) Nr. 252/2006 ist die Verwendung von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 im Anhang I unter der EG-Nr. E 1705 unbegrenzt für Sauen und Ferkel zugelassen.

**Tabelle 2-5** *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) in der Tierernährung (Stand 2007)

Bezeichnung	Zugelassen für	Mindestgehalt	Höchstgehalt
		KBE/Kg Alleinfuttermittel	
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	<b>Kälber</b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>	<b>6,6x 10<sup>9</sup></b>
	<b>Masthühner</b>	<b>0,3x10<sup>9</sup></b>	<b>2,8x 10<sup>9</sup></b>
	<b>Mastschweine</b>	<b>0,35x10<sup>9</sup></b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>
	<b>Sauen</b>	<b>0,7x10<sup>9</sup></b>	<b>1,25x10<sup>9</sup></b>
	<b>Ferkel</b>	<b>0,35x10<sup>9</sup></b>	<b>1x10<sup>9</sup></b>

### 2.5.3. Wirkungsmechanismen von Probiotika

#### 2.5.3.1. Allgemein

Probiotika sind ihrer Definition nach eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien, Hefen und Pilzen. Zwischen den einzelnen Bakterienstämmen, die als Probiotika eingesetzt werden, existieren große Unterschiede, den Aufbau, ihre Stoffwechselleistung und ihre Überlebensfähigkeit im Magendarmkanal betreffend. Deshalb ist nicht zu erwarten, dass ihre

## Literaturübersicht

---

Wirkung pauschal durch gleiche Wirkungsmechanismen für alle Probiotika erklärt werden kann. Man geht heute davon aus, dass es sich hierbei um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Je nach Keim sind spezielle Mechanismen für die Wirkung verantwortlich. Allein für wenige Stämme konnten einige der in der Tabelle 2.6 aufgeführten Wirkungsmechanismen belegt werden. Für viele andere Behauptungen gibt es keine oder nur geringere wissenschaftliche Beweise. GÖRKE & LIEBLER-TENORIO (2001) teilen die Wirkung der Probiotika in zwei große Klassen: die Wirkung der Probiotika auf den Wirtsorganismus einerseits und die Interaktion zwischen dem Probiotikum und anderen intestinalen Mikroorganismen andererseits.

**Tabelle 2-6** Klassifizierung der Wirkungsmechanismen von Probiotika: Hypothesen und mögliche Angriffspunkte nach GÖRKE und LIEBLER-TENORIO (2001)

<b>Wirkung auf den Wirtsorganismus</b>	<b>Interaktion zwischen dem Probiotikum und anderen Darmbewohnern</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Förderung des unspezifischen Immunsystems</li><li>➤ Verstärkung der spezifischen Immunantwort</li><li>➤ Beeinflussung der Schleimhautpermeabilität</li><li>➤ Positive Beeinflussung von zellulären Transportmechanismen</li><li>➤ Anabole Wirkung auf den Gesamtstoffwechsel</li><li>➤ Förderung der Schleimhautdifferenzierung</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Konkurrenz um limitierende Nährstoffe</li><li>➤ Konkurrenz um definierte Bindungsstellen</li><li>➤ Agglutination von Keimen</li><li>➤ Veränderung des intestinalen Milieus</li><li>➤ Produktion von antimikrobiellen Substanzen</li><li>➤ Neutralisation von Toxine</li></ul>

### 2.5.3.2. Diskutierte Wirkungsmechanismen von Probiotika

Probiotika wie *Enterococcus faecium* gehören zu den Darmbewohnern und sind in der Stoffwechselaktivität dieses Habitats voll integriert. Sporen von Bodenbakterien (z. B. *Bacillus spp.*) müssen erst keimen und in vegetative Zellen überführt werden, um an der Stoffwechselaktivität teilzunehmen. Hefen, die als Probiotika eingesetzt werden (z. B. *Saccharomyces cervices*) kommen ursprünglich gar nicht im Darm vor (SIMON & BREVES, 2000) und müssen daher erst ihren Platz finden. Diese angeführten Beispiele sollen

verdeutlichen, dass nicht alle Probiotika gleich wirken, vielmehr hängt die Wirkung vom Bakterienstamm ab.

### **2.5.3.2.1. Allgemeine Wirkungsmechanismen**

Für viele gesundheitsfördernde Auswirkungen, die die Probiotika auf den Organismus haben, ist es noch immer nicht möglich eine wissenschaftliche Erklärung zu finden. Des Weiteren haben probiotische Stämme nicht auf jedes Individuum einer spezifischen Art den gleichen Effekt

#### **2.5.3.2.1.1. Die Besiedlung des Magen-Darm-Trakts**

Für viele pathogene Keime ist die Bindung an bestimmte Rezeptoren auf der Darmschleimhaut die Voraussetzung für eine Infektion. Die physiologischen Einrichtungen des Darms, wie die Mucinschicht, eine lückenlose Epithelschicht und Darmperistaltik stellen eine erste Barriere gegen pathogene Keime dar. Wenn diese Barriere unterbrochen wird, z. B. bei Darmentzündung, Epithelverletzungen etc., gelangen pathogene Keime an bestimmte Bindungsstellen und lösen Krankheiten aus. Durch die Anheftung an intestinale Zellen führt das Probiotikum den ersten Schritt der Wechselwirkung mit dem Organismus aus. Hiermit werden bestimmte Rezeptoren besetzt, die sonst evtl. von pathogenen Keimen besetzt werden könnten, z. B. pathogene *E. coli* (JOHANNSSON et al., 1993) oder *Salmonella thyphimurium* (BERNET et al., 1994; SAXELIN et al., 1997). Ferkel, die mit einem bestimmten apathogenen Stamm von *E. coli* besiedelt sind, erkrankten nicht nach einer Infektion mit einem toxinbildenden Stamm, der dasselbe Fimbrien-Antigen besaß. Wenn Anheftungsstellen der Glykokalix durch die apathogenen Mikroorganismen, so vermuteten DAVIDSON und HIRSH (1976), besetzt werden, stehen sie den pathogenen Keimen nicht mehr zu Verfügung. Während einer Untersuchung mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass konventionell gehaltene Mäuse erst bei einer Behandlung mit  $10^9$  KBE von *Salmonella enteritidis* sterben. Die letale Dosis des gleichen Keimes betrug bei keimfrei gehaltenen Tieren nur 10 KBE (COLLINS & CARTER, 1978). Die Anheftung von *Helicobacter pylori* an die Magenschleimhaut gnotobiotischer Mäuse könnte durch eine Behandlung mit *Lactobacillus salivarius* verhindert werden (KABIR et al., 1997). Die Hefe *Saccharomyces boulardii* besitzt einen Mannose-Rezeptor, der fähig ist, einen bestimmten pathogenen *E. coli*-Stamm

## Literaturübersicht

---

und einen *Salmonella typhimurium*-Stamm zu agglutinieren und dadurch deren Pathogenität abzuschwächen (GEDEK & AMSELGRUBER, 1990).

Bei einer Studie von DE VRESE (2003) mit 769 Probanden (13,3% davon *Helicobacter*-positiv) konnte gezeigt werden, dass in Joghurt enthaltene Substanzen *Helicobacter pylori* inhibieren. In der Probiotika-Gruppe traten deutlich weniger und kürzere Antibiotika-assoziierte Beschwerden auf (DE VRESE, 2003).

In einer Studie von SYKORA et al. mit 86 Kindern mit Gastritissymptomatik durch *Helicobacter pylori*-Infektion konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der Eradikationstherapie mit Omeprazol-Amoxicillin und Clarithromycin in der Probiotika-Gruppe (fermentierte Milch mit *Lactobacillus casei* DN-114001) deutlich höher war als in der Kontroll-Gruppe (SYKORA et al., 2005). *Lactobacillus acidophilus* inhibiert das Eindringen von enteropathogenen *E. coli* und anderen gramnegativen Bakterien (BERNET et al., 1994). Auch *Lactobacillus casei* führt bei neugeborenen Kaninchen zu signifikant reduziertem Gehalt an *E. coli* K<sub>1A</sub>, so dass eine bakterielle Invasion verhindert werden konnte (LEE et al., 2000). *Enterococcus faecium* 18c23 kann in dosisabhängiger Weise die Anheftung von *E. coli* K88 und K8MB an die Darmmucosa mit einer Effizienz von 90% verhindern, wenn mindestens 10<sup>9</sup> KBE pro ml zusammen mit *E. coli* verabreicht werden (JIN et al., 2000). Ein Versuch, bei dem kommerzielles Futter, welches *L. casei* enthielt, an Ferkel verabreicht wurde, ergab, dass es in der *Lactobacillus*-Gruppe weniger *E. coli* gab als in der Kontrollgruppe (VIERA et al., 1999).

Der Einfluss von mit *L. casei shirota*-fermentierter Milch auf die indigenen *Laktobazillen* im Darm des Schweins wurde von OHASHI (2001) untersucht. Er stellte fest, dass die Anzahl der *Laktobazillen* und *Bifidobakterien* im Darm mit der Aufnahme von fermentierter Milch ansteigt. Es kam zu einer Abnahme des Digesta-pH durch eine ansteigende Laktat- und Acetatkonzentration, die evtl. vor einem Wachstum von pathogenen und potentiell pathogenen Bakterien schützt. Auch der pH-Wert im Kot sank mit der Aufnahme der fermentierten Milch, bedingt durch die Abnahme der Anzahl der Enterobakteriaceen und Enterokokken (OHASHI et al., 2001).

In einer Meta-Analyse mit randomisierten Kontrollen konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus rhamnosus* GG einen konsistenten Vorteil gegenüber dem Placebo hat, in dem er die Dauer und die Schwere von akuten Diarrhöen bei Kindern reduziert (SZAJEWSKA et al., 2001). Eine zweite Meta-Analyse bestätigt, dass die Dauer akuter Diarrhöen bei Kindern um etwa einen Tag verkürzt wird (HUANG et al., 2002).

In einer Studie von PEDONE (2002) wurde untersucht, ob die Inzidenz akuter Diarrhöen bei gesunden Kindern mit *L. casei defensis* gesenkt werden kann, in der Probiotika-Gruppe wurde die Inzidenz von Diarrhöen mit 15,9% angegeben, in der Kontrollgruppe betrug sie 22% (PEDONE et al., 2000). Bei einem Versuch mit *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus acidophilus* an menschlichen Darmzellen, welche mit enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) infiziert wurden, konnte eine signifikant erniedrigte Adhäsion und Invasion der *E. coli* sowie erniedrigte Dysfunktionen der infizierten Darmzellen durch EIEC festgestellt werden (LENERT & BARNETT, 2003).

Bei Patienten mit Proktektomie (Koloproktektomie) wurden Probiotika zur Prophylaxe eingesetzt, vier verschiedene *Lactobacillus*-Arten, drei verschiedenen *Bifidobacterium*-Arten und eine *Streptococcus*-Art bewirkten bei der behandelten Gruppe eine Senkung der Entzündungssymptome gegenüber der Placebo-behandelten Gruppen (GIONCHETTI et al., 2003). Die Heilung von Säure-induzierten Magengeschwüren konnte durch die Behandlung mit verschiedenen Bifidobakterien-Arten stark beschleunigt werden, besonders durch den Polysaccharid-Anteil (speziell Rhamnose) in der Zellwand der Milchsäurebakterien wird diese positive Wirkung hervorgerufen (NAGAOKA et al., 1994).

### **2.5.3.2.1.2. Veränderungen des intestinalen Milieus**

Die meisten Probiotika bewirken durch ihre Stoffwechselleistung eine Veränderung des intestinalen Milieus (NOGOSSEK, et al., 2001). Der pH-Wert im Darm scheint fast immer abzusinken durch den Einsatz von Probiotika, hauptsächlich durch die von den Probiotika-Keimen freigesetzten organischen Säuren und Laktat.

Die Absenkung des pH-Wertes im Darm hat mehrere positive Folgen. Zum einen wirkt ein niedriger pH-Wert gegen die Vermehrung von enteropathogenen Keimen, sowie gegen die Bildung von Toxinen (AUDISO, 1999; COLLINS & GIBSON, 1999). Zum anderen kommt es dadurch auch zur Absenkung der Gesamtkeimzahl im Darm (WHITE et al., 1969). Die Behandlung von Patienten mit *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 führt zur Anhäufung von Laktat im Dünndarmchymus, dadurch kommt es zur Stimulierung des Wachstums von milchsäurebildenden Bakterien (VAHJEN et al., 2002; MÄNNER et al., 2002).

Durch den Einsatz von *Bifidobacterium bifidum* bei Säuglingen und *Bifidobacterium longum* bei Erwachsenen konnte jeweils eine Absenkung des pH-Wertes in den Faeces der Patienten festgestellt werden. Die hohe Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren im Darmlumen ist ebenfalls auffällig beim Einsatz von Probiotika, da es durch die mikrobielle Fermentation zur Entstehung von kurzkettigen Fettsäuren kommt, die in der Lage sind, die Besiedlung und

Vermehrung der im Darm lebenden Enterobakteriazeen zu hemmen (BYRNE & DANKERT, 1979).

*Saccharomyces boulardii* konnten bei einem Versuch, bei dem der Gehalt an freien Fettsäuren durch die Behandlung mit Clindamycin abgesunken war, diesen wieder ausgleichen. Auf den Butyrat-Spiegel haben die Hefen allerdings keinen Einfluss (BREVE et al., 2000).

Die häufig in probiotischen Präparaten verwendeten Laktobazillen sind in der Lage, durch Veränderung ihrer Stoffwechselaktivität pathogene Keime in ihrem Wachstum zu beeinträchtigen. Dies geschieht über verschiedene Enzyme wie  $\beta$ -Glukuronidase oder Nitroreduktase, die das intestinale Milieu beeinflussen.

Die Fähigkeit, bestimmte Toxine zu neutralisieren, ist nur bestimmten Probiotika vorbehalten. Bei der Neutralisation werden die direkte Bindung der Giftstoffe und die indirekte Beeinflussung durch die Bildung von neutralisierenden Substanzen unterschieden. Das Probiotikum *Lactobacillus bulgaricus* kann die Wirkung eines Neurotoxins neutralisieren (SISSONS, 1989). Einige Laktobazillenstämme besitzen die Fähigkeit, freie Eisen-Radikale zu binden (STECCHINO et al., 2001). Da die meisten pathogenen Keime freies Eisen als Wachstumsfaktor benötigen, wird ihr Wachstum beeinträchtigt. *Lactobacillus bulgaricus* z.B. kann freies Eisen binden (SISSONS, 1989). *Saccharomyces boulardii* besitzt spezielle Toxinrezeptoren für eine Untereinheit des Cholera-toxins. Kommt Cholera-toxin im Darm vor, so bindet es an diesen Rezeptor, bevor es in Kontakt mit den Enterozyten kommt und seine Wirkung entfalten kann (BRANDACE et al., 1998). Inkubiert man eine Bürstensaumzelllinie mit dem Probiotikum *Saccharomyces boulardii*, so bindet signifikant weniger Toxin A von *Clostridium difficile* an der Zelllinie als ohne Behandlung mit der probiotische Hefe. Im Darm lebender Tieren könnte dadurch die von dem Toxin A verursachte Hypersekretion verringert werden (POTHOULAKIS et al., 1993).

### **2.5.3.2.1.3. Veränderungen der Enzymaktivität**

Verdauungsenzyme wie Laktase,  $\alpha$ -Glukosidase und Alkalische Phosphatase waren nach Behandlung mit *Saccharomyces boulardii* erhöht (JAHN et al., 1996). *Lactobacillus rhamnosus* wirkt (in Zellkultur sowohl aus dem Colon von Mäusen als auch von Menschen) dem intrazellulären pro-apoptotischen Mechanismus (Mitogen-Aktivierte Proteinkinase) entgegen und aktiviert die zelleigenen anti-apoptotischen Enzyme (Proteinkinase B). Dadurch verhindert *Lactobacillus rhamnosus* den Tod von intestinalen Epithelzellen durch eine Regulation dieser beiden Signalwege (YAN & POLK, 2002).

#### 2.5.3.2.1.4. Veränderungen der Darmmorphologie und Transportphysiologie

*Bacillus cereus var. toyoi* und *Saccharomyces boulardii* bewirken während einer Studie am Schwein längere Zotten im *Jejunum* (GÖRKE, 2000). *Bacillus cereus var. Toyoi* bewirkt nach einer Veröffentlichung von THELEN (1997) die Verlängerung der Duodenumzotten. Allerdings konnte in zwei anderen Studien mit den beiden Probiotika, *Enterococcus faecium NCIMB 10415* und *Bacillus cereus var. toyoi* anhand morphometrischer Messungen kein signifikanter Effekt auf die Zottenlänge, Kryptentiefe und Oberflächenvergrößerung in der Dünndarmschleimhaut des Schweins gefunden werden (REITER et al., 2005).

*Saccharomyces boulardii* bewirkt bei Ratten mit einer *Clostridium difficile*-Infektion eine verminderte Durchlässigkeit von Mannit (CASTAGLIUALO et al., 1996). Sowohl *Saccharomyces boulardii* als auch *Bacillus var. toyio* führen bei Ussing-Kammer-Versuchen zur Abnahme der parazellulären Permeabilität für Mannit im Schweindünndarm (WINKLER et al., 1998). *Laktobacillus plantarum* führt bei Ratten mit einer Säure-induzierten Kolitis zu keiner Steigerung der Permeabilität (KENNEDY et al., 2000). *Lactobacillus plantarum* schützt ebenfalls den Darm vor einer Steigerung der Permeabilität, hervorgerufen durch eine Injektion mit *E. coli* (MANGELL et al., 2002). Im Dün- und Dickdarm von Ratten hat *Saccharomyces boulardii* eine antisekretorische Wirkung in Bezug auf Chlorid. Bei Zugabe von *Saccharomyces boulardii* wird die sekretionsstimulierende Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf Chlorid im Jejunum aufgehoben (KRAMMER & KARBACH, 1993). Diese antisekretorische Wirkung von *Saccharomyces boulardii* könnte in einer Hemmung der CAMP und/oder Ca<sup>++</sup> liegen (CZERUCK & RAMPAL, 1999).

#### 2.5.3.2.1.5. Konkurrenzen um Nährstoffe

Durch die Konkurrenz um limitierende Substrate für die Fermentation führen die Probiotika zur Verdrängung der pathogenen Keime. Dabei geht es um spezielle Nährstoffe, die nicht in ausreichender Menge vorhanden sind. Durch die Gabe von probiotischen Keimen kommt es zum Verbrauch dieser limitierenden Substrate, so stehen sie den pathogenen Keimen nicht mehr zur Verfügung, was zur Einschränkung ihres Wachstums führen sollte (ROLFE, 2000). Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von leicht fermentierbaren Kohlenhydraten, wie Glukose, N-Acytel-Glukosamin oder Sialinsäure für die Besiedlung des Darmtraktes mit bestimmten pathogenen Keimen wie *Clostridium difficile* notwendig ist (WILSON & PERINI, 1988). Durch den Einsatz von Probiotika, die solche leicht fermentierbaren Kohlenhydrate als Nährstoffgrundlage benutzen, könnten die pathogenen Keime in Wachstum und Aktivität behindert werden. Außerdem produzieren Probiotika diverse antimikrobielle

Substanzen, sog. Bakteriozine (FULLER, 1999). Bakteriozine bestehen hauptsächlich aus organischen Säuren, hydrogenen Peroxiden und nicht-peptid- oder -polypeptid-Antibiotika (ZIMMERMANN et al., 2001).

### **2.5.3.2.2. Spezielle Wirkungen auf das Immunsystem**

Es wird angenommen, dass diverse Probiotika in der Lage sind, die Widerstandsfähigkeit des tierischen und menschlichen Organismus gegenüber bestimmten Infektionskrankheiten zu erhöhen, indem sie die systemische und mukosale Immunität positiv beeinflussen (ZIMMERMANN et al., 2001). Zum Einen kommt es zur Wechselwirkung zwischen Probiotikum und Darmepithel (MC GHEE et al, 1992), zum Anderen wirkt das Probiotikum auf Immunzellen des Darms ein, z. B. auf M-Zellen (MUSCETTOLA et al., 1999). Das Probiotikum kommt so mit dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe in Kontakt (MC GHEE et al., 1992), es kommt zur Interaktion zwischen GALT und dem Probiotikum. Dadurch bewirken die Milchsäurebildner eine Veränderung des Zytokin-Musters und der Antikörperproduktion. Nach dem Verzehr von *Lactobacillus acidophilus La1* and *Bifidobacterium spp*, konnte sowohl ein Anstieg der Produktion von IgA in den PP beobachtet (LINK-AMSTER et al., 1994) als auch der mitotischen Aktivität der Zellen in den PP und in der Milz bewiesen werden (MEYDANII et al., 2000).

#### **2.5.3.2.2.1. Wirkung auf das unspezifische Immunsystem**

Die positive Auswirkung der Gabe von Milchsäurebakterien auf das Immunsystem ist seit längerem bekannt, wobei sich diese sowohl lokal auf den Darm als auch systemisch auf das gesamte Immunsystem erstrecken kann. Auch hier scheint eine individuelle, spezifische Wirkung der verschiedenen als Probiotika angewendeten Bakterien vorzuliegen (VITINI et al., 2000). Die orale Behandlung von Mäusen mit *Laktobacillus casei* über acht Tage führt zu einer erhöhten Phagozyten- und Makrophagenaktivität im retikuloendothelialen System (PERDIGON et al., 1986). Diverse Milchsäurebakterien zeigen in in-vitro-Versuchen die Fähigkeit, die Freisetzung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL<sub>6</sub> anzuregen, die stimulierend auf die unspezifische Immunabwehr wirken (MIETTINEN et al., 1996).

Mäuse mit IL-10-Defizienz entwickeln bei normaler Haltung eine chronische Colitis, welche als Modell vergleichbar ist zum menschlichen Morbus Crohn (MADSER et al., 1999). IL-10-defiziente Mäuse entwickeln bei steriler Haltung keine Colitis. Die Behandlung (rektal oder oral) mit *Lactobacillus reuteri* kann die Ausbildung der Colitis verhindern (MADSEN et al.,

1999). Auch eine durch Essigsäure verursachte Colitis entwickelt sich nicht, wenn die Tiere mit *Lactobacillus reuteri* behandelt werden (FABIA et al., 1993).

Sowohl die mRNA-Expression als auch die Zytokinfreisetzung, insbesondere TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 von menschlichen, peripheren, mononukleären Zellen wird durch Laktobazillen stimuliert (MIETTINEN et al., 1996). Die in-vitro Produktion von IFN- $\gamma$  durch Milzzellen aus jungen Mäusen (7 Tage alt) und aus 19 Monaten alten Mäusen nach Fütterung mit *L. bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* war gestiegen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (MUSCOTTOLA et al., 1994)

Es wird angenommen, dass die orale Gabe von Laktobazillen das Immunsystem dadurch stimuliert, dass es zu einem Anstieg der Sekretion von IFN- $\gamma$  in den Zellen der Peyerschen Platte kommt (SOLIS-PEREYRA, 1997). Die Behandlung einer Makrophagen-Zelllinie mit *Streptococcus thermophilus* führte bei einem in-vitro-Versuch zum Anstieg der Interleukin Produktion (MARTIN et al., 1998), wobei diese Ergebnisse in vivo nicht reproduzierbar waren (TEJADA-SIMON et al., 1999). Eine intraperitoneale Injektion von probiotischen Keimen hatte eine gesteigerte Makrophagen- und Natural Killer-Zell-Aktivität bei Mäusen zur Folge (KATO et al., 1984). Bei oraler Gabe waren ebenfalls die Phagozytoserate und die Produktion lysosomaler Enzyme durch die Makrophagen gesteigert (PERDIGON et al., 1998). Auch bei Saugferkeln lassen sich diese Ergebnisse nach Gabe von *Bifidobacterium lactis* ( $10^9$  KBE/ Tier/ Tag) erzielen (QUAN et al., 2001).

Bei einer Studie mit Milchsäurebakterien konnte gezeigt werden, dass es bei Menschen ebenfalls zur gesteigerten Phagozytose kommt (SCHIFFRIN et al., 1994). *Lactobacillus casei* hat bei Mäusen nach oraler Gabe eine gesteigerte Phagozytoserate der Peritonealmakrophagen zur Folge, während die intravenöse Gabe des gleichen Stammes einen hemmenden Effekt hatte (ERIKSON et al., 2000). *Lactobacillus bulgaricus* und *Saccharomyces thermophilus* fördern nach oraler Gabe im Mausversuch die IFN- $\gamma$  Produktion in den Milzzellen, die mit Lymphozytenmitogen stimuliert werden (MUSCETTOLA et al., 1994). Interferon  $\gamma$ -Produktion von humanen peripheren Blutlymphozyten konnte in Versuchen durch Zusatz von Milchsäurebakterien in dosisabhängiger Weise gesteigert werden (DE SIMONE, et al., 1986). Die Menge von TNF in den Faeces war bei einem anderen Versuch vermindert (ISOLAURI et al., 2001).

### **2.5.3.2 2.2. Wirkung auf das spezifische Immunsystem**

Insbesondere der Einfluss auf die Antikörperproduktion, Plasmazellen, Zytokinmuster und T-Lymphozyten war Gegenstand vieler Studien. *Lactococcus lactis*, *Lactococcus acidophilus*

## Literaturübersicht

---

und *Lactococcus plantarum* bewirken einen Anstieg der IgM-produzierenden Zellen im Darmepithel (PERDIGON et al., 1999). *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salvarius ssp.bulgaricus* und *Lactobacillus lactis* führen ebenfalls zur einem Anstieg der IgA-produzierenden Zellen in den lymphatischen Geweben des Darmes. Dosisabhängig können Milchsäurebakterien die Sekretion von Typ2-Zytokinen beeinflussen, die für die Entstehung von allergischen Reaktionen mitverantwortlich sind (POCHARD et al., 2002).

Bei Mäusen mit Blasentumor bewirkt die Behandlung mit *Lactobacillus rhamnosus* eine über das Immunsystem modulierte antikanzerogene Wirkung. Die Zahl der Lymphozyten und Granulozyten war in dieser behandelten Gruppe ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe (LIM et al., 2002).

Bei einer Studie mit *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium Bb 12* und *Streptococcus thermophilus* konnte anhand eines Challenge-Versuchs mit *Typhimurium* Type 21a gezeigt werden, dass der spezifische IgA-Titer bei den probiotisch behandelten Personen höher war als in der Kontrollgruppe (LINK-AMSTER, 1994). Eine Behandlung von an Rotaviren erkrankten Kindern mit *Laktobacillus GG* führte zu höherer Sekretion von spezifischen IgA gegen Rotaviren und einer Reduktion der Dauer der Diarrhoe, verglichen mit unbehandelten Kindern (KAILA et al, 1992). Durch die Aufnahme von *Lactobacillus casei* und *Lactobacillus acidophilus* erhöhte sich in dosisabhängiger Weise die IgA-Produktion der Plasmazellen und der Ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (PERDIGON et al., 1991).

Die Behandlung von Ratten mit *Sacchamyses boulardii* bewirkte einen Anstieg an sekretorischem IgA im Darmlumen (BUTS et al., 1990). Bei der einwöchigen Fütterung von *Saccharomyces boulardii* oder der zweiwöchigen Fütterung von *Bacillus cereus var toyoi* an Schweine erhöhte sich der Anteil an IgA-produzierenden Plasmazellen im Dünndarm, bei gleichzeitiger Abnahme der selben Zellen im Dickdarm (VAN BRIEL, 2002).

Während eines Challenge-Versuches mit Salmonellen führte die Behandlung mit Joghurt zur höheren Serum-IgA-Konzentration (PURI et al., 1996). Bei neugeborenen Kindern kam es nach der Verabreichung des *E. coli* Nissle 1917 zu einer Steigerung der lokalen und systemischen Produktion von IgA. (gesamt IgA). Bei oral mit Cholera-toxin immunisierten Mäusen war die Konzentration von spezifischem IgA gegen das Cholera-toxin im Serum und im Kot höher, wenn ihnen gleichzeitig bestimmte Milchsäurebakterien gegeben wurden (VIERA et al., 1999).

*Saccharomyces boulardii* bewirkte bei Menschen einen Anstieg der Leukozytenzahl (NEUMANN et al., 1986). Milchsäurebakterien führten in dosisabhängiger Weise zum Anstieg der Anzahl IgA-produzierender Zellen im Darm (PERDIGON et al., 1995).

Die Behandlung von Ferkeln mit *Enterococcus faecium* von der Geburt bis zum Alter von 2 Monaten führte allerdings zur keiner signifikanten Veränderung – weder von fäkalem IgA noch von IgG im Serum (SCHAREK et al., 2003). Die Immunisierung von Mäusen mit Cholera toxin (CT), die zusätzlich zu den traditionellen Joghurtbakterien (Kontrollgruppe) probiotische Keime, wie *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* und *Bifidobacterium bifidum* (Probiotika-Gruppe) enthielten, zeigten signifikant mehr Cholera toxin-spezifisches IgA im Serum und Kot. Hinsichtlich des Gehalts an spezifischen IgG im Serum und im Kot gab es keinen Unterschied (TEJADA-SIMON et al., 1998).

Die Behandlung von Ferkeln mit *Bifidobacterium bifidum* bzw. *Bifidobacterium breve* rief ebenfalls eine gesteigerte Antikörperproduktion gegen Ovalbumin und Cholera toxin hervor (ISOLAURI et al., 2001). Nach einer mehrwöchigen Behandlung mit *Saccharomyces boulardii* stieg die Expression von IL2-Rezeptoren auf den peripheren CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (VIERA et al., 1999). CD3<sup>+</sup> im Epithel und in der *Lamina propria* von Ferkeln, die mit *Lactobacillus casei* behandelt wurden, waren signifikant geringer im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Zugabe von *Saccharomyces boulardii* oder *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®) führte zur Veränderung der Darmlymphozyten beim Schwein. Während die Anzahl von CD4<sup>+</sup> im Jejunum größer war, nahm ihre Anzahl im Dickdarm ab. CD8<sup>+</sup> waren stärker vertreten im Epithel des mittleren *Jejunum* und im proximalen *Colon* (VAN BRIEL, 2002).

Die Behandlung von Mäusen mit Laktobazillen und *Streptococcus thermophilus* -haltigem Joghurt führte zum Anstieg der Anzahl der B-Zellen in den Peyerschen Platten (DE SIMONE et al., 1988).

Ein signifikanter Anstieg der weißen Blutzellen mit phagozytotischer Aktivität wurde bei Menschen nach einer dreiwöchigen Aufnahme von *B. bifidum* und *Lactobacillus acidophilus* beschrieben (SCHIFFRIN et al., 1997).

In-vivo- und in-vitro-Versuche zur Stimulierung der unspezifischen Abwehrmechanismen durch *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*-Stämme sind zahlreich.

Die Wirkung der Probiotika scheint von vielen Faktoren abhängig zu sein. Je nach Art, Dauer und Dosierung der probiotischen Behandlung variieren die erzielten Ergebnisse erheblich voneinander.

## Literaturübersicht

---

Bei einer Studie zum Einfluss von Probiotika auf Anzahl und Verteilung von Plasmazellen und Lymphozytenpopulation in der Darmschleimhaut erhielten Ferkel *Saccharomyces boulardii* oder *Bacillus cereus* als Mastfutterzusatzstoff. *Saccharomyces boulardii* bewirkte eine deutliche Zunahme der IgA<sup>+</sup>-Plasmazellen und  $\gamma\delta^+$ -Lymphozyten. *Bacillus cereus var. toyoi* führte zur Zunahme der CD6<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im mittleren Jejunum. Im proximalen Jejunum kam es bei beiden Probiotika-Gruppen zu einer Abnahme der CD6<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Zottenbereich und der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (VAN BRIEL, 2002).

Der Effekt der Probiotika auf das Zytokinmuster wurde in zahlreichen Studien untersucht. Unter anderem untersuchte man das mRNA-Profil nach Behandlung mit verschiedenen Probiotika. Bei einer Studie zum Einfluss von Probiotika auf Lebensmittelallergien bei Kindern konnte gezeigt werden, dass probiotische Bakterien die Entzündungsreaktion einerseits mildern, andererseits bei gesunden Probanden immunstimulierende Effekte haben. Die Autoren sahen bei diesen Ergebnissen einen klaren Hinweis darauf, dass der probiotische Effekt auf das Immunsystem maßgeblich vom Immunstatus des Wirtsorganismus abhängt und mehr modulativen als stimulativen Charakter besitzt (PELO et al., 1998).

Eine Studie von KALLIOMAKI (2001) zeigte, dass Mütter, die in der Schwangerschaft *Laktobacillus GG* erhielten und diese Keime nach der Geburt dem Kind und der stillenden Mutter weiterhin gegeben wurden, die Inzidenz der atopischen Ekzeme bei den Kindern mit höherem familiären Risiko für atopische Dermatitis nach zwei und vier Jahren um die Hälfte reduziert werden konnte (KALLIOMÄKI et al., 2001).

In einer Studie von LODINOVA-ZADNIKOVA et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von *E. coli*-Stämmen an neugeborene Kinder die Häufigkeit von Allergien und rezidivierenden Infektionen im weiteren Lebenslauf (10 bis 20 Jahren) reduzierten.

Probiotika haben aber nicht nur positive Eigenschaften. Zahlreiche Studien zeigten, dass unter bestimmten Umständen Probiotika negative Auswirkung auf die Wirtsgesundheit haben könnten. Es wird zwischen drei Arten der möglichen negativen Eigenschaften von Probiotika unterschieden: negative Auswirkung durch die Probiotika selbst, durch ihre Stoffwechsellleistung oder durch ihre Metaboliten.

Es wurde von Fällen mit systemischen Erkrankungen und Endocarditis berichtet, verursacht durch Laktobazillen und Bifidobakterien oder andere LAB Bakterien. Von den Laktobazillen wurden bei klinischen Fällen vor allem *L. rhamnosus*, *L. casei* und *L. plantarum* isoliert. Auch *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* mit Vancomycinresistenz wurden bei klinischen Infektionen isoliert (FRANZ et al., 1999), aber auch von *Saccharomyces boulardii* wurde im Zusammenhang mit klinischen Infektionen berichtet (HENNEQUIN et al., 2000).

Eine sehr hohe Anzahl an probiotischen Bakterien im Dünndarm kann Diarrhoen und Läsionen in der Schleimhaut auslösen, insbesondere durch exzessive Dekonjugation und Dehydroxylation der Gallensäure (MARTEAU et al., 1999).

Zellwandkomponenten wie Peptidoglycan oder Polysaccharide der grampositiven Bakterien, wie Laktobazillen, können Fieber, Arthritis oder Autoimmunerkrankungen hervorrufen (HALLER et al., 2000).

Probiotika können evtl. Resistenzen auf andere Darmbakterien oder auf pathogene Keime übertragen. (MARTEAU et al., 1999; MCCONNEL et al., 1991).

### **2.5.4. *Enterococcus faecium***

#### **2.5.4.1. Allgemeine Eigenschaften**

Enterokokken gehören zusammen mit den Genera *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* und *Lactococcus* zur Gruppe der Milchsäure-bildenden Bakterien. Die Enterokokken wurden als Gruppe erstmals von THIERCELIN (1899) erwähnt. Er und JOUHAUD schlugen 1903 für grampositive Diplokokken intestinalen Ursprungs die Bezeichnung „*Enterococcus*“ vor. Das Genus *Enterococcus* wurde von KILLPER-BLÄZ und SCHLEIFER (1984) erstmals beschrieben. Sie bewiesen durch DNA:DNA und DNA: rRNA Hybridisierung, dass sich *Streptococcus faecium* und *Streptococcus faecalis* genug von anderen Streptokokken unterscheiden, um ihre Einteilung in ein eigenes Genus zu rechtfertigen. Seit 1984 resultierten phylogenetische und taxonomische Studien in der Ordnung von 19 Spezies zum Genus *Enterococcus* (DEVRIESE et al., 1993).

Heute sind 27 verschiedene Spezies bekannt, wobei *E. faecalis* und *E. faecium* die bedeutsamsten sind (DÜTHORN et al., 2004). Innerhalb des Genus wurden außerdem vier „Speziesgruppen“ etabliert. *E. faecium* wurde dabei zusammen mit *E. durans*, *E. hirae* und *E. mundii* der „Faecium-Gruppe“ zugeordnet. Es gibt keine phänotypischen Charakteristika, die die Enterokokken von anderen grampositiven, Katalase-negativen kokkenförmigen Bakterien eindeutig abgrenzen (DEVRIESE et al., 1993). So gehören die Enterokokken zu den grampositiven Kokken, werden aufgrund ihrer Gruppenantigene in die Lancefield Gruppe D eingeordnet und lassen sich innerhalb dieser Gruppe von anderen Gattungen durch bestimmte phänotypische Kriterien unterscheiden (siehe Tabelle). Allerdings reichen diese Kriterien nicht für eine Abgrenzung von den Streptokokken aus, hierfür sind als Wachstums- und Toleranzkriterien die sogenannten „Sherman-Kriterien“ entscheidend. Sie beinhalten das Wachstum der Bakterien in einem Bereich von 10 bis 45<sup>0</sup> C, bei einem pH-Wert von 9,6 in Anwesenheit von 6,5 % NaCl und 40 % Galle. Außerdem kann zur Abgrenzung von den

## Literaturübersicht

---

Streptokokken ein Galle-Äscullin-Agar zur Isolierung und der Nachweis der Pyrrolodonyl-Peptidase (PRYase) dienen (ROLLE & MAYER, 2002).

Als Unterscheidungskriterien von *E. faecium* zu andern Enterokokkenspezies werden angegeben (MUNDT, 1986): Die Bildung von Ammoniak aus Arginin, Wachstum in 0,1% Methyleneblau-Milch, kein Tetrazolium, keine Decarboxylierung von Tyrosin, Säurebildung aus Melibiose und Sorbose, keine Säurebildung aus Melizitose. DEVRIESE et al. (1987) fanden hingegen auch *E. faecium*-Stämme, die keine Säure aus Melibiose, aber aus Melizitose bilden. Außerdem ergaben ihre Untersuchungen von 76 aus dem Darm unterschiedlicher Tierarten isolierter *E. faecium*-Stämme, dass die meisten der Isolate von Säugetieren keine D-Raffinose bilden. Zwölf von 15 bei Rindern, vier von fünf bei Hunden und zwei von 39 beim Geflügel isolierten Stämme reagieren Xylose-positiv, während der Rest der Proben Xylose-negativ war. Viele Stämme von *E. faecium* sind gegen das Antibiotikum Vancomycin und andere Glykopeptidantibiotika resistent.

Es sind drei Phänotypen von Resistenzen bekannt, die dem Namen der codierenden Gene entsprechen: VanA, VanB und VanC (KLEIN et al., 2000). Die Autoren fassten die Eigenschaften dieser drei Phänotypen folgendermaßen zusammen: VanA ist hochgradig gegen Vancomycin resistent (MIC >512 mg/l), außerdem weist er eine Kreuzreaktion gegen Teicoplanin auf (MIC 8 >mg/l). Das VanA-Gen ist auf einem Plasmid lokalisiert und somit übertragbar. Der VanB-Phänotyp besitzt eine nicht übertragbare Resistenz gegen niedrige Konzentration von Vancomycin (MIC>4 mg/l) und bleibt sensitiv für Teicoplanin (MIC > 4 mg/l). Der VanC-Phänotyp besitzt eine niedrige Resistenz gegen Avopracin (MIC>8-16 mg/l) und ist sensitiv gegenüber Teicoplanin. Es existieren außerdem noch andere Gene, die sekundär bei der Resistenz eine Rolle spielen (z. B. VanH, VanR, VanS, VanX, VanY und VanZ).

*E. faecium* ist gegenüber niedrigen pH-Werten und Gallensalzen resistent (LEWENSTEIN et al., 1979; BELLOMO et al., 1980; CANGANELLA et al., 1996). Lebende *E. faecium* sind außerdem bei vielen Tierarten wie Mensch, Schwein, Rind, Pferd, Schaf, Hund, Katze, Ente, Hase, Meerschweinchen, Hamster, Ratte und Maus im Kot nachweisbar (NOBLE, 1978; CHENOWETH et al., 1990; LECTERC et al., 1996; DEVRIESE et al., 1994). Somit ist anzunehmen, dass *E. faecium* die Passage durch den Verdauungstrakt der meisten Säugetiere überlebt. Obwohl einige Milchsäure-produzierenden Bakterien bereits seit Jahrhunderten in fermentierten Milchprodukten angewendet werden und generell als sicher gelten („generally recognised as safe“, [GARD]), sollten vor allem bei als Probiotikum neu angewendeten Stämmen immer mögliche negative Effekte im Auge behalten und die Anwendungssicherheit

dieser Bakterien im Tierfutter und Lebensmittel sorgfältig überprüft werden. Dies gilt vor allem für *E. faecium* enthaltende Probiotika auf Grund der übertragbaren Glykopeptidresistenz und der Tatsache, dass sich unter den Enterokokken einige opportunistische Krankheitserreger befinden. Wie bereits erwähnt, haben viele Untersuchungen ergeben, dass *E. faecium* im Kot der meisten Säugetiere nachweisbar ist und daher als normaler Bestandteil der Darmflora angesehen werden kann (NOBLE, 1978; CHENOWETH & SCHABERG, 1990; LECLERC et al., 1996; DEVRIESE et al., 1996).

Eine Translokation von *E. faecium* ins Blut oder in andere Organe ist bei gesunden Organismen sehr unwahrscheinlich. Im Bezug auf die Übertragung von Antibiotikaresistenzen konnte gezeigt werden, dass im Gastrointestinaltrakt der Maus das Plasmid pAM $\beta$ 1 (für Makrolid-Resistenz), von *Lactobacillus reuterii* auf *E. faecium* und auf *E. faecalis* übertragen werden kann (MCCONNEL et al., 1991). *E. faecium*, die gegen Vancomycin resistent sind, sind besonders gefährlich (FRANZ & HOLZAPFEL, 1999), da diese Resistenz Plasmid-codiert und Vancomycin eines der wenigen Antibiotika ist, das noch effektiv gegen bestimmte multiresistente Keime wirkt (SALMINEN et al., 1998). Deshalb sollten *E. faecium* vor ihrem Einsatz als Probiotikum auf jeden Fall auf eine Vancomycinresistenz getestet werden. Der in dieser Arbeit als Probiotikum eingesetzte Keim *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 ist Vancomycin-empfindlich.

### 2.5.4.2. Wirkungsweise des Probiotikums *E. faecium*

Die Adhäsion der probiotischen Bakterien an die Darmmukosa ist von Vorteil bei der Ansiedlung und Vermehrung der probiotischen Bakterien im Darm (ALANDER et al., 1993). Antagonistische Aktivität gegen enteropathogene Keime (COCONNIER et al., 1993), Modulation des Immunsystems (SCHIFFRIN et al., 1997) und eine Heilungsbeschleunigung von geschädigter Darmmukosa sind besonders deutlich, wenn sich die Probiotika dauerhaft im Darm angesiedelt haben (ELLIOTT et al., 1998).

JIN et al. (2000) untersuchten das Adhäsionsverhalten des *E. faecium* in-vitro an porcinem Muzin. Sie zeigten, dass ca. 9% der verabreichten Bakterien sich an das Muzin anheften können. Nach Behandlung mit Trypsin reduzierte sich die Bindungsfähigkeit, was auf die Proteinnatur dieser Bindung hindeutet (*E. faecium* 18C23 kann nach seiner Kolonisation im Darm die Bindungsfähigkeit der enterotoxischen *E. coli*-Stämme K88ac bei Ferkeln signifikant reduzieren). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei dieser Wirkung um eine sterische Behinderung der Bindung handelt. Bei einer Untersuchung zum Einfluss von *E. faecium* NCIMB 11508 bei Hühnern konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* keinen Einfluss

## Literaturübersicht

---

auf die Gesamtzahl der Laktobazillen, Enterokokken, Coliformen oder Salmonellen im Verdauungstrakt hat (NETHERWOOD et al., 1999).

Dass zahlreiche Probiotika, darunter auch Enterokokken, in der Lage sind, sogenannte Bakteriozine zu produzieren, ist seit langem bekannt. Bakteriozine stellen eine sehr heterogene Gruppe aus wirksamen Mikromolekülen dar, die in der Lage sind, das Wachstum anderer Keime zu hemmen (OUWEHAND et al., 1999a, 1999b). Drei *E. faecium*-Stämme sind in der Lage, hitzestabile Typ 2-Bakteriozine mit breitem Wirkungsspektrum zu produzieren und dabei vor allem andere Enterokokken-Stämme, aber auch pathogene Keime, wie Clostridien oder Listerien, zu hemmen (DU TOIT et al., 2000).

Die Behandlung von Sauen mit *E. faecium* führte zur reduzierten Übertragung von Chlamydien auf die Ferkel (von 85% bei Kontrolltieren auf 60% nach Behandlung mit dem Probiotikum (POLLMANN et al., 2005). SCHAREK et al., (2005) stellten fest, dass eine orale Behandlung mit *E. faecium* zur Reduktion der Nachweishäufigkeit von  $\beta$ -hämolytischer *E. coli* und zur Abnahme der CD8 $\alpha^+$ -Zellen in IEL führten. Die Durchfallhäufigkeit bei den Absatzferkeln reduzierte sich deutlich nach der oralen Gabe von *Enterococcus faecium* (SIMON et al., 2005). Der Effekt dieses Probiotikums auf die Morphologie der Darmschleimhaut wurde von REITER et al. (2005) untersucht, es konnte aber kein Effekt der probiotischen Behandlung auf die Zottenhöhe, Kryptentiefe, die Proliferationsrate der Darmepithelzellen oder den Anteil der Becherzellen festgestellt werden.

### **3. Versuchstiere, Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte**

###### **3.1.1.1. Reagenzien**

Coulter Clenz, Nr. 8448222, Beckman Coulter, Krefeld

BD-FACS-Flow, BD Biosciences, Heidelberg

Bovines Serumalbumin

Bovines Serumalbumin, Nr. A7030. Sigma-Aldrich, Steinheim

DL-Dithiothreitol (DTT)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

EDTA

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fettstift

DAKO pen, Nr. S2002, DAKO, Glostrup

Ficoll

Ficoll-Paque plus 17-1440-02, Amersham Biosciences

HBSS

HANK's gepufferte Salzlösung (HBSS), Ca- und Mg-frei, 10543-F, Cambrex Bioscience, Belgien

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Natriumcarbonat, C. Roth, Karlsruhe

NaHCO<sub>3</sub>-Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt

NaCl-Natriumchlorid, C. Roth, Karlsruhe

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x.2H<sub>2</sub>O-di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, C. Roth, Karlsruhe

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Kaliumdihydrogenphosphat, C. Roth, Karlsruhe

Penicillin/ Streptomycin

Penicillin G (5000 U/ml)/ Streptomycin-Sulfat (5000 g/ml) Invitrogen, Karlsruhe

Percoll

17-0891-01, Density 1,13 g/ml, Amersham Bioscience, Freiburg

Plastikpasteurpipetten

Nr. 4894.1, Roth, Karlsruhe

Propidiumiodid

Nr. P4170, min 95% (HPLC), Nr. 904153 Sigma-Aldrich, Steinheim

Objektträger

Nr. J2800AMNZ, Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig

RNase-free DNase

Nr. 74124, Qiagen GmbH

RPMI

RPMI-1640-Medium, mit L-Glutamin, mit Phenolrot, 12-702-F, Cambrex Bioscience, Belgien

Trypanblau-Lösung, 0,4 %

Nr. T8157, Sigma-Aldrich, Steinheim

### **3.1.1.2. Mikroorganismen**

#### **3.1.1.2.1. Das Probiotikum *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415)**

Der als Probiotikum verwendete *E. faecium* Stamm NCIMB 10415 ist auch unter der Bezeichnung *E. faecium* SF68 registriert (MÄNNER und SPIELER, 1997; BENYACOUB et al., 2005). *E. faecium* NCIMB 10415 wurde unter dem Handelsnamen Cylactin<sup>®</sup> von Cerbios-Pharma (Batch no. AG0551, Barbengo, Switzerland) als Futter-Additiv bezogen und in Kapselform (Mikrokapseln) den Futterpellets bei 50°C beigemischt. Nach Angaben des Herstellers zeigt dieses Probiotikum keine Resistenz gegen Vancomycin; es ist auch nicht möglich, eine derartige Resistenz zu induzieren (kein vanA, vanB und vanC-Gen). Die Resistenz gegenüber Erythromycin ist sehr gering, und kann nicht auf andere Enterokokken übertragen werden. Ferner ist dieses Probiotikum, wie andere Stämme dieser Spezies, empfindlich gegen Benzylpenicilline, Aminopenicilline, Imipenem, Tetracycline und Chloramphenicol.

Die Konzentration des supplementierten *E. faecium* wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Anhang Tabelle 11-12).

#### **3.1.1.2.2. *Salmonella typhimurium* DT104**

Es wurde mit einer genetisch veränderten Variante des Stammes *S. typhimurium* DT104 (nalidixinsäureresistente Variante von BB439) mit der Bezeichnung BB440 gearbeitet. Beim Wildstamm handelte es sich um einen multiresistenten *S. typhimurium*-Stamm (DT104) aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig. Dieser Stamm wurde im Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin) zusätzlich resistent gegen Nalidixinsäure gemacht. Anschließend wurde im Institut für Mikrobiologie der FU Berlin aus

dem Wildstamm durch die Transformierung mit dem Plasmid pFVP25.1 die genetisch veränderte Variante hergestellt (BB440). Das Plasmid pFVP25.1 trägt ein Kanamycin Resistengen aph als Selektionsmarker und kodiert für das „green fluorescent protein“ (GFP). Die Expression dieses Proteins wird kontrolliert vom „*S. typhimurium* ribosomal protein gene rpsM promoter“. Resistenzen gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Tetracyclin, Sulfonamide und Spectinomycin wurden beschrieben. Dieser Stamm ist sensibel gegen viele Antibiotika, wie z. B. Neomycin und Gentamicin.

Das Inokulum wurde einen Tag vor der Infektion als Starterkultur in 5 ml LB-Vollmediumbouillon über Nacht bei 37°C vorbereitet. Am folgenden Tag wurde eine 100 ml-Schüttelkultur mit 1 ml der Starterkultur beimpft und kontinuierlich geschüttelt. In regelmäßigen Zeitabständen erfolgte die Prüfung des Zellgehaltes anhand einer Eichkurve mit einem Klett-Trübungsgerät. Die genaue Keimzahl wurde mit dem Spiralplattenverfahren bestimmt. Aus dieser Suspension wurden jeweils 5 Spritzen mit je 10 ml aufgezogen und im Kühlschrank bis zur Infektion gelagert.

### 3.1.1.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie

#### 3.1.1.3.1. Primäre monoklonale Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

**Tabelle 3-1** Primäre monoklonale Antikörper mit Angaben von Antigen, Isotyp, Klon und Herkunft

Spezifität	Zelllinie/ Klon- Nummer	Isotyp (Konjugation)	Katalog. Nr.	Verkäufer in Deutschland
mouse anti-pig CD1	76-7-4	IgG <sub>2a</sub>	V76-7-01	Acris Antibodies GmbH D-32120 Hiddenhausen
mouse anti-pig CD3- biotinyliert	BB238E6	IgG <sub>2ak</sub> (biotinyliert)	4511-08	Biozol Diagnostika D-85386 Eching
mouse anti-pig CD4-FITC	74-12-4	IgG <sub>2bk</sub> , (FITC -konjugiert)	4515-02	Biozol Diagnostika D-85386 Eching
mouse anti-pig CD8α-PE	76-2-11	IgG <sub>2ak</sub> (PE-konjugiert)	4520-89	Biozol Diagnostika D-85386 Eching
mouse anti-pig CD8β	PG 164 A	IgG <sub>2a</sub>	VPG 164- 05	Acris Antibodies GmbH D-32120

				Hiddenhausen
mouse anti-pig WCD11R1	MIL-4	IgG <sub>1</sub>	MCA 1220	Biozol Diagnostika D-85386 Eching
mouse anti-pig CD14	MIL-2	IgG <sub>2b</sub>	MCA 1218	Serotec GmbH D-40210 Düsseldorf
mouse anti-pig CD16	G7	IgG <sub>1</sub>	SM1732	Acris Antibodies GmbH D-32120 Hiddenhausen
mouse anti-pig CD18a	PNK-I	IgG <sub>1</sub>	MCA 1972	Serotec GmbH D-40210 Düsseldorf
mouse anti-pig CD21	BB6- 11C9.6	IgG <sub>1κ</sub>	4530-01	SouthernBiotech Birmingham AL 35260 USA
mouse anti-pig CD25	K231.3B2	IgG <sub>1</sub>	SM 561	Acris Antibodies GmbH D-32120 Hiddenhausen
mouse anti-pig CD45	MAC323	IgG <sub>2a</sub>	01803	Biozol GmbH D-85386
CD45RA	MIL-13	IgG <sub>2a</sub>	MCA 1751	Biozol GmbH D-85386
mouse anti-pig TCR1-	PGBL22A	IgG <sub>1</sub>	VPBL 22- 05	Acris GmbH D-32120 Hiddenhausen
mouse anti-pig MHC I	74-11-10	IgG <sub>2b</sub>	V 74-11- 05	Acris GmbH D-32120 Hiddenhausen
mouse anti-pig IgA	K61 1B4	IgG <sub>1</sub>	MCA683	Serotec GmbH D-40210 Düsseldorf

### 3.1.1.3.2. Nachweisantikörper

Die primären Antikörper mouse anti-pig CD4 und mouse anti-pig CD8 $\alpha$  sind jeweils mit den Farbstoffen FITC bzw. PE gekoppelt. Hier bedarf es keiner Nachweisantikörper zur Detektion der positiven Zellen. Bei dem mouse anti-pig CD3 handelt sich um einen Antikörper, der mit Biotin konjugiert ist. Zum Sichtbarmachen einer positiven Reaktion wurde hier die Streptavidin-Biotin-Methode benutzt. Streptavidin ist ein 60 KDa Tetramer, welches eine starke Affinität gegenüber Biotin aufweist, darüber hinaus bindet ein Molekül Streptavidin bis zu 4 Moleküle Biotin, wodurch eine sehr hohe Sensitivität entsteht. Das Streptavidin ist seinerseits mit PC5 gekoppelt. PC5 ist ein Farbstoff, mit einem Excitationsmaximum bei

488 nm und ein Emissionsmaximum bei 670 nm, wodurch eine Detektion im Durchflusszytometer möglich wird.

**Tabelle 3-2** Nachweisantikörper mit Angaben von Antigen, Isotyp, Klon und Herkunft

Farbstoff	Isotyp	Spezifität	Bestellnummer	Verkäufer
FITC	Goat F(ab') <sub>2</sub>	Goat anti-mouse IgG(H+L)	IMO819	Beckmann Coulter, Kriefeld
PE	Goat F(ab') <sub>2</sub> Frament	Goat anti-mouse IgG(H+L)	IMO855	Beckmann Coulter, Kriefeld
Streptavidin-PC5			IM3327	Beckmann Coulter, Kriefeld

#### **3.1.1.4. Verbrauchsmaterialien**

Chirurgisches Besteck, Nr. 3607.1, Nr. 3545.1, H 760.1. Carl Roth, Karlsruhe

Erlenmeyerkolben, Becher, Flaschen verschiedener Größen aus Glas, steril, Instituts-Inventar

Glaspipetten, steril, 5 ml, 10, ml und 30 ml

Bechergläser, steril

Gaze, Sefar Nitex 03-200/47, Maschenweite 200 x 2µm, Sefar GmbH, Wasserburg

FACS-Röhrchen (Polystyrol, 12 x 75 mm, Falcon). BD Bioscience, Heidelberg

Handzähler, neoLab Nr. 880117509, NeoLab, Berlin

Latex-Einmalhandschuhe, C. Roth, Karlsruhe.

Pasteurpipetten, steril, C. Roth, Karlsruhe.

Pipettenspitzen 0,5-10; 10-100; 30-300; 100-1000; 500-5000 µl, Greiner, Frickenhausen

Reaktionsgefäße 2 ml; Eppendorf

Skalpellklingen, steril

S-Monovetten, 9 ml, Li-Heparin

#### **3.1.1.5. Geräte**

Dampfsterilisator, Varioklav H+P Labortechnik, Oberschließheim

Durchflusszytometer Coulter® Epics® XL/XL-MCL mit 488 nm-Argon-Laser

Auswertungssoftware EXPO32® MultiComp, Beckman Coulter, Krefeld

Feinanalysenwaage, Sartorius AG, Göttingen

## Versuchstiere, Material und Methoden

---

Hämozytometer-Deckgläser, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Inkubationsschüttler, Certomat IS, Vitaris AG, Baar

Kühlzentrifuge- 5417 R; Eppendorf

Kurzeitmesser, C. Roth, Karlsruhe

Magnetrührer, Monotherm, H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Mikroskop, Hund Labormikroskop H 600 Wilo-Prax, Bonn

Mikropipetten, verschiedene Größen, Eppendorf Research, Eppendorf

Neubauerzählkammer, Nr. 318-100-20232 Mercateo

Vortex-Typ Vortex Genie 2; Scientific Industries Inc., Botemia

Wasserbad, Memmert Modell WNB, Schwabach

Zentrifuge, Heraeus Laborfuge 400R, 75008162

### **3.1.2. Lösungen**

Auffangmedium

HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )

Gentamycin und Penicillin-Streptomycin: 2000 IE /2mg

Gentamicin: 500  $\mu\text{g/ml}$

DTT/HBSS

HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )

0,154 g DTT

1,192 g Hepes

EDTA/HBSS

HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )

0,186 g EDTA

0,119 g Hepes

Erythrozytenlysis-Puffer

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 g/l

EDTA 0,0037 g/l

$\text{NH}_4\text{Cl}_2$  0,83 g/l

Aqua dest. ad 100 ml

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1,35 g/l
Aqua dest.	ad 1000 ml

PBS-0,2 % BSA

Percoll 90 % in HBSS

Percoll 70% in HBSS

Percoll 40 % in HBSS

Percoll 25% in HBSS

Propidiumiodid 5µg / ml in PBS (Endkonzentration zur Färbung der Zellen)

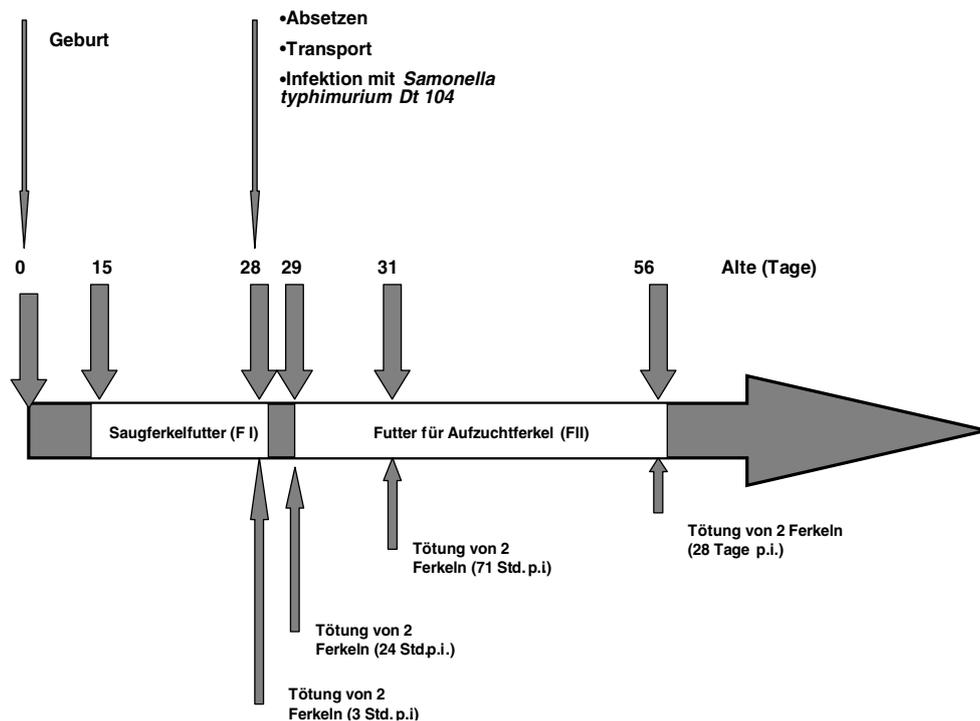
**3.1.3. Studiendesign**

**3.1.3.1. Versuchstiere**

Diese Arbeit stellt ein Teilprojekt eines interdisziplinären Forschungsprojekts dar und wurde im Rahmen des DFG-Forschungsprojektes „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ zur Wirkung des probiotischen Futterzusatzes *E. faecium* NCIMB 10415 (Cylactin<sup>®</sup>) erstellt. Die Tiere wurden im Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin gehalten. Die experimentelle Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 sowie die Tötung der Ferkel fanden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) statt (Abb. 3.1 und Abb. 3.2).



**Abb. 3.1** Übersicht über die Sauenhaltung



**Abb. 3.2** Übersicht über die Ferkelhaltung

Als Versuchstiere dienten Sauen und ihre männlichen und weiblichen Ferkel (nicht kastriert, Schwänze nicht kupiert) der Rasse Deutsche Landrasse x Duroc, die entweder mit Ebern der Hybridrasse Belgische Landrasse x Hampshire oder der Belgischen Landrasse x Duroc gedeckt wurden. Konnte mit dem Natursprung keine Befruchtung erreicht werden, erfolgte die künstliche Besamung mit Sperma von reinrassigen Duroc-Ebern. Alle tragenden Sauen wurden in Boxen mit Betonboden ohne Einstreu und in Gruppen von drei bis vier Tieren gehalten. Zehn Tage vor dem Abferkeltermin wurden die tragenden Sauen der Kontroll- oder der Probiotikum-Gruppe zugeteilt. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie einzeln gehalten. Laktierende Sauen standen mit ihrem Wurf in Abferkelbuchten mit Teilspaltböden ohne Stroh. Damit ein Wurf in den Versuch aufgenommen werden konnte, mussten 24 Stunden nach Ende der Geburt mindestens neun, aber nicht mehr als 15 lebende Ferkel vorhanden sein. Die Gruppen wurden nach der Einteilung räumlich so voneinander getrennt, dass keine Möglichkeit zum Kontakt bestand. Für beide Versuchsgruppen wurden die Ferkel mit 28 Lebenstagen abgesetzt. Es wurden keine Antibiotika, weder bei den Sauen, noch bei den Ferkeln angewendet. Medikamente, welche in der Lage sind, das Darmmilieu zu beeinflussen, wurden nicht eingesetzt. Das Lichtprogramm umfasste 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit, Raumtemperatur 21° C, relative Luftfeuchtigkeit 65%. Die Raumtemperatur in

den Flat-Decks betrug direkt nach dem Absetzen ca. 26 °C und wurde mit zunehmendem Alter der Ferkel reduziert. Alle Tiere wurden vor der Infektion serologisch auf Salmonellen mittels ELISA-Testsystem, Salmotype® Pig STM-WCE (LDL, Leipzig) im Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin) untersucht und waren negativ.

### **3.1.3.2. Interventionsstudien**

In diese Arbeit gingen ausschließlich Proben von Ferkeln ein. Insgesamt wurden fünf Versuchsreihen mit jeweils einem Probiotikum- und einem Kontrollwurf durchgeführt. Die Ferkel wurden am Tag ihres Absetzens zur Bundesanstalt für Risikobewertung transportiert, dort fand ihre Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 statt. Die anschließenden Tötungen erfolgten 3, 24, 71 Stunden und 28 Tage nach der Infektion. Welches Ferkel zu welcher Zeit getötet werden sollte, wurde vor der experimentellen Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 per Losverfahren entschieden. (Tabelle 3-3)

**Tabelle 3-3** Übersicht zu den Altersgruppen der getöteten Ferkel

Alter der Tiere	Tötungstermin in Stunden p.i.	Probiotikum-Gruppe Zahl der getöteten Tiere	Kontrollgruppe Zahl der getöteten Tiere	Gesamt
28 Tage	3	10	10	20
29 Tage	24	10	10	20
31 Tage	71	10	10	20
56 Tage	672	10	8	18
Gesamtheit aller getöteten Tiere				78

### **3.1.3.3. Versuchsdiäten**

Das verwendete Grundfutter der Sauen basierte auf Gerste und Weizen. Ferkel hingegen bekamen ein auf Weizen und Sojabohnen-Mehl basierendes Futter. Die Fütterung der Sauen erfolgte zweimal täglich. Die Fütterungsmenge war bei tragenden Sauen abhängig von ihrem Körpergewicht und bei laktierenden zusätzlich abhängig von der Wurfgröße. Tragende bzw. laktierende Sauen erhielten keine Probiotika. Gesäugte Ferkel (Saugferkel) erhielten ad libitum Zugang zu dem „Pre-Starter“-Grundfutter (FI) vom 15. bis zum 28. Tag nach der Geburt (Anhang, Tabelle 11-1). Die Ferkel wurden am 28. Lebenstag von der Muttersau getrennt (abgesetzt), von da an in Gruppen gehalten und je nach Gruppenzugehörigkeit auf eine probiotikumhaltige bzw. nicht supplementierte Futtermischung umgestellt. Die Fütterung der

Ferkel erfolgte ab dem 29. Lebenstag ad libitum mit Futter für abgesetzte Ferkel (FII. Tabelle 11-2).

In der probiotisch behandelten Tiergruppe waren im Saugferkelfutter (vom 15. bis zum 28. Lebenstag) im Mittel  $7,5 \cdot 10^6$  (3,1 SD) probiotische Zellen/g Futter, im Absatzferkelfutter (vom 29. bis 56. Lebenstag) waren  $4,4 \cdot 10^6$  (2,7 SD) probiotische Zellen/g Futter.

Tragende Sauen bekamen  $2,2 \cdot 10^6$  (0,92 SD) probiotische Zellen/g Futter und laktierende Sauen ca.  $1,4 \cdot 10^6$  (0,57 SD) (Tabelle 11-3 und 11-4).

Alle Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

Die Ferkel wurden entsprechend der arabischen Ziffern der Mutter und mit römischen Ziffern, entsprechend der Wurfgröße, gekennzeichnet (z. B. Muttersau Nr. 2, mit 12 Ferkeln → 2/XII.) (Anhang Tabelle 11-5 bis 11-8).

### **3.1.3.4. Infektion mit *Salmonella***

Die experimentelle Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 fand für alle Ferkel eines Wurfes am gleichen Tag statt. Die Tiere wurden sediert, und per Magenschlundsonde wurden ca. 2 ml einer Schüttelkultur verabreicht, welche die Infektionsstämme enthielt. Die Schüttelkultur wurde für jeden Infektionsversuch einen Tag vor der Infektion aus einer Starterkultur in LB-Vollmediumbouillon über Nacht bei 37°C angesetzt. Für die Infektion wurden 100 ml Schüttelkultur mit 1 ml der Starterkultur beimpft. Eine Übersicht über die Infektionsdosis der *Salmonella typhimurium* DT104 pro Durchgang ist aus der Tabelle 11-10 im Anhang zu entnehmen.

### **3.1.3.5. Tötung der Tiere**

Am 28. Lebenstag (Tag des Absetzens) wurden die Versuchstiere (Ferkel) in das Bundesinstitut für Risikobewertung transportiert, wo die experimentelle Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 stattfand. Für jede Versuchsreihe wurde jeweils ein Probiotikum- oder Kontroll-Wurf, mit mindesten neun Ferkeln transportiert. Die Infektion mit Salmonellen fand für alle Tiere eines Wurfes gleichzeitig statt.

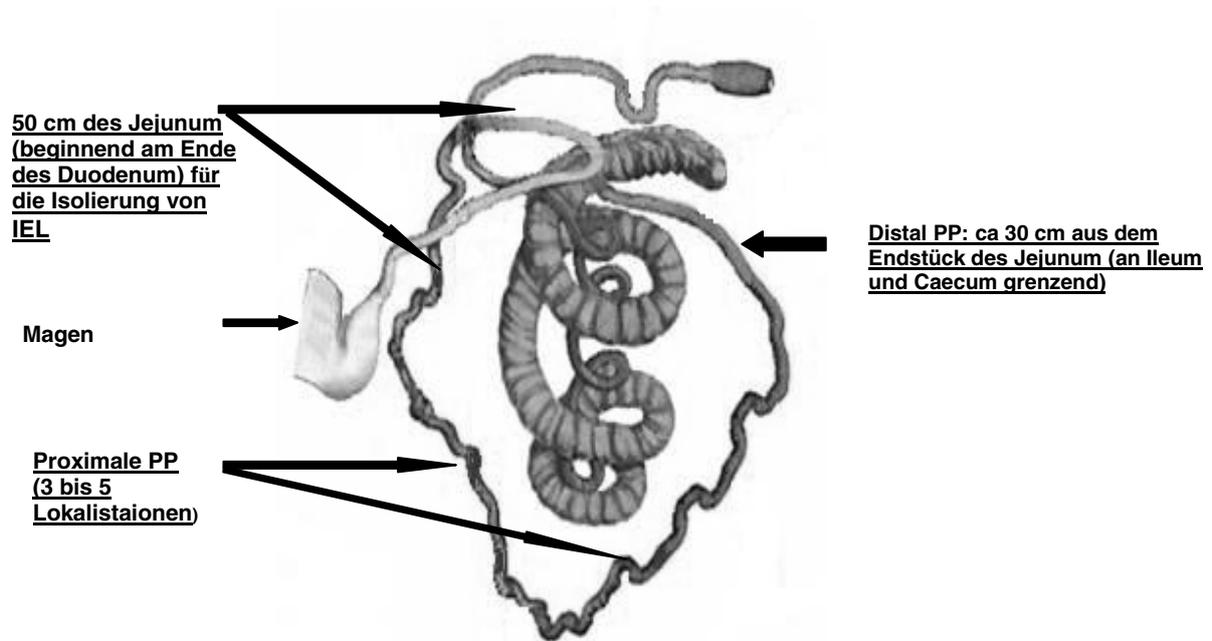
Für jeden Tötungszeitpunkt wurden jeweils zwei Ferkel mit medianem Gewicht aus dem jeweiligen Wurf zufällig ausgewählt. Die Sedierung erfolgte mit Ketamin (Ketamin 10%ig, Heinrich Fromme GmbH) in einer Dosierung von 0,2 ml/kg KGW und Azaperon (Stresnil von Janssen-Cilag) in einer Dosierung von 0,1 ml/Kg KGW im Verhältnis 2:1. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Eutha 77 von Essex) in einer Dosierung von 0,8 ml/kg KGW.

Über einen Zugang zu einer *Vena jugularis* wurden Blutproben genommen. Nach der Eröffnung der Bauchhöhle (entlang der *Linea alba*) wurde der Magen-Darm-Trakt exploriert und die Tiere anschließend durch Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet.

### **3.1.3.6. Probenentnahme und -transport**

Nach der Exploration des Magen-Darm-Traktes wurde der Darm durch zwei Klemmen am Duodenum und Colon abgeklemmt. Der Darm wurde dann vorsichtig von den Gekrösen gelöst.

Die Entnahme der Darmproben erfolgte immer nach vorherigem Abklemmen mit Hilfe zweier Klemmen proximal und distal des zu untersuchenden Darmabschnitts. (Abb. 3.3)



**Abb. 3.3** Entnahmestellen der Gewebeproben aus dem Darm nach NICKEL & SCHUMMER, 1987; modifiziert durch Reiter (2005)

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Isolierung von Immunzellen aus den verschiedenen Organen

##### 3.2.1.1. Isolierung mononuklearer Zellen aus Peripherblut

Als Probenmaterial dienten Citrat-Blutproben, entnommen aus der *Vena jugularis* der Ferkel beider Versuchsgruppen. Zur Isolierung mononuklearer Zellen wurde die Methode nach Solano-Aguilar und Mitarbeiter (2000) angewendet.

5 ml Citrat-Blut wurde 1:2 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt, diese 10 ml wurden dann vorsichtig mit einer Plastikpasteurpipette auf 5 ml Histopaque<sup>®</sup> geschichtet. Nach Zentrifugation (800 x g, 20 min) wurde die Interphase (buffy coat) mit einer Plastikpasteurpipette abgenommen, mit 5 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Calcium- und Magnesium-frei) gemischt und zentrifugiert (300 x g, 10 min). Das Zellsediment wurde dann in 5 ml HBSS aufgenommen und mit 30 ml Erythrozytenlyse-Puffer aufgenommen.

In diesem Ammoniumchlorid-Puffer verblieben die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer weiteren Zentrifugation (300 x g, 10 min) wurde das Zellpellet in RPMI resuspendiert und zur Beseitigung der Thrombozyten erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min). Die Thrombozyten konnten jetzt mit dem Überstand entfernt werden. Das Pellet wurde je nach Größe in 4 bis 7 ml RPMI resuspendiert.

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde über die Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau und anschließender Zählung der nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Aufbewahrung der Zellen bei 4° C.

**Tabelle 3-4** Übersicht zu Altersgruppen der Tiere, aus denen Blutproben stammten

Blutproben	Alter der Ferkel	Entspricht in Tagen vor bzw. nach der Infektion mit <i>S. typhimurium</i> DT104
5 ml Citratblut	21 Tage	7 Tage ante infectionem
5 ml Citratblut	28 Tage	3 Stunden post infectionem
5 ml Citratblut	29 Tage	24 Stunden post infectionem
5 ml Citratblut	31 Tage	71 Stunden post infectionem
5 ml Citratblut	56 Tage	672 Stunden post infectionem

### **3.2.1.2. Isolierung von Immunzellen aus der Milz**

Auch hier wurde die Methode nach SOLANO-AGUILAR und Mitarbeiter (2000) angewendet.

Als Probenmaterial wurde hier ein ca. 5x5x3 cm großes Milzstück aus Ferkeln beider Versuchsgruppen entnommen. Dies geschah kurz nach der Tötung. Nach der Entnahme wurde das Gewebstück in Transportmedium aufgenommen und bei 0° C transportiert. Die weitere Verarbeitung fand bei Raumtemperatur und unter der Laminar-Flow-Box statt. Als erstes wurde das Milzgewebe mit Hilfe von zwei Skalpelln auf einer Petrischale zerkleinert. Der Gewebebrei wurde mit RPMI durch eine Gaze (200µm Maschenweite) gefiltert und verworfen. Die dabei gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert (320 x g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, je nach Größe, in 2 bis 5 ml RPMI aufgenommen, und die Zellen dabei mit Hilfe einer Plastikpasteurpipette vorsichtig resuspendiert. 5 ml Erythrozytenlyse-Puffer pro 1 ml Zellsuspension wurden dazu gegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sofort zentrifugiert (320 x 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RPMI aufgenommen. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde über die Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau und anschließender Zählung der nicht gefärbten Zellen in einer Neubauer Zählkammer vorgenommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt. Bei allen Reagenzien und Verarbeitungsschritten wurden, sofern nicht anders beschrieben, Raumtemperatur eingehalten.

### **3.2.1.3. Isolierung der Immunzellen aus den Peyerschen Platten**

Als Probenmaterial aus der distalen PP dienten 2x30 cm lange Streifen aus der ca. 2 m langen distalen Peyerschen Platte (Abb. 3-3). Als Probe aus den proximalen PP dienten 2 bis 3 Platten, die in der Regel ca 3 x 2x0,5 cm groß waren. Das Darmstück, das die entsprechenden Platten enthält, wurde ausgeschnitten, von seinem Inhalt befreit und mit PBS mehrmals gespült. Die einzelnen proximalen PP wurden sorgfältig vom umliegenden Gewebe mit Hilfe einer scharfen Klinge freipräpariert und im Transportmedium aufbewahrt. Aus der distalen PP wurden zwei Streifen à 30 cm, wie eben beschrieben, präpariert und im Transportmedium aufbewahrt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben auf Eis gestellt.

### **3.2.1.4. Isolierung von Immunzellen aus mesenterischen Lymphknoten**

Hierfür wurden ein ca. 5 x 4 x 3 cm großes Gewebstück aus den *Noduli lymphatici jejunales* (äußere Platte) entnommen. Die weitere Verarbeitung glich der Isolierung von Immunzellen aus der Milz.

### **3.2.1.5. Isolierung von Immunzellen aus Tonsillen**

Zwei Gewebstücke von ca. 2 x 2x 0,5 cm wurden von den *Tonsilla paraepiglottica* und der *Tonsilla palatina* gewonnen. Die weitere Verarbeitung glich der Isolierung von Immunzellen aus der Milz.

### **3.2.1.6. Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL)**

Zur Isolierung von IEL wurde die Methode nach Solano-Aguilar und Mitarbeiter (2000) angewendet. Ein 50 cm langes Darmstück aus dem proximalen Jejunum wurde hierfür entnommen (Abb. 3.3).

Nach der Entleerung und mehrmaligem Spülen mit PBS wurde das Darmstück eröffnet. Die darin enthaltenen Peyerschen Platten wurden sorgfältig entfernt, anschließend diese Darmprobe in ca. drei cm lange Stücke zerkleinert und im Transportmedium und auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Unter der Laminar-Flow-Box wurden diese Darmgewebstückchen nach der Entfernung des Transportmediums in einen Kolben mit 30 ml HBSS-DTT-Medium überführt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37° C im Schüttelinkubator, diese Behandlung sollte den Mukus von dem Epithel lösen. Anschließend wurde das Gemisch über eine Gaze (200 µm Maschenweite) filtriert. Die Gewebstücke wurden dann von der Gaze in ein steriles Becherglas mit 30 ml HBSS-EDTA überführt. Es folgte anschließend die Inkubation für 30 min bei 37° C im Schüttelinkubator, um die Epithelzellen aus dem Zellverbund zu lösen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gewebe erneut über die Gaze gegossen.

Die Zellsuspension, welche die IEL enthielt, wurde in einem sterilen Becherglas aufgefangen, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (600 x g, 5 min, 4° C). Das Pellet wurde dann in 10 ml RPMI resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Diese Reinigung der IEL aus dem Darmgewebe wurde drei Mal wiederholt, und die dabei gewonnenen 30 ml Zellsuspension aus allen drei Etappen der Reinigung wurden vereinigt, mit 50 µl DNase behandelt, für 5 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert und anschließend zentrifugiert (600 x g, 10 min, 4° C).

Das dabei gewonnene Pellet wurde in 30ml 25%-igem Percoll resuspendiert und anschließend zentrifugiert (600 x g, 20 min, 4° C). Als Folge dieser Behandlung trennte sich der Zelldebris untergegangener Zellen von den lebenden Zellen (im Sediment) und ließ sich oberhalb der Percoll-Schicht mittels einer Pasteurpipette entfernen. Der restliche Überstand wurde verworfen, das Pellet rasch in das RPMI aufgenommen und anschließend zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C).

Das Pellet wurde in RPMI resuspendiert und mit der 5- bis 10-fachen Menge an Erythrozyten-Lysis Puffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4° C). Das Pellet wurde je nach Größe in 30 bis 45 ml RPMI resuspendiert. Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde über die Anfärbung mit Trypanblau und anschließender Zählung in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt. Bei allen Reagenzien und Verarbeitungsschritten wurde, sofern nichts anderes beschrieben, Raumtemperatur eingehalten.

**Tabelle 3-5** Übersicht zu den untersuchten Proben an verschiedenen Tötungszeitpunkten (\*gleich untersucht)

Tötungstermin: in Stunden nach der Infektion mit Salmonella	Alter der Tiere (Tag)	Gewebeproben						
		Blut	Milz	Dist. PP	IEL	Tonsillen	Prox. PP	Lymph- knoten
3 Stunden	28	*	*	*				
24 Stunden	29	*	*	*	*	*	*	
71 Stunden	31	*	*	*	*	*		*
672 Stunden	56	*	*	*	*	*	*	

### 3.3. Durchflusszytometrische Messungen

#### 3.3.1. Grundlage der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie auch FACS (Fluorescence Aktivated Cell Scanning) ist eine Analyse der optischen (physikalischen und molekularen) Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Bakterien, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom (Durchfluss). Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern bestimmte Eigenschaften (z. B. Oberflächen-Moleküle von Zellen) zu analysieren.

## Versuchstiere, Material und Methoden

---

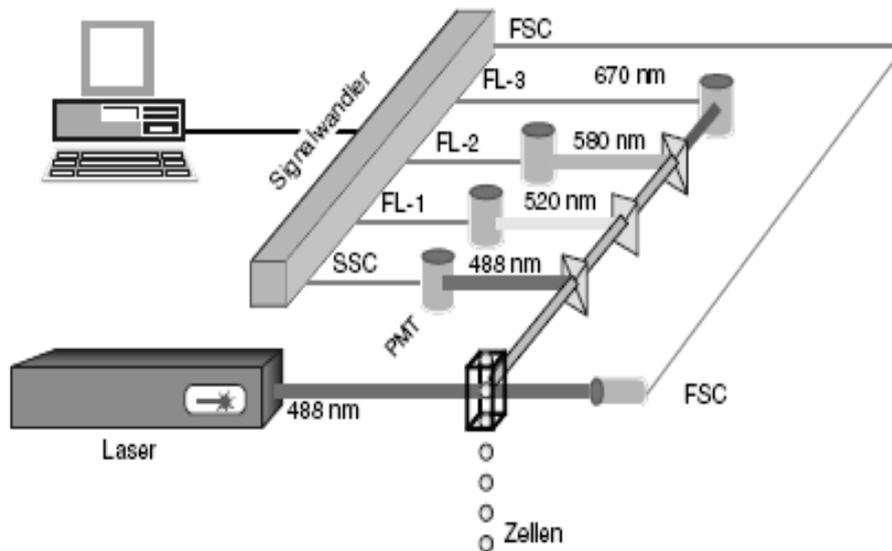
Vereinfacht ausgedrückt ist das Durchflusszytometer ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop, welches auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften von Zellen, aber auch Fluoreszenzen erfassen kann.

Der Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie beruht vor allem auf der schnellen Messung vieler Zellen ( $10^7$  Zellen in wenigen Sekunden) und in der objektiven Analyse der Messproben durch Photodetektoren und nicht durch das menschliche Auge. Zudem, und im Unterschied zur Fluoreszenzmikroskopie, adhären die zu analysierenden Partikel nicht auf einem Objektträger, sondern liegen in einer Einzelzellsuspension vor. Zur Analyse werden die Partikel (in dieser Arbeit: die Zellen) in einer Suspension durch die sog. hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette aufgefädelt und an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Basis dieser Fokussierung ist ein aufwendiges Flüssigkeitssystem innerhalb des Messbereiches eines Durchflusszytometers. Dabei wird die Zellsuspension mit einem Ansaugsystem unter Druck in einer Stahlkapillare zu einer konisch verlaufenden Messküvette aus Quarz geführt.

Diese Stahlkapillare ist auf das Zentrum der Messküvette gerichtet und wird von einer zellfreien Trägerflüssigkeit (sheath fluid), die mit hoher Geschwindigkeit fließt, umspült. Unmittelbar vor der kleinen Öffnung der Küvette und am Ende der Kapillare trifft die Trägerflüssigkeit auf die Zellflüssigkeit und beschleunigt diese, so dass die Zellen perlschnurartig vereinzelt werden. Durch den konisch verlaufenden, engen Eingang der Küvette werden die Zellen fokussiert und damit durch den Laser optimal am definierten Messpunkt erfasst.

Das Durchflusszytometer misst sowohl das gesamte Streulicht des Laserlichtes, das beim Zusammentreffen von Laser und Zelle entsteht, als auch den Schatten, den der Partikel verursacht ( $0^\circ$  bis  $10^\circ$  Winkel) und der als Forward-Scatter (FSC) Informationen über die Größe des Partikels gibt. Das gesamte Streulicht, das im Winkel von  $90^\circ$  vom Partikel abgestrahlt wird und als Sideward-Scatter, ist ein Maß für die Granularität des Partikels. Wenn die zu analysierenden Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, kommt es bei der Begegnung mit dem Laserstrahl (Argon-Laser, 488 nm) zur Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffs, wodurch dessen Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Bei dem spontanen Rücksprung auf das normale Energieniveau kommt es zur Emission von Energie (in Form von Photonen). Das emittierte Licht verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Farbstoff. Das Beckman Coulter® EPICS XL®, das

Durchflusszytometer, mit dem in dieser Arbeit die Analysen durchgeführt wurden, beinhaltet einen Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4** Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers nach Rothe (2007). Am Kreuzungspunkt eines Laser-Strahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen Licht gestreut und es werden Fluoreszenzen angeregt. Das FSC wird als Maß der Zellgröße detektiert. Farbteilerspiegel und Filter trennen SSC als Maß der Granularität und Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3). Das von Photomultipliern (PMTs) detektierte Licht wird für jede Einzelzellen in digitaler Form gespeichert.

Farbstoffe, die sich mit diesem Laser abregen lassen und in dieser Arbeit verwendet wurden, werden in Tabelle 3-6 aufgelistet.

Alle eingesetzten Farbstoffe lassen sich bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen, in diesem Fall 488 nm. Ihre Emissionsspektren sind aber spezifisch für den jeweiligen Farbstoff. Das Fluoreszenzlicht (Emissionslicht) wird durch ein komplexes optisches System, bestehend aus Blenden und unterschiedlichen Filtern (FL), vom Streulicht getrennt und anschließend in verschiedene Farbbereiche aufgetrennt. (FL1= FITC, FL2=PE, FL3=ECD, FL4= PE-Cy5). Die digitalisierten Messwerte werden mit einer speziellen Software ausgewertet. Die so erfassten Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit der Antigenmenge des untersuchten Proteins pro Zelle.

**Tabelle 3-6** zeigt eine Übersicht zu den in dieser Arbeit eingesetzten Fluorochromen und deren Eigenschaften:

Farbstoffe (Fluorochrom)	Abkürzung	Absorptions- -Maximum (nm)	Emissions- Maximum (nm)	Fluoreszenzkanal
Fluoreszeinisothiozyanat	FITC	495	519	FL1
Phycoerythrin	PE	480-565	580	FL2
Propidiumjodid	PI	550	617	FL4
Green Fluorescent Protein	GFP	395-475	509	FL1
PE-Cy5	Cy- Chrome	565	670	FL3

Die computergesteuerte Verarbeitung der Messwerte erlaubt eine Analyse der Korrelation von zwei Parametern. Z. B. FSC (Zellgröße) und SSC (Granularität). So lässt sich eine grobe morphologische Einteilung der Zellen in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten vornehmen (Siehe Abb. 3-5). Ein FL1/ FL2-Diagramm ermöglicht hingegen eine genauere Analyse bezüglich der Fluoreszenzeigenschaften, wodurch die Coexpression von zwei Antigenen auf einer Zelle nachgewiesen und deren Prozentanteil ermittelt werden kann. Neben der Berechnung der Prozentanteile einzelner Zellsubpopulationen können Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden, die ein Maß für die Antigenmenge pro Zelle darstellen, und zahlreiche andere statistische Werte.

### **3.3.2. Nachweis und Differenzierung von Lymphozytensubpopulationen (Immunphänotypisierung)**

#### **3.3.2.1. Prinzip der Phänotypisierung**

Die Moleküle auf der Zellmembran und im Zytoplasma einer Zelle geben Auskunft über ihre Linienzugehörigkeit, ihren Differenzierungsgrad, ihren Aktivierungszustand und zahlreiche weitere Parameter. Antikörper, die Fluoreszenzmoleküle tragen, binden spezifisch an diese Strukturen, markieren dadurch diese Zellen und werden vom Laserlicht eines Durchflusszytometers zur Lichtemission angeregt.

Durchflusszytometer erlauben somit eine komplexe Analyse von Immunzellen mit ihrer Immunfunktion. Zur Phänotypisierung verschiedener Lymphozytensubpopulationen wird die charakteristische Expression eines bestimmten Musters an Antigenen der Differenzierungscluster herangezogen. Bestimmte CD-Antigene sind für ganz bestimmte

Populationen charakteristisch, z.B. CD3 für T-Lymphozyten. Andere CD-Antigene sind charakteristisch für bestimmte Reifungsstadien bzw. Entwicklungsstadien, z.B. CD105 bei Stammzellen. Andere CD-Antigene erlauben eine genaue Einteilung innerhalb einer großen funktionellen Gruppe; so können beispielsweise die T-Lymphocyten ( $CD3^+$ ) in zytotoxische T-Zellen ( $CD3^+CD8^+$ ) und T-Helfer-Zellen ( $CD3^+CD4^+$ ) eingeteilt werden. Die  $CD8^+$  könnten dann anhand weiterer CD-Antigene in weitere Subpopulationen eingeteilt werden. Dafür werden mit Fluoreszenz markierte Antikörper eingesetzt, die gegen entsprechende Zelloberflächenproteine gerichtet sind und an diese spezifisch binden. Die auf diese Weise fluoreszenzmarkierten Lymphozytensubpopulationen können dann am Durchflusszytometer unterschieden und analysiert werden.

### **3.3.2.2. Durchführung**

Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^5$  Zellen (gewonnen aus Blut, Milz, proximalen und distalen PP, Lymphknoten, Tonsillen oder dem Darmepithel) zu 3 ml PBS-0,2% BSA in Analyse-Röhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation ( $320 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ). Das Pellet wurde dann je nach Menge des primären Antikörpers in 92, 96 oder 98  $\mu l$  PBS-0,2% BSA resuspendiert. Die monoklonalen Primärantikörper wurden gemäß dem Schema in den Tabellen 3-7 bis 3-13, dazugegeben. Nach einer Inkubation bei  $4^\circ C$  im Dunkeln für 20 min, wurden die Proben einem Waschvorgang unterzogen. Dafür wurden zu jedem Ansatz 3ml PBS-0,2% BSA pipettiert und anschließend zentrifugiert ( $320 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in PBS-0,2% BSA resuspendiert und wo nötig mit dem entsprechenden sekundären Antikörper versetzt. Bei einer Inkubation bei  $4^\circ C$  im Dunkeln für 20 min wurden die Proben einem Waschvorgang unterzogen; dafür wurden zu jedem Einsatz 3 ml PBS-0,2% BSA pipettiert und anschließend zentrifugiert ( $320 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Sheath-Lösung aufgenommen. Die anschließenden Analysen mittels Durchflusszytometer fanden am gleichen Tag statt. Dafür wurden zu jedem Ansatz 1  $\mu l$  Propidiumiodidlösung (0,5 mg/ml) gegeben. Wurden direkt markierte Primärantikörper verwendet, ersetzte man den Zweitantikörper durch die entsprechende Menge PBS-0,2% BSA. In der Negativkontrolle wurde ebenfalls anstatt von Antikörpern die entsprechende Menge an PBS-0,2% BSA (Kontrolle 1) oder an Nachweisantikörpern (Kontrolle 2) eingesetzt.

## Versuchstiere, Material und Methoden

**Tabelle 3-7** Übersicht zu den gemessenen Parametern im Blut

		CD4CD8	CD8 $\beta$	CD14	CD16	$\gamma\delta$ (TCR1)
PBS-2% BSA		92	98	96	96	96
Primärantikörper (mouse anti-porcine) ( $\mu$ l)	CD4	4	—	—	—	—
	CD8 $\alpha$	4	—	—	—	—
	CD8 $\beta$	—	2	—	—	—
	CD14	—	—	4	—	—
	CD16	—	—	—	4	—
	$\gamma\delta$ TcR1	—	—	—	—	4
PBS-2% BSA		100	98	98	98	98
Nachweisantikörper (goat anti-mouse) Fluorochrome des Nachweisantikörper ( $\mu$ l)	IgG-FITC	—	2	2	—	2
	IgG-PE	—	—	—	2	—

**Tabelle 3-8** Übersicht zu den gemessenen Parametern in den prox. PP

		CD4CD8	CD1	MHCI	IgA	$\gamma\delta$	CD3CD8	CD25	CD14	CD21
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		92	98	92	96	98	92	96	96	96
Primär-antikörper (mouse anti-porcine) ( $\mu$ l)	CD4	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	CD8	4	—	—	—	—	4 $\mu$ l	—	—	—
	CD1	—	2	—	—	—	—	—	—	—
	MHC	—	—	2	—	—	—	—	—	—
	IgA	—	—	—	4	—	—	—	—	—
	$\delta$ - TcR1	—	—	—	—	2	—	—	—	—
	CD3- Biotin	—	—	—	—	—	4	—	—	—
	CD25	—	—	—	—	—	—	4	—	—
CD14	—	—	—	—	—	—	—	4	—	
	CD21	—	—	—	—	—	—	—	—	4
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		92	98	98	100	98	90	—	—	98
Fluorochrome des Nachweisantikörpers ( $\mu$ l)	FITC	—	—	—	—	2	—	2	2	2
	PE	—	2	2	—	—	—	—	—	—
	PC5	—	—	—	—	—	10	—	—	—

**Tabelle 3-9** Übersicht zu den gemessenen Parametern im Darmepithel (IEL)

		CD3 CD8	CD25	$\gamma\delta$	CD16	CD45	CD11	CD1	CD8 $\beta$
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		92	96	98	96	96	96	98	98
Primärantikörper (mouse anti-porcine) ( $\mu$ l)	CD3Biotin	4	—	—	—	—	—	—	—
	CD8	4	—	—	—	—	—	—	—
	CD25	—	4	—	—	—	—	—	—
	$\delta$ -TcR1	—	—	2	—	—	—	—	—
	CD16	—	—	—	4	—	—	—	—
	CD45	—	—	—	—	4	—	—	—
	CD11	—	—	—	—	—	4	—	—
	CD1	—	—	—	—	—	—	2	—
	CD8 $\beta$	—	—	—	—	—	—	—	2
PBS-2% BSA		90	98	98	98	98	98	98	98
Nachweisantikörper (goat anti-mouse) Fluorochrome des Nachweisantikörpers	FITC	—	2	2	—	2	2	—	2
	PE	—	—	—	2	—	—	2	—
	Streptavidin mit PC5	10	—	—	—	—	—	—	—

**Tabelle 3-10** Übersicht zu den gemessenen Parametern in der Milz

		CD4 CD8	CD16	CD14	$\gamma\delta$	CD45 RA	CD3 CD8	CD18
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		92	96	96	98	96	92	96
Primär- antikörper (mouse anti- porcine) ( $\mu$ l)	CD4	4	—	—	—	—	—	—
	CD8	4	—	—	—	—	4	—
	CD16	—	4	—	—	—	—	—
	CD14	—	—	4	—	—	—	—
	$\delta$ -TcR1	—	—	—	2	—	—	—
	CD45RA	—	—	—	—	4	—	—
	CD3	—	—	—	—	—	4	—
CD18	—	—	—	—	—	—	4	
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		100	98	98	98	98	90	98
Fluorochrom e des Nachweis- antikörpers ( $\mu$ l)	FITC	—	—	2	2	2	—	2
	PE	—	2	—	—	—	—	—
	Streptavidin PC5	—	—	—	—	—	10	—

**Tabelle 3-11** Übersicht zu den gemessenen Parametern in dem distalen PP

		CD16	CD1	MHC I	CD14
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		96	98	98	96
Primärantikörper (mouse anti-porcine) ( $\mu$ l)	CD16	4	—	—	—
	CD1	—	2	—	—
	MHC I	—	—	2	—
	CD14	—	—	—	4
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		98	98	98	98
Fluorochrome des Nachweisantikörpers ( $\mu$ l)	FITC	—	—	—	2
	PE	2	2	2	—

**Tabelle 3-12** Übersicht zu den gemessenen Parametern in den Tonsillen

		$\gamma\delta$	CD14	CD21	CD3 CD8	CD4
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		98	96	96	92	96
Primär- antikörper (mouse anti- porcine) ( $\mu$ l)	$\delta$ -TcR1	2	—	—	—	—
	CD14	—	4	—	—	—
	CD21	—	—	4	—	—
	CD3	—	—	—	4	—
	CD4	—	—	—	—	4 $\mu$ l
	CD8	—	—	—	4	—
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		98	98	98	90	98
Fluorochrome des Nachweis- antikörpers ( $\mu$ l)	PE	2	2	2	—	2
	Strept- avidin PC5	—	—	—	10	—

**Tabelle 3-13** Übersicht zu den gemessenen Parametern in den Lymphknoten

		CD14	CD16	CD4 CD8	CD21	CD25	$\gamma\delta$
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		96	96	92	96	96	98
Primär- antikörper (mouse anti- porcine) ( $\mu$ l)	CD14	4	—	—	—	—	—
	CD16	—	4	—	—	—	—
	CD4	—	—	4	—	—	—
	CD8	—	—	4	—	—	—
	CD21	—	—	—	4	—	—
	CD25	—	—	—	—	4	—
	$\delta$ -TcR1	—	—	—	—	—	2
PBS-2% BSA ( $\mu$ l)		98	98	100	98	98	98
Fluorochrome des Nachweis- antikörpers ( $\mu$ l)	FITC	2	—	—	2	2	2
	PE	—	2	—	—	—	—

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit dem Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup> XL-MCL-Durchflusszytometer (Beckman Coulter) durchgeführt. Das Gerät wurde mit Flow-Check<sup>®</sup>-Fluorospheres (Beckman Coulter) kalibriert. Die Analyse und grafische Darstellung der Daten erfolgt mit der Expo<sup>®</sup> 32 MultiCOMP-Software (Beckman Coulter). Zur standardisierten Datenakquise und Auswertung der Messwerte wurde im FSC/SSC-Punktdiagramm ein Mess- bzw. Analysenfenster auf die zu untersuchenden Lymphozytenpopulationen gesetzt (Abb. 3-5). Die spektrale Überstrahlung der Fluorochrome FITC in die Fluoreszenzkanäle FL2 bzw. der Fluorochrome PE in FL1 wurden kompensiert und wurden für jede Probenart gleich eingestellt. Die Datenakquise erfolgte bei hoher Flussrate (100  $\mu$ l/min) und wurde nach 10.000 Messereignissen im Analysenfenster, was der Messung von 10.000 Zellen entspricht, beendet.

Die Ergebnisse dieser Messungen könnten grafisch in verschiedenen Formen wiedergegeben werden, die Dotplot (auch Dot-Plot, dt. Punktauftragung) und die Histogramme sind aber die häufigsten Formen. Bei dem Dotplot werden immer zwei Parameter gegeneinander aufgetragen.

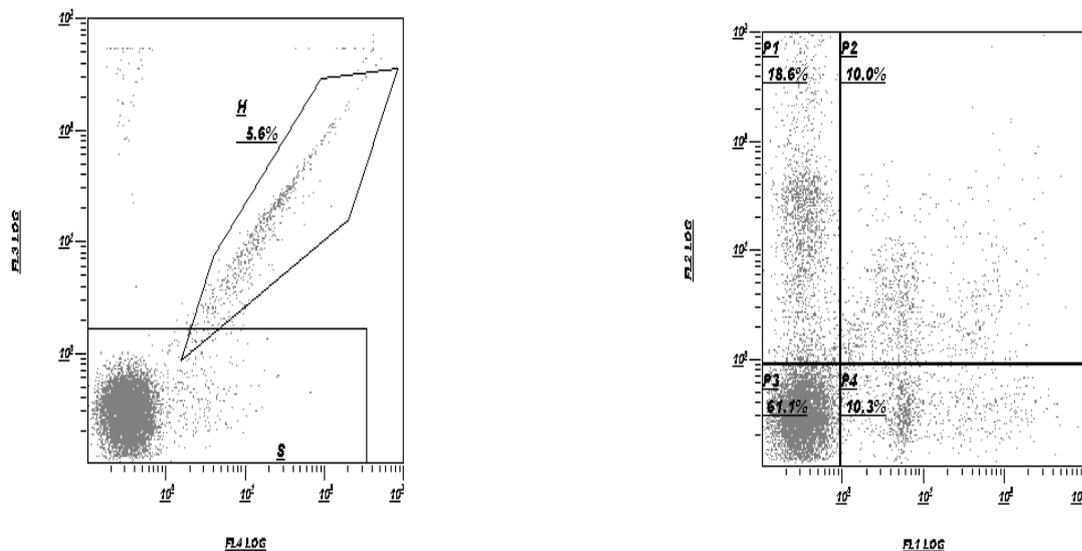
Man unterscheidet den Streulicht-Dot-Plot und den Fluoreszenzmessungs-Dot-Plot. Bei dem Streulicht-Dot-Plot werden die Zellen nach ihren Streulichteigenschaften dargestellt. Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter) hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal und werden nahe an Null als Punkte abgebildet, große Zellen produzieren ein großes Signal und werden fern von Null dargestellt. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter) hängt neben der Größe vor allem vom Inhalt einer Zelle ab. Finden sich in der Zelle sehr viele Granula, dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, finden sich nur wenige, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht gering.

Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht und ihrem Seitwärtsstreulicht im Diagramm dargestellt. Man erkennt Anhäufungen von Zellen, die offenbar ähnliche Streulichteigenschaften besitzen. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Bei dem Fluoreszenzmessungs-Dot-Plot werden die Ergebnisse der Messungen nach den Fluoreszenzeigenschaften der Zellen aufgetragen. Die FITC-Fluoreszenz z.B. wird auf der x-Achse, die PE-Fluoreszenz auf der y-Achse eingetragen. FITC-aufleuchtende Zellen sind daher rechts unten zu finden, PE-aufleuchtende Zellen links oben. Je mehr Farbstoffe eine Zellpopulation gebunden hat umso ferner wird sie vom Punkt Null abgebildet. In einem Histogramm wird der Parameter Fluoreszenz immer auf der x-Achse dargestellt, auf der y-Achse dagegen die Anzahl der Zellen mit dem gleichen x-Wert (Häufigkeiten).

Am Dot-Plot wurde die Einstellung der Quadranten nach den Parametern FSC und SSC so vorgenommen, dass tote Zellen (erkennbar an der Propidiumiodidaufnahme) und Zelltrümmer nicht mit in die Auswertung eingingen. Propidiumiodid dringt bei fortgeschrittenem Zelluntergang in die Zelle ein und verleiht den toten Zellen besondere Fluoreszenzeigenschaften. Anhand des Histogramms (Häufigkeit als Funktion der Fluoreszenzintensität FL1, FL2) wurde ein Bereich definiert (Gating). Die Ereignisse in diesem Bereich wurden als Anteil der Gesamt Ereignisse berechnet (prozentualer Wert). Die Grenze des Gates wurde am Fuß des Autofluoreszenzberges gesetzt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelllinien konnte anhand des optischen Eindrucks im Histogramm (erkennbare Ereignisse innerhalb des Gates) in Kombination mit dem ermittelten Prozentwert bestimmt werden. Die Lymphozyten, welche z. B. CD4 und CD8 coexprimieren ( $CD4^+CD8^+$ ), erscheinen im Diagramm als Punktwolke oben rechts (Region P2), während  $CD4^+$  als Punktwolke im Quadranten unten rechts erscheinen (Region P4). Die  $CD8^+$ -Zellen sind im Diagramm oben rechts (Region P1). Exprimieren die Zellen weder CD4 noch CD8 werden sie unten links dargestellt, da sie keinen Farbstoff gebunden haben (Region P3). Der relative Prozentsatz der jeweiligen Subpopulation in jedem Quadranten wird angegeben (Abb. 3.5).

!1\Unpatetf\Proz. PP 51 III CD 4 CD 8 00015838 2008-09-27 307.LMD : FL4 LOG FL3 LOG - AE

!1\!S\Proz. PP 51 III CD 4 CD 8 00015838 2008-09-27 307.LMD : FL1 LOG FL2 LOG - ABC



**Abb 3.5** Darstellungen von CD4CD8 doppelt-positiven Lymphozyten aus dem Ferkelblut. **Links:** Aufteilung der lebenden (Region S, 94,4%) und toten Zellen (Region H, 5,6%) nach Größe und Granularität. **Rechts:** Lokalisation im Dot-Plot mit Quadrantenanalyse. Der relative Prozentsatz der jeweiligen Subpopulationen in jedem Quadranten wird angegeben.

### 3.4. Statistische Auswertung

Aus der Quadrantenanalyse (Abb. 3.5) wurden die Prozentzahlen des jeweils untersuchten Parameters entnommen und statistisch analysiert.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit SPSS für Windows, Version 12.0 (Firma SPSS®). Die Graphiken wurden mit SPSS oder Sigma Plot 2001® erstellt. Die gesamte Analyse ist als eine deskriptive Analyse zu verstehen, mit dem Ziel, sinnvolle Hypothesen zur Wirkungsweise des Probiotikums *E. faecium* aufzustellen. Da alle im experimentellen Teil dieser Arbeit gewonnenen Daten Prozentzahlen und diese naturgemäß nicht normalverteilt sind, erfolgt eine Transformation mit Hilfe der arcsin-Transformation (SOKAL & ROHLF 1995). Die arcsin-Transformation (auch Winkeltransformation genannt) entkoppelt dabei die Abhängigkeit der Varianz vom Mittelwert bei binominal-verteilten Daten wie z.B. Prozentzahlen. Als Beispiel sei die Veränderung von 50 auf 55% mit der Veränderung von 5 auf 10% verglichen. Offensichtlich ist die Erstere nur eine geringfügige Veränderung, während die Letztere substantiell ist. Die Winkeltransformation zieht die Zahlen nahe 0 und 100 auseinander, während sie die mittleren Werte staucht.

Formel:  $Y = (\text{asin}(\sqrt{xx/100})) * 180/\pi, 1)$

Y: transformierter Datensatz

xx: Rohdatensatz

Da die Fallzahlen bei den einzelnen Organen (Probenentnahmestelle) zu unterschiedlich sind und weil die Messwerte stark variieren, wurde eine getrennte Analyse für jedes Organ (Blut, proximale und distale PP, IEL, Milz, Lymphknoten und Tonsillen) durchgeführt. Zur Bewertung des Einflusses der verschiedenen Faktoren (Alter, Infektionsdosis, Fütterung, usw.) auf jeden Messparameter wurde das statistische Verfahren der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) angewendet. Die Varianzanalyse (auch ANOVA, analysis of variance) untersucht, ob und gegebenenfalls wie sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Es wird geprüft, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppe. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden. Wenn sie sich unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Gesetzmäßigkeiten wirken. Die mit diesem Verfahren getestete Hypothese unterstellt: Alle miteinander verglichenen Gruppenmittelwerte der beobachteten Variablen seien in der Grundgesamtheit identisch. Basierend auf den Ergebnissen der ANOVA-Analysen konnten zahlreiche Vergleichstests durchgeführt werden, mit denen geprüft werden kann, zwischen welchen der verglichenen Gruppen es signifikante Unterschiede gibt. Die statistische Voraussetzungen für die Anwendung der Varianzanalyse sind: die Normalverteilung der Residuen (überprüft durch visuelle Inspektion der Residuen-Plots) und die Varianzhomogenität der Gruppen (mit dem Levene-Test geprüft).

Es handelt sich dabei um ein allgemeines lineares Modell, fehlende Werte wurden nicht ersetzt. Da der Einfluss der Fütterung auf die einzelnen Messparameter vom Alter abhängt, eine Wechselwirkung zwischen Fütterung und Geschlecht bzw. Geschlecht und Alter jedoch nicht wahrscheinlich war, wurde folgendes lineare Modell für alle Analysen zugrunde gelegt

$$\Delta I_{sc} CD_{I-x} = \mu + F_f + A_a + G_s + A_a \times F_f + \varepsilon_{fatn}$$

Dabei bezeichnet

$\mu$  das Gesamtmittel der Messungen,

$F_f$  fixe Effekte der Kategorien des Faktors Fütterung,  $f = 1, 2$ .

$A_a$  fixe Effekte der Stufen des Faktors Alter,  $a = 1, 2, 3, 4$ .

$G_s$  fixe Effekte der Stufen des Faktors Geschlecht,  $s=1,2$

$A_a \times F_f$  fixe Effekte von Wechselwirkungen zwischen den Faktoren Alter und Fütterung,

$\varepsilon_{\text{fat}}$  die zufälligen Abweichungen der Messungen an einzelnen Epithelien von den Tiermittelwerten; von diesen Abweichungen wird angenommen, dass sie normalverteilt sind, mit einem Erwartungswert von 0 und einer konstanten Varianz  $\sigma^2$ .

Da methodisch bedingt keine identischen Infektionsdosen mit *Salmonella* gewährleistet werden konnten, wurde darüber hinaus geprüft, ob es einen Zusammenhang (Korrelation) zwischen der logarithmierten *Salmonella*-Infektionsdosis und den jeweiligen Messparametern gab. In den Fällen mit einer signifikanten Korrelation wurden die Messparameter um den Einfluss der Infektionsdosis korrigiert (es wurde die Residuen des Modells:  $Y = \beta_1 \cdot \text{Log}(\text{Infektionsdosis})$  für die weitere Analyse verwendet. Das Signifikanz-Niveau lag bei  $p < 0,05$ . Erbrachte die ANOVA-Analyse einen signifikanten Einfluss des Alters (Zeit) wurde ein Post-Hoc-Test (Tamahane-T2) durchgeführt, welcher die einzelnen Altersgruppen paarweise miteinander vergleicht. Im Falle einer signifikanten Interaktion zwischen Fütterung und Alter (Gruppe\*Zeit) wurde für jede Altersgruppe ein Mann-Whitney-Test durchgeführt, um die Unterschiede genauer zu lokalisieren.

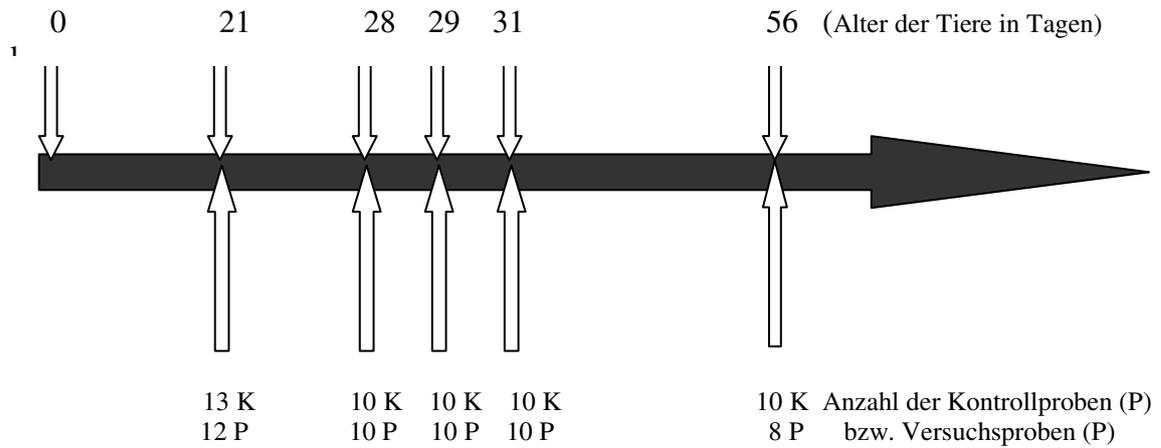
## **4. Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurden zahlreiche Immunzellpopulationen in verschiedenen Organen von Ferkeln aus zwei Fütterungsgruppen mittels durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Hierfür wurden Immunzellen aus Blut, Peyerschen Platten des Dünndarms, Darmepithel, Milz, mesenterialen Lymphknoten und Tonsillen isoliert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt.

Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden die Boxplots der Rohdaten mit der Darstellung der Mediane und die Perzentile gewählt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die Verteilung der Perzentile werden tabellarisch aufgeführt. Zur Darstellung der Effekte der Fütterung sind die Werte der Kontrollgruppen durchgehend weiß und die der Probiotikumgruppe in Dunkelgrau dargestellt. Die Abszissen sowie die Ordinaten der Abbildungen haben für den gleichen Parameter (z.B. CD14) die gleiche Achseneinteilung. Standen die Zeitlichverläufe des untersuchten Parameters im Vordergrund der graphischen Darstellung, so wurden die Boxen weiß mit Muster gezeichnet.

### **4.1. Phänotypisierung der Immunzellen aus dem Blut mittels Durchflusszytometrie**

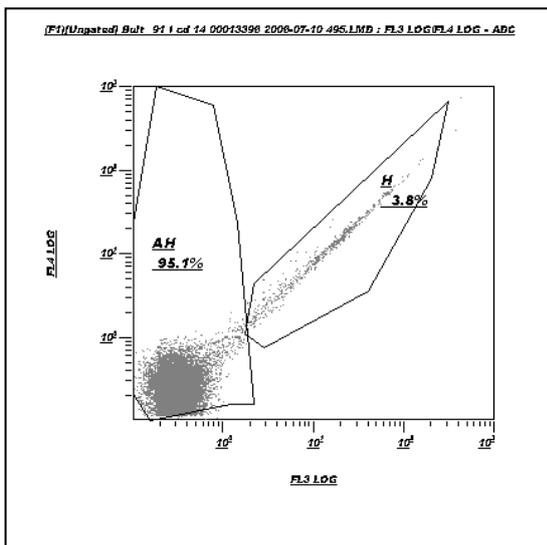
Blutproben wurden bei insgesamt fünf unterschiedlichen Altersgruppen von Ferkeln entnommen und analysiert, wobei ein Zeitpunkt der Probennahme vor und die vier anderen nach der Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 gewählt wurden. Es wurden insgesamt sieben Leukozytenpopulationen bestimmt: CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>doppelt positive Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen,  $\gamma\delta^+$ -Zellen, sowie CD8 $\beta^+$ -Zellen. Die Ergebnisse wurden in Prozent angegeben (% von Zellen in der Zellsuspension). Diese Immunzellpopulationen wurden einzeln bestimmt (pro Ansatz jeweils ein Parameter), nur bei der (Determinierung) der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>doppelt positiven Zellen wurden pro Ansatz zwei verschiedene monoklonale Antikörper angesetzt, um CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen zu bestimmen.



**Abb. 4.1** Übersicht über das Alter der Versuchstiere und die Zeitpunkte der Blutprobennahme

Welche morphologischen und Fluoreszenzeigenschaften die Blutzellen aus dem Ferkelblut nach der Beseitigung der Erythrozyten aufweisen und wie die Daten aus der Durchflusszytometrie dargestellt wurden, soll nun anhand von zwei Beispielen näher erläutert werden.

**Beispiel 1: CD14<sup>+</sup>-Zellen**

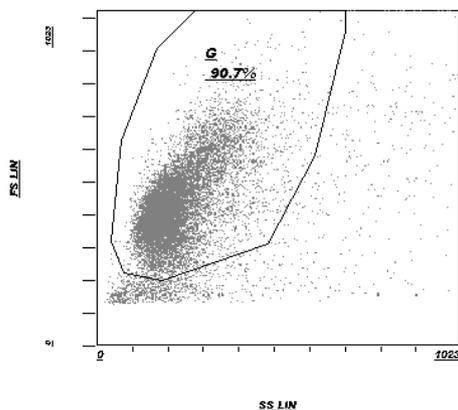


**Abb. 4.2**

Der Dot-Plot mit FL3 (x-Achse) und FL4 (y-Achse) zeigt eine mit Propidiumiodid (PI) gefärbte Blutprobe. Die toten Zellen haben nach Aufnahme von PI ihre Fluoreszenzeigenschaften geändert und strahlen in den dritten (FL3) und vierten Kanal (FL4). In die folgenden Analysen werden diese toten Zellen (Region H, 3,8 %) nicht einbezogen.

Die weitere Bestimmung der Lymphozytenpopulationen erfolgt ausschließlich mit lebenden Zellen aus dem Gate AH (ungefärbte Zellen, 95,1%).

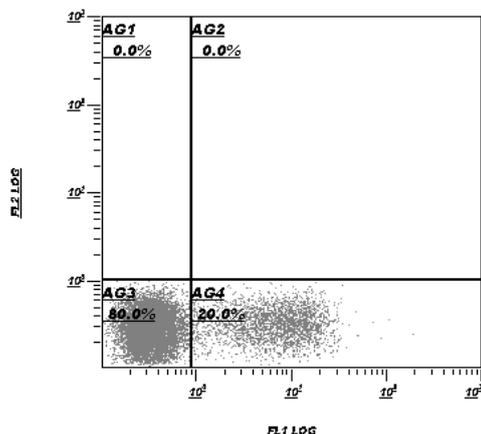
F11(AH) Bult 91 1 cd 14 00013398 2008-07-10 495.LMD : SS LINFS LIN - ADC



**Abb. 4.3**

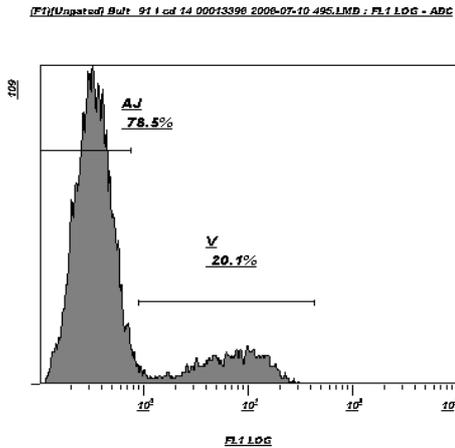
Zeigt ein Streulicht-Dot-Plot, in den nur lebende Zellen aus Gate AH (Abb. 4.2) eingehen. Die Zellen werden auch hier als Punkte dargestellt. Als Wolke (Region G) werden viele Zellen mit ähnlichen Streulichteigenschaften abgebildet. Auf der x-Achse wird das Seitwärtsstreulicht-Verhalten (Maß für die Granularität der Zellen) und in der y-Achse das Vorwärtsstreulicht-Verhalten (Maß für die Größe der Zellen) dargestellt. Hier wird nun endgültig festgelegt, welche Zellen bei der späteren Analyse der Fluoreszenzeigenschaften berücksichtigt werden sollen, in diesem Fall Region G. Die Zelltrümmer und Zellen mit abnormer Beschaffenheit werden ausgeschlossen.

F11(AH AND G) Bult 91 1 cd 14 00013398 2008-07-10 495.LMD : FL1 LOG FL2 LOG - ADC



**Abb. 4.4**

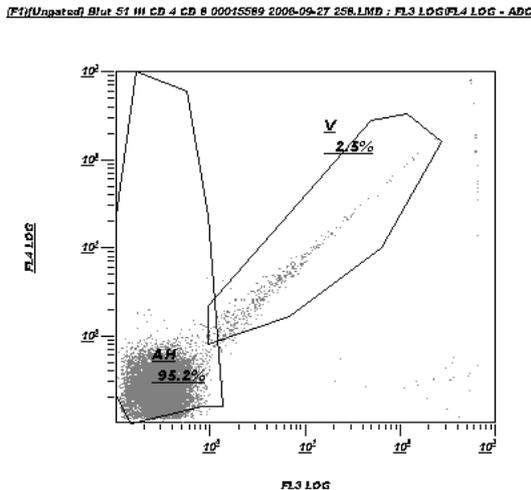
Zeigt eine Fluoreszenzanalyse. Hier wurde FL1 vs FL2 gewählt um die FITC markierten Zellen sichtbar zu machen. Nur lebende Zellen wurden berücksichtigt. Zelltrümmer wurden ausgeschlossen. FITC positive Zellen strahlen in dem ersten Kanal (FL1) und werden in der Region AG4 und AG2 abgebildet (CD14<sup>+</sup>Zellen 20%). In den Regionen AG3 und AG1 werden die FITC negativen Zellen abgebildet (CD14<sup>-</sup>Zellen, 80%).



**Abb. 4.5**

Zeigt ein Histogramm. Auf der x-Achse wird die Fluoreszenz-Intensität für FITC dargestellt ( $1$  bis  $10^3$ ), auf der y-Achse der Anzahl der Zellen mit dem gleichen x-Wert (Häufigkeiten). Die Region V entspricht CD14<sup>+</sup>Zellen: 20,1%. Die Region AJ entspricht die FITC negativen Zellen (CD14<sup>-</sup> Zellen: 78,50 %). Es ist erkennbar, dass es nur eine CD14<sup>+</sup> Population gibt (Zellen mit ähnlicher Fluoreszenzintensität) und dass sich diese Population deutlich von der negativen Population trennt.

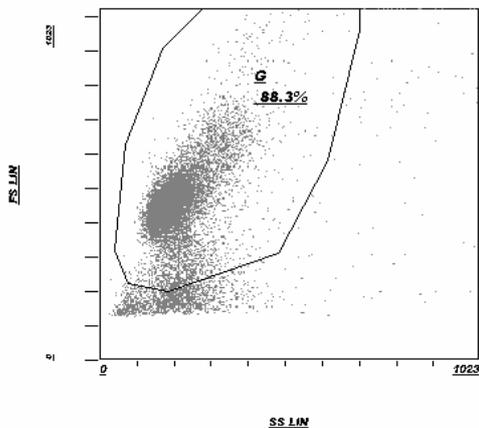
**Beispiel 2: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt positive Zellen**



**Abb. 4.6**

Bei diesem Dot-Plot liegt der Anteil der toten (mit PI gefärbten) Zellen bei 2,3%. Der Anteil der lebenden (ungefärbten) Zellen beträgt 95,2 %. In die weitere Analyse gehen nur diese lebenden Zellen ein (AH-Analysenfenster).

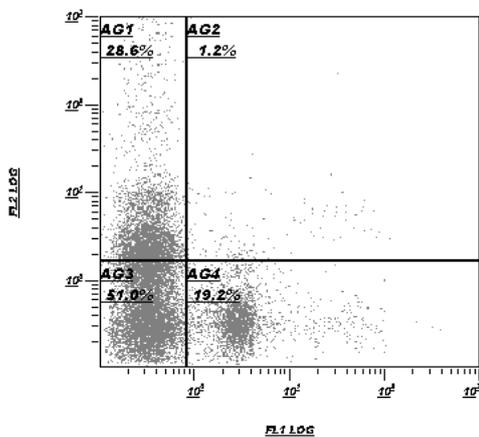
[F1]AH) Blut S1 III CD 4 CD 8 00015589 2006-09-27 258.LMD ; SS LIN/PS LIN - ADC



**Abb. 4.7**

Hier werden die Zelltrümmer und Zellen mit abnormen morphologischen Eigenschaften ausgeschlossen (Zellen und Partikel außerhalb von Region G). In die weitere Analyse gingen nur Zellen aus dem Analysefenster G ein.

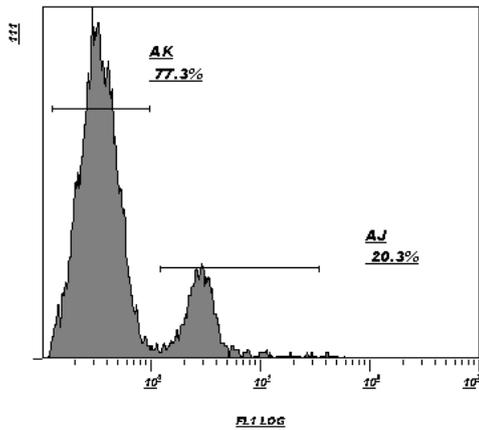
[F1]AH AND G) Blut S1 III CD 4 CD 8 00015589 2006-09-27 258.LMD ; FL1 LOG/FL2 LOG - ADX



**Abb. 4.8**

Der Dot-Plot zeigt eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD4 und CD8. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen werden in der Region AG4 dargestellt und machen einen Anteil von 19,2% aus (FITC gekoppelt, in FL1). CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen werden in der Region AG1 aufgetragen. Sie machen einen Anteil von 28,6% aus (PE gekoppelt, in FL2). Zellen, die beide Marker aufweisen, strahlen in FL1 und FL2 und werden daher in der Region AG2 aufgetragen, ihr Anteil in diesem Beispiel beträgt 1,2%. Die gesamten CD8<sup>+</sup>-Zellen werden demnach in AG1 und AG2 dargestellt, 29,8%. Die gesamten CD4<sup>+</sup>-Zellen werden in AG2 und AG4 dargestellt, 20,4%.

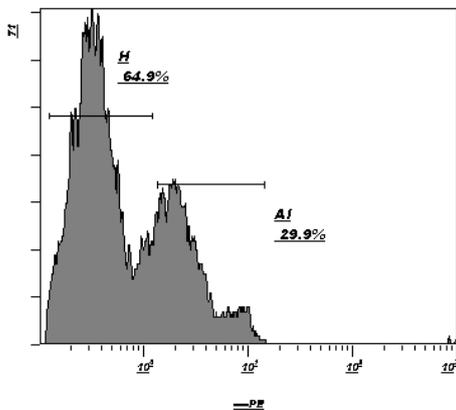
[F1] (Un gated) Blut S1 III CD 4 CD 8 00015589 2006-09-27 258.LMD : FL1 LOG - ADC



**Abb. 4.9**

Die Histogramm-Darstellung ermöglicht eine Darstellung der Populationen nach Fluoreszenz-Intensität und relativer Häufigkeit, mit der eine bestimmte Intensität auftritt. Es werden mit FITC-gefärbte Zellen dargestellt (CD4-FITC). Ihr Anteil beträgt 20,3% (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>). Die restlichen Zellen in demselben Ansatz (77,3%) haben kein FITC gebunden und sind daher CD4<sup>-</sup>.

[F1] (Un gated) Blut S1 III CD 4 CD 8 00015589 2006-09-27 258.LMD : FL2 LOG - ADC



**Abb. 4.10**

Histogramm-Darstellung der Zellen aus demselben Ansatz wie Abb.4.9. In Region AI (29,9%) werden alle CD8 $\alpha^+$ -Zellen dargestellt. Es sind zwei Populationen mit unterschiedlicher Expressionshäufigkeit von CD8 $\alpha^+$  (zwei Peaks) erkennbar. Die restlichen 64,9 % der Zellen in diesem Ansatz sind CD8 $\alpha^-$ .

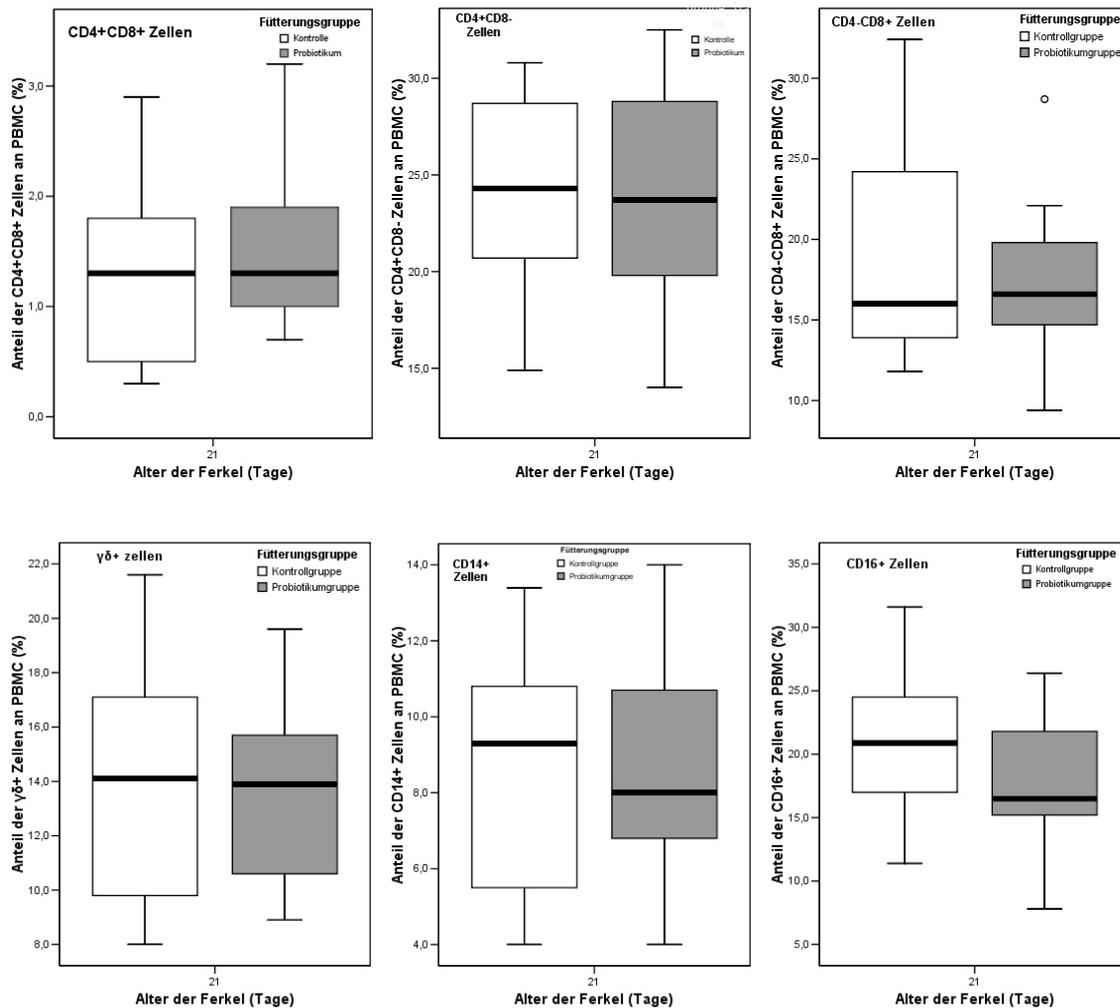
**Tabelle 4-1** Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der durchflusszytometrisch bestimmten Immunzellpopulationen im Blut, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen und Fütterungsgruppe.

Zell- population	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)					Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)				
	21	28	29	31	56	21	28	29	31	56
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	1,4* $\pm$ 0,87	1,42 $\pm$ 0,36	1,66 $\pm$ 0,71	1,82 $\pm$ 1,18	1,95 $\pm$ 0,83	1,6 $\pm$ 0,79	1,46 $\pm$ 0,81	1,82 $\pm$ 1,52	1,78 $\pm$ 1,82	3,91 $\pm$ 2,99
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	24,03 $\pm$ 5,4	20,50 $\pm$ 4,97	18,48 $\pm$ 5,92	15,10 $\pm$ 6,52	18,37 $\pm$ 3,92	23,93 $\pm$ 6,23	21,81 $\pm$ 5,06	20,81 $\pm$ 10,1	18,94 $\pm$ 3,74	22,33 $\pm$ 8,69
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	18,41 $\pm$ 7,09	23,41 $\pm$ 7,06	31,62 $\pm$ 12,83	34,65 $\pm$ 17,93	30,62 $\pm$ 9,92	16,80 $\pm$ 5,10	22,27 $\pm$ 10,32	21,4 $\pm$ 16,92	28,31 $\pm$ 9,02	24,42 $\pm$ 12,27
CD14 <sup>+</sup>	8,46 $\pm$ 3,01	16,83 $\pm$ 4,18	11,13 $\pm$ 4,21	11,70 $\pm$ 5,30	11,01 $\pm$ 5,11	8,55 $\pm$ 3,02	17,22 $\pm$ 6,80	15,16 $\pm$ 4,94	12,26 $\pm$ 5,31	8,77 $\pm$ 1,11
CD16 <sup>+</sup>	21,13 $\pm$ 6,11	38,18 $\pm$ 10,11	43,72 $\pm$ 12,07	41,62 $\pm$ 11,52	32,60 $\pm$ 9,34	17,97 $\pm$ 5,12	34,28 $\pm$ 9,22	34,70 $\pm$ 15,12	38,41 $\pm$ 7,10	32,12 $\pm$ 10,40
$\gamma\delta$ <sup>+</sup> (TCR1)	13,86 $\pm$ 4,45	11,01 $\pm$ 4,36	15,68 $\pm$ 6,08	18,68 $\pm$ 6,49	19,72 $\pm$ 6,86	13,40 $\pm$ 3,23	14,27 $\pm$ 7,55	22,76 $\pm$ 6,38	19,32 $\pm$ 3,40	18,91 $\pm$ 6,55
CD8 $\beta$ <sup>+</sup>	14,65 $\pm$ 4,68	9,07 $\pm$ 1,95	11,76 $\pm$ 4,39	16,90 $\pm$ 7,47	18,9 $\pm$ 7,22	10,50 $\pm$ 4,94	9,44 $\pm$ 4,28	9,63 $\pm$ 5,83	9,29 $\pm$ 4,82	9,41 $\pm$ 3,03

### 4.1.1. Ergebnisse der Blutanalyse am 21. Lebenstag (vor Salmonellen-Infektion)

Folgende Subpopulationen wurden im Blut der Ferkel bestimmt: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen,  $\gamma\delta^+$ -Zellen, CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen sowie Zellen mit CD8 $\beta$ -Kette (Abb. 4.12)

Abb. 4.11



**Abb. 4.11** Grafische Darstellung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von Blutproben von Ferkeln am 21. Lebenstag. Die Werte der mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium NCIMB 10415* supplementierten Tiere (Probiotikumgruppe) sind grau dargestellt. Kontrolltiere, die kein Probiotikum erhielten, sind weiß dargestellt. Die abgebildeten Parameter zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (T-Test).

#### 4.1.1.1. CD8 $\beta$ <sup>+</sup> Subpopulation

Die CD8 $\beta$ <sup>+</sup>-Subpopulation im Blut war signifikant kleiner in der Probiotikumgruppe (T-Test,  $t(20)=2,25$ ,  $P=0,036$ ).

Abb. 4.12

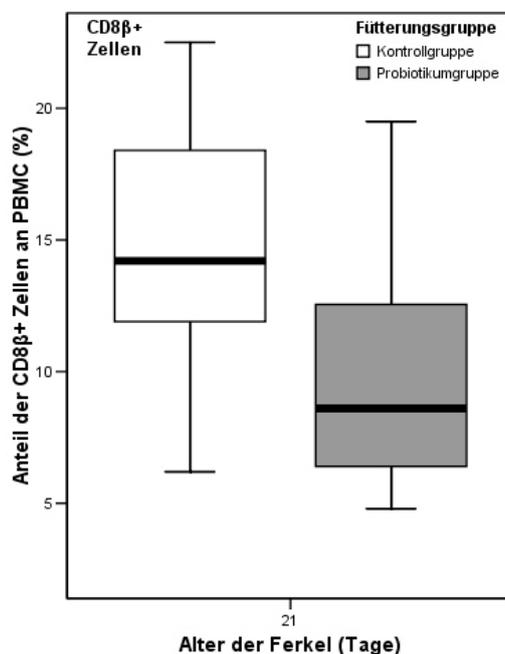


Tabelle 4-2

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
21 Tage	N	gültig	10	12
		fehlend	3	1
	Mittelwert		14,65	10,15
	Standardabweichung		4,68	4,94
	Perzentile	25	11,58	6,25
		74	18,55	13,14

**Abb. 4.12** Anteil der CD8 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion aus Blut von 21 Tage alten probiotisch behandelten Ferkeln (grauer Balken) und Blut von gleichaltrigen Kontrolltieren (weißer Balken). Die Tabelle 4-12 gibt Mittelwerte, Standardabweichungen, Perzentile sowie Stichprobengröße an.

### 4.1.2. Ergebnisse der Phänotypisierung von Immunzellpopulationen aus den Blutproben nach der experimentellen Salmonellen-Infektion

Die gleichen Parameter wie bei den 21 Tage alten Ferkeln wurden in den Blutproben von Ferkeln nach der Infektion mit *S. typhimurium* DT104 bestimmt. Die Proben wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (3, 24, 71 Stunden bzw. 28 Tage nach der Infektion), um die Immunreaktion nach der Infektion mit Salmonellen zu erfassen.

#### 4.1.2.1. CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

Anhand der Färbung von CD4 und CD8 $\alpha$  wurden die Prozentanteile von drei Immunzellpopulationen im Blut bestimmt (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>). Ein signifikanter Effekt der probiotischen Behandlung auf die CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen konnte festgestellt werden. Der Prozentanteile dieser Population, welche zytotoxische T-Zellen und Natural Killer Zellen beinhaltet, war unabhängig vom Alter der Tiere signifikant größer bei den Kontrolltieren.

Abb. 4.13 A

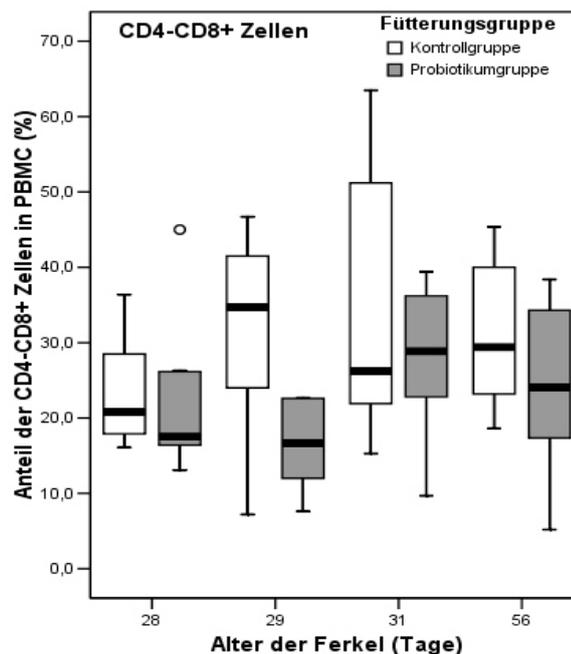
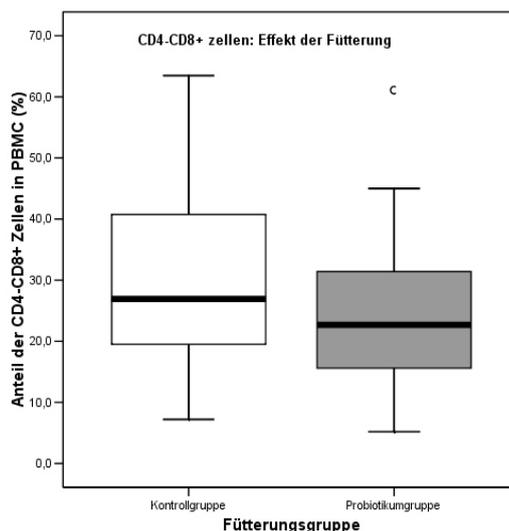


Tabelle 4-3

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
28 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	2
	Mittelwert		23,41	22,27
	Standardabweichung		7,06	10,32
	Perzentile	25	17,67	16,00
75		29,47	26,22	
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		31,62	21,40
	Standardabweichung		12,83	16,92
	Perzentile	25	22,30	11,65
75		41,72	22,65	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		34,65	28,32
	Standardabweichung		17,93	9,02
	Perzentile	25	20,92	22,70
75		53,30	36,80	
56 Tage	N	Gültig	10	7
		Fehlend	0	1
	Mittelwert		30,62	24,42
	Standardabweichung		9,34	12,277
	Perzentile	25	22,25	13,30
75		40,52	36,70	

Abb. 4.13 B

Abb. 4.13 Anteil der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen im Ferkelblut.

**A.** Altersabhängiger Anteil in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion bei probiotisch behandelten Tieren (grauer Balken) und Kontrolltieren (weißer Balken). Die Tabelle gibt Mittelwerte, Standardabweichungen, Perzentile sowie Stichprobengröße an. **B.** Darstellung nach Fütterungsgruppen ( $P=0,04$ ).

### 4.1.2.2. CD8 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen

CD8 ist ein Corezeptor für die MHC-Klasse I Moleküle. Ihm kommt eine Helferfunktion bei der Antigenerkennung zu. Es handelt sich dabei um ein dimeres Oberflächenantigen, welches in zwei Varianten auf einer Subpopulation der T-Zellen exprimiert werden kann. Die homodimere Form besteht aus zwei gleichen CD8 $\alpha$ -Ketten, während die heterodimere Form aus einer CD8 $\alpha$  und einer CD8 $\beta$  besteht.

Bei allen untersuchten Altersgruppen war der Mittelwert der CD8 $\beta$ -tragenden Zellenpopulation bei den probiotisch behandelten Tieren signifikant niedriger. Diese Unterschiede waren besonders deutlich bei 31 und 56 Tage alten Tieren.

Abb. 4.14 A

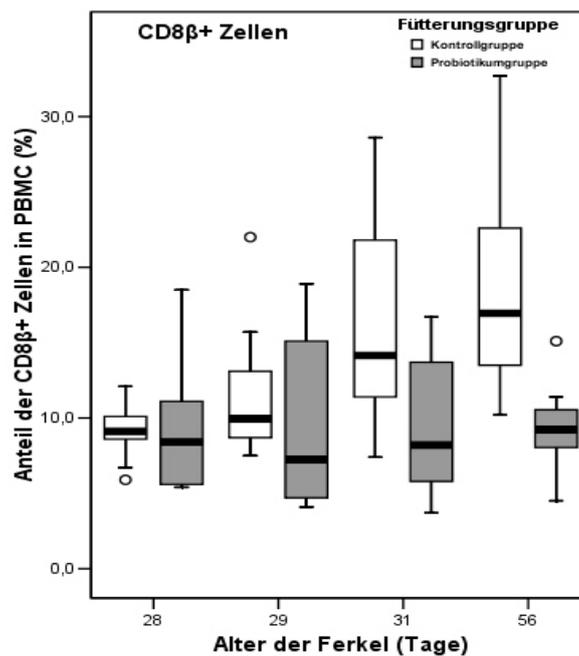


Tabelle 4-4

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumsgruppe
28 Tage	N	Gültig	9	10
		Fehlend	1	0
	Mittelwert		9,07	9,44
	Standardabweichung		1,95	4,28
	Perzentile	25	7,65	5,57
75		10,60	11,87	
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		11,76	9,63
	Standardabweichung		4,39	5,85
	Perzentile	25	8,62	4,40
75		13,75	15,65	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		16,90	9,29
	Standardabweichung		7,47	4,82
	Perzentile	25	10,85	5,27
75		23,22	14,37	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		18,91	9,41
	Standardabweichung		7,22	3,03
	Perzentile	25	13,15	7,87
75		24,17	10,97	

Abb 4.14 B

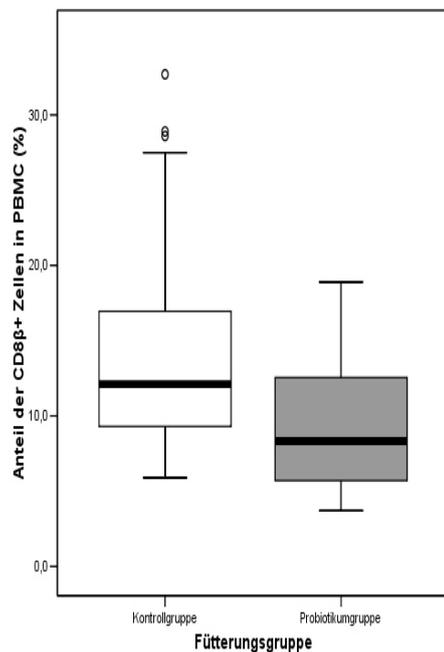
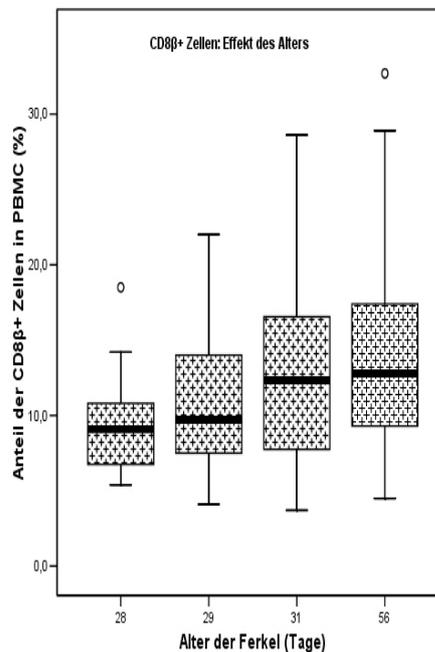
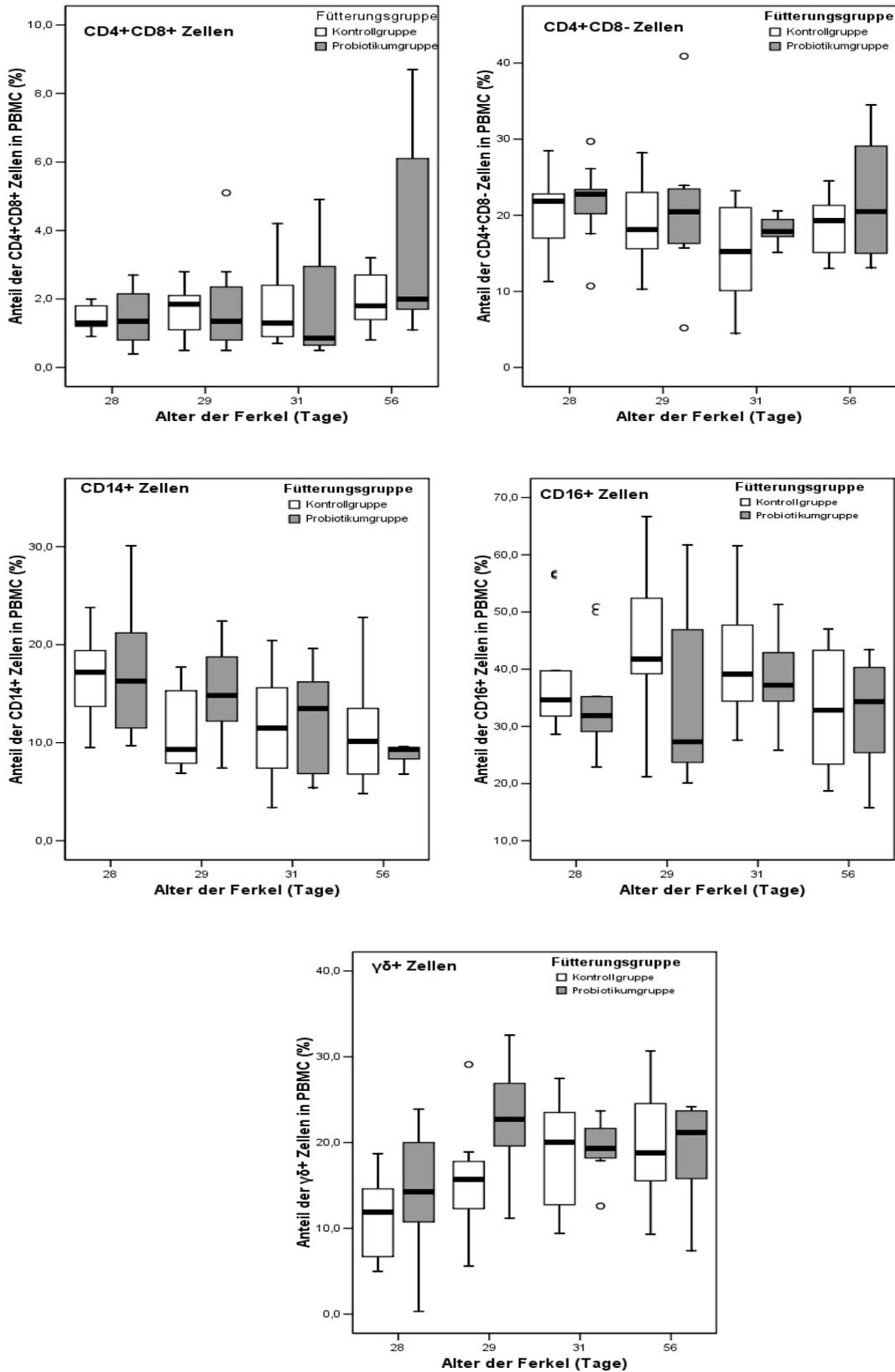


Abb 4.14 C



**Abb. 4.14.** Anteil CD8β<sup>+</sup>- Zellen im Ferkelblut. **A.** Altersabhängiger Anteil in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion bei probiotisch behandelten Tieren (grauer Balken) und Kontrolltieren (weißer Balken). Die Tabelle gibt Mittelwerte, Standardabweichungen, Perzentile sowie Stichprobengröße an. **B.** Effekt der Fütterungsgruppe (p=0,000), **C.** Effekt des Alters: 56 Tage alte Tiere hatten signifikant mehr von diesen Zellen als 28 Tage alte Tiere (p=0,044).

## Ergebnisse



**Abb. 4.15** Altersabhängiger Anteil verschiedener Immuzellpopulationen in der über Ficoll gereinigten Zellfraktion bei probiotisch behandelten Tieren (graue Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor

#### 4.2. Ergebnisse der Phänotypisierung der Immunzellpopulationen aus Milzgewebe

Folgende Subpopulationen wurden in den Milzproben bestimmt: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD45<sup>+</sup> Zellen, CD18<sup>+</sup>-Zellen sowie  $\gamma\delta^+$ -Zellen.

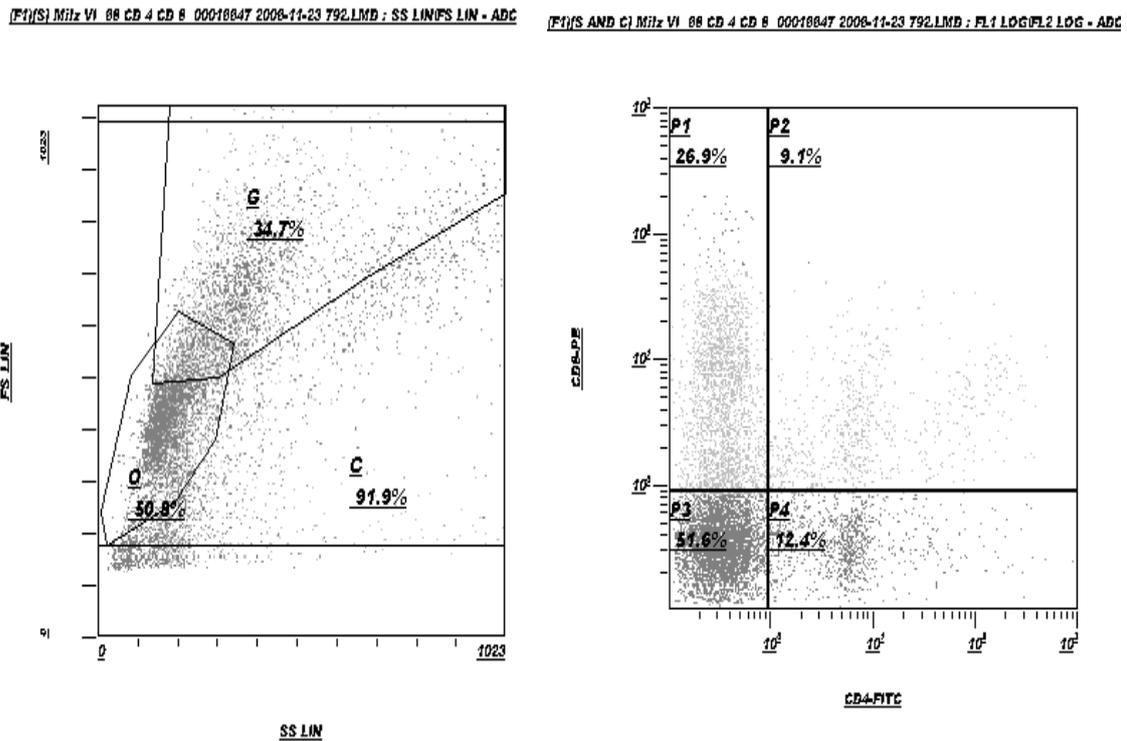


Abb. 4.16 Lymphozyten aus der Milz

**Rechts:** Darstellung nach Streulichteigenschaften und Festlegen der Analysefenster.

**Links:** In den Dot-Plot gingen Zellen aus dem Analysefenster C ein. (Dies beinhaltet die Regionen O und G, schließt aber Zelltrümmer weitgehend aus.)

## Ergebnisse

**Tabelle 4-5** Auflistung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der durchflusszytometrisch bestimmten Immunzellpopulationen aus der Milz, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen und Fütterungsgruppe

Bestimmte Zellpopulation	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)				Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)			
	28	29	31	56	28	29	31	56
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,33 $\pm$ 2,66	10,76 $\pm$ 3,13	9,41 $\pm$ 2,38	9,23 $\pm$ 3,0	8,61 $\pm$ 3,78	7,28 $\pm$ 1,80	10,67 $\pm$ 3,79	10,43 $\pm$ 3,85
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	14,42 $\pm$ 2,97	12,27 $\pm$ 4,16	11,58 $\pm$ 3,77	9,39 $\pm$ 2,40	19,56 $\pm$ 6,34	12,56 $\pm$ 6,34	14,36 $\pm$ 4,03	13,30 $\pm$ 1,98
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	30,41 $\pm$ 5,36	32,11 $\pm$ 10,73	35,30 $\pm$ 9,42	30,28 $\pm$ 9,49	25,66 $\pm$ 15,0	24,75 $\pm$ 9,80	33,6 $\pm$ 8,24	27,10 $\pm$ 7,25
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	19,68 $\pm$ 3,93	24,11 $\pm$ 8,15	20,40 $\pm$ 6,67	17,35 $\pm$ 9,07	14,41 $\pm$ 6,80	15,32 $\pm$ 5,87	25,03 $\pm$ 6,03	17,02 $\pm$ 7,35
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	17,67 $\pm$ 4,77	17,08 $\pm$ 4,22	15,93 $\pm$ 6,26	15,25 $\pm$ 6,83	26,24 $\pm$ 13,27	16,63 $\pm$ 7,83	19,60 $\pm$ 3,66	19,28 $\pm$ 7,97
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	21,41 $\pm$ 4,45	21,27 $\pm$ 7,22	23,65 $\pm$ 11,17	21,1 $\pm$ 11,52	18,0 $\pm$ 11,96	18,66 $\pm$ 13,65	21,48 $\pm$ 9,35	22,47 $\pm$ 13,94
CD14 <sup>+</sup>	25,64 $\pm$ 7,97	20,83 $\pm$ 4,90	20,70 $\pm$ 4,23	16,81 $\pm$ 8,57	22,79 $\pm$ 4,65	23,77 $\pm$ 7,87	18,90 $\pm$ 8,29	17,42 $\pm$ 4,12
CD16 <sup>+</sup>	63,0 $\pm$ 5,63	64,41 $\pm$ 5,84	61,03 $\pm$ 7,53	53,90 $\pm$ 9,65	59,67 $\pm$ 7,2	60,47 $\pm$ 11,8	61,57 $\pm$ 8,44	56,88 $\pm$ 10,17
CD45RA <sup>+</sup>	48,9 $\pm$ 4,36	53,13 $\pm$ 5,95	51,03 $\pm$ 8,26	53,62 $\pm$ 8,64	51,26 $\pm$ 4,77	44,93 $\pm$ 9,70	54,53 $\pm$ 9,55	53,04 $\pm$ 8,31
$\delta\gamma^+$ (TCR1)	22,19 $\pm$ 4,15	25,24 $\pm$ 7,06	25,69 $\pm$ 7,92	31,81 $\pm$ 5,12	19,59 $\pm$ 2,57	21,55 $\pm$ 5,71	28,60 $\pm$ 6,19	25,35 $\pm$ 6,23
CD18 <sup>+</sup>	94,63 $\pm$ 1,60	94,75 $\pm$ 2,63	90,32 $\pm$ 9,74	90,32 $\pm$ 13,76	93,16 $\pm$ 3,11	86,87 $\pm$ 14,88	89,06 $\pm$ 9,14	89,17 $\pm$ 9,11

### 4.2.1. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

Diese Subpopulation der T-Lymphozyten erfährt in beiden Fütterungsgruppen eine ähnliche Entwicklung. Ein signifikanter Effekt der Fütterung ist bei den 29 Tage alten Ferkeln zu sehen. Hier ist der Prozentsatz dieser Population signifikant niedriger in der Probiotikumgruppe (T-Test:  $t(15,66)=2,95, p=0,01$ ).

Abb. 4.17

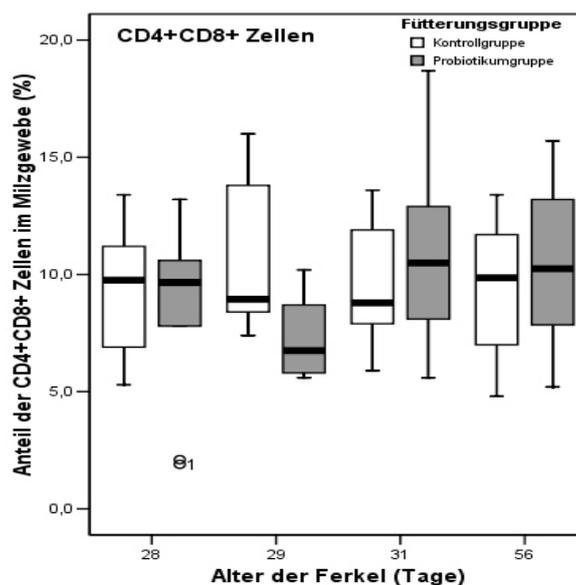


Tabelle 4-6

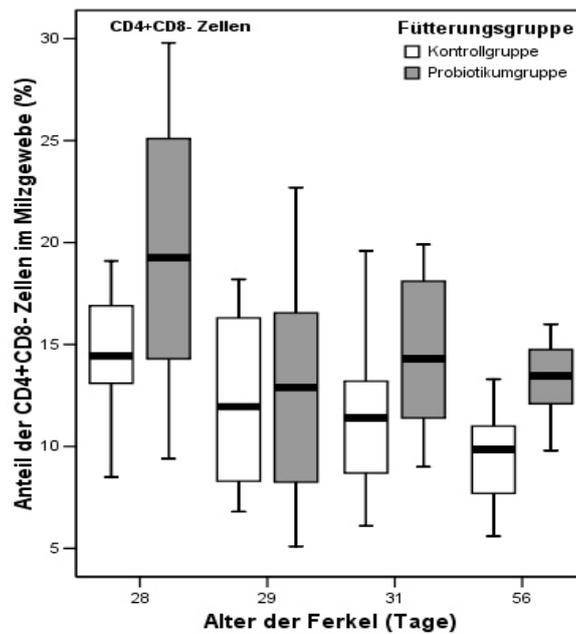
Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
28 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		9,33	8,61
	Standardabweichung		2,66	3,78
	Perzentile	25	6,77	6,37
75		11,40	10,85	
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		10,67	7,28
	Standardabweichung		3,13	1,80
	Perzentile	25	8,27	5,80
75		13,87	9,25	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		9,41	10,67
	Standardabweichung		2,38	3,79
	Perzentile	25	7,90	7,72
75		11,97	12,95	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		9,23	10,43
	Standardabweichung		3,00	3,85
	Perzentile	25	6,50	6,82
75		11,87	14,40	

Abb. 4.17 Entwicklung des Anteils der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in den aus Milzgewebe gereinigten Zellen in den Fütterungsgruppen (Probiotikumgruppe: grauer Balken, Kontrolltiere: weißer Balken).

**4.2.2. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen**

Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen nahm (außer am Tag 31 bei den probiotisch behandelten Tieren) bei beiden Fütterungsgruppen vom 28. bis zum 56. Lebenstag kontinuierlich ab. Zu allen Zeitpunkten war der Anteil dieser Subpopulation bei der Probiotikumgruppe signifikant erhöht (p=0.016)

**Abb. 4.18 A**



**Tabelle 4-7**

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
28 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		14,42	19,56
	Standardabweichung		2,97	6,34
	Perzentile	25	12,78	14,30
75		16,92	25,43	
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		12,27	12,90
	Standardabweichung		4,16	5,91
	Perzentile	25	8,18	7,53
75		16,55	17,88	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		11,58	14,36
	Standardabweichung		3,77	4,03
	Perzentile	25	8,63	10,88
75		13,55	18,28	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		9,39	13,30
	Standardabweichung		2,40	1,98
	Perzentile	25	7,40	11,85
75		11,05	14,98	

Abb. 4.18 B

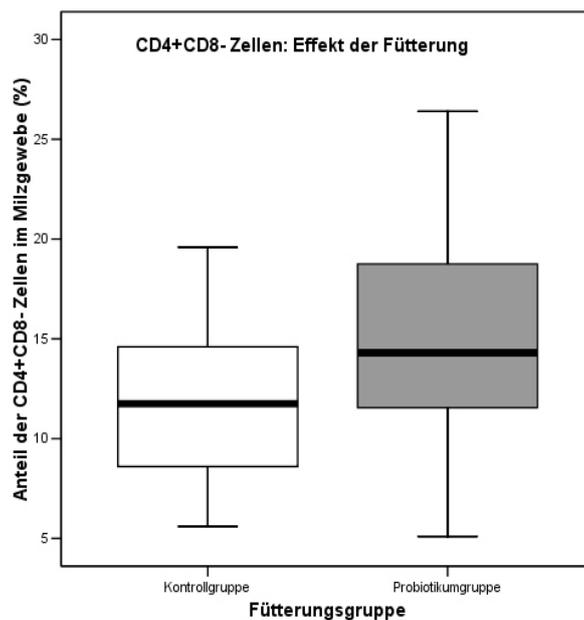
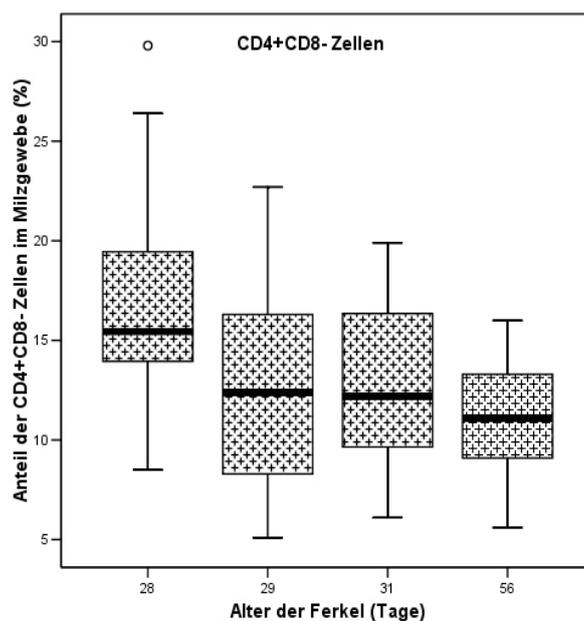


Abb. 4.18 C.

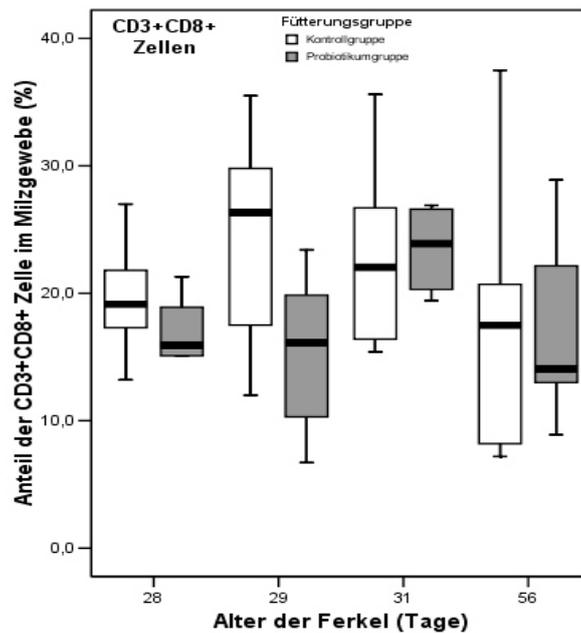


**Abb. 4-18 A.** Entwicklung des Anteils der  $CD4^+CD8^-$ -Zellen in den aus der Milz gereinigten Immunzellen in der Probiotikumgruppe (grauer Balken) und der Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Tabelle 4-7 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an. **B** . Darstellung des Fütterungseffekts auf die  $CD4^+CD8^-$ -Zellen ( $p=0,00$ ). **C** . Darstellung der altersabhängigen Entwicklung. 28 Tage alte Tiere hatten unabhängig von der Fütterung signifikant höhere Werte als 56 Tage alte Tiere ( $p=0,01$ ).

**4.2.3. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen**

Der Anteil dieser Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen nahm bei den Kontrolltieren zwischen dem 28. und dem 29. Lebenstag deutlich zu, um vom 31. Lebenstag bis zum 56. Lebenstag wieder abzunehmen. Bei probiotisch behandelten Tieren nahm der Anteil zwischen dem 28. und dem 31. Lebenstag zu und fiel erst am 56. Lebenstag ab. Nur bei den 29 Tage alten Ferkeln konnte ein signifikanter Effekt der Fütterung festgestellt werden (T-Test,  $t(16)=2,53, p=0,02$ ).

**Abb. 4.19 A**



**Tabelle 4-8**

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
28 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		19,68	14,41
	Standardabweichung		3,93	6,80
	Perzentile	25	17,17	11,87
75		22,47	19,37	
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		24,11	15,32
	Standardabweichung		8,15	5,874
	Perzentile	25	16,67	9,35
75		30,37	20,32	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		22,40	25,03
	Standardabweichung		6,676	6,03
	Perzentile	25	16,30	20,20
75		27,17	26,75	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		17,35	17,02
	Standardabweichung		9,07	7,35
	Perzentile	25	8,17	12,80
75		21,30	25,07	

Abb. 4.19. B

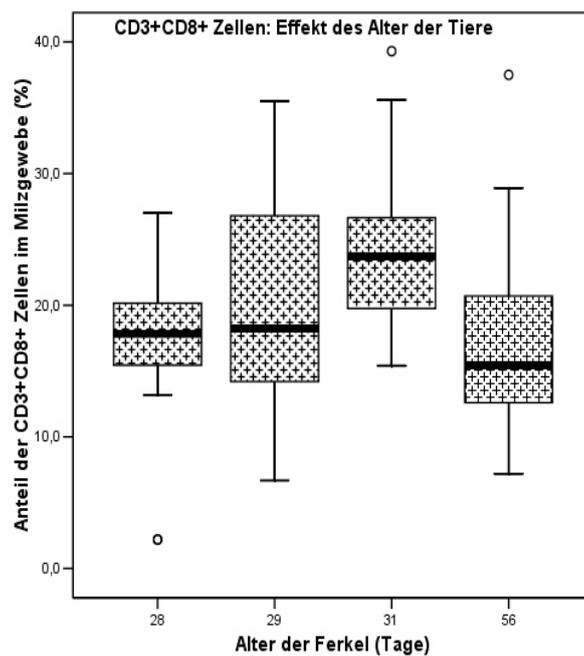
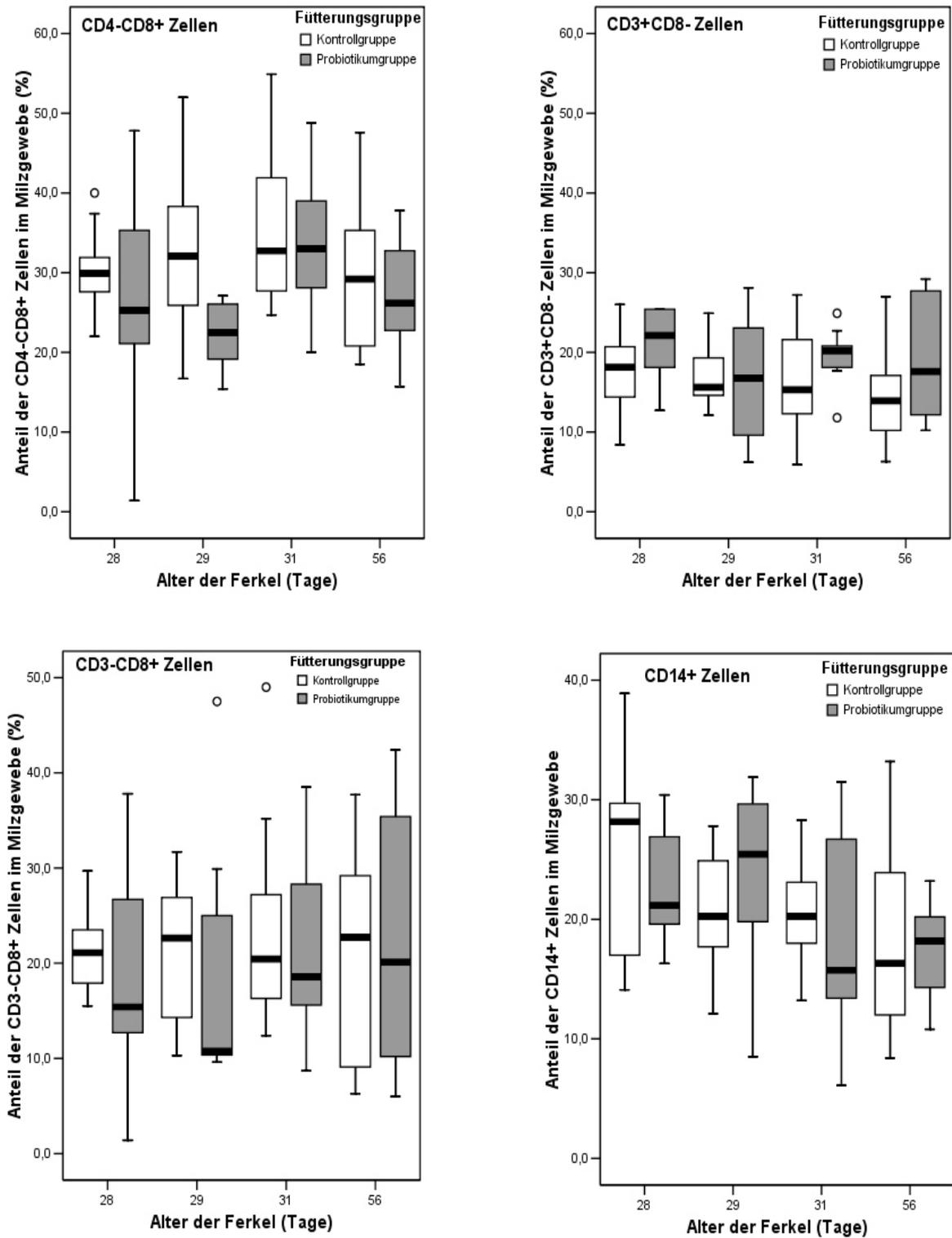


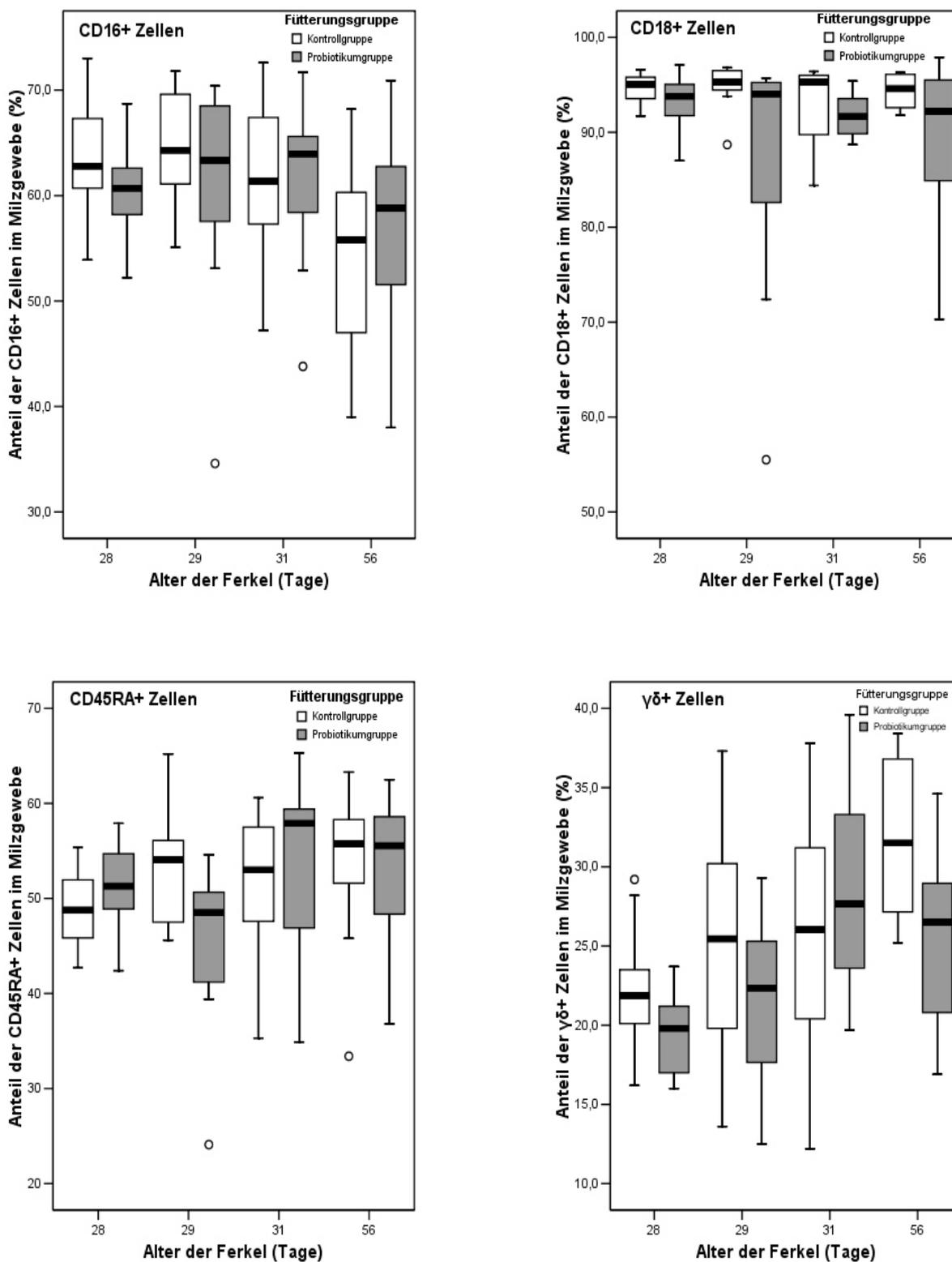
Abb. 4.19

**A** Entwicklung des Anteils der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in den aus dem Milzgewebe gereinigten Lymphozyten in der Probiotikumgruppe (grauer Balken) und der Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Tabelle 4-8 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

**B**: Darstellung der altersabhängigen Entwicklung. 31 Tage Tiere hatten signifikant mehr CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen als 28 Tage alte Tiere ( $p=0,038$ ) und auch mehr als 56 Tage alte Tiere ( $p=0,022$ ).



**Abb. 4.20 A** Altersabhängige Anteile verschiedener Immunzellpopulationen in der Milz bei probiotisch behandelten Tieren (grauer Balken) und Kontrolltieren (weißer Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.



**Abb. 4.20 B** Altersabhängige Anteile verschiedener Immunzellpopulationen in der Milz bei probiotisch behandelten Tieren (graue Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

## Ergebnisse

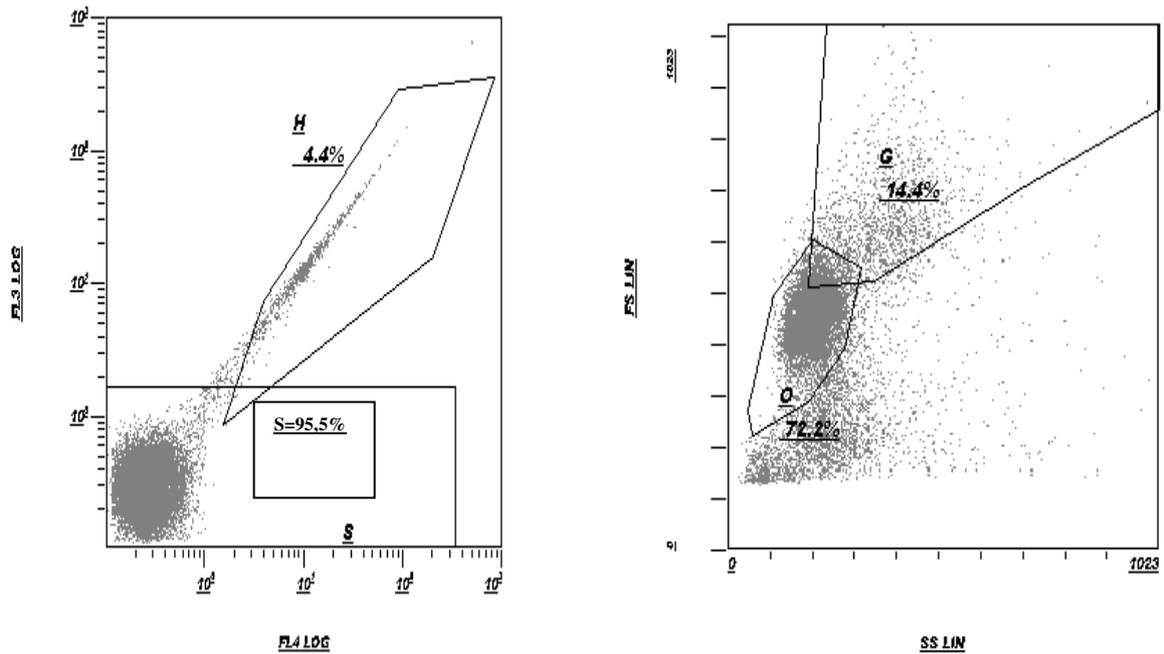
### 4.3. Ergebnisse der Phäotypisierung der Immunzellpopulationen aus den ilealen Peyerschen Platten (Distale PP).

Die Anteile folgender Immunzellpopulationen wurden in der distalen PP bestimmt: CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD1<sup>+</sup>-Zellen, und MHC I<sup>+</sup>-Zellen.

Die Analyse der Daten sei hier am Beispiel CD16<sup>+</sup>-Zellen erörtert:

*[F1](Un gated) BLut 91 VII CD 18 00014488 2008-06-07 1052.LMD : FL4 LOG FL3 LOG - ADC*

*[F1](Un gated) BLut 91 VII CD 18 00014488 2008-06-07 1052.LMD : SS LIN FS LIN - ADC*



#### Abb. 4.21

**Links:** Dot-Plot mit FL3 vs FL4

Tote (mit PI gefärbte) Zellen erscheinen in der Region H. Nur lebende Zellen gehen in die weitere Analyse ein (Region S, 95,5%).

**Rechts:** Dot-Plot nach Streulichteigenschaften, Zelltrümmern und Zellen mit abnormer Morphologie werden hier aus der Analyse ausgeschlossen.

**Tabelle 4-9** Auflistung der Prozentanteile (Mittelwerte) und Standardabweichungen verschiedener Immunzellpopulationen der aus ilealen (distalen) Peyerschen Platten gewonnenen Zellfraktion

Analysierte Zellpopulation	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)				Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)			
	28	29	31	56	28	29	31	56
CD1 <sup>+</sup>	75,55	85,59	81,74	83,52	82,92	79,37	81,21	72,82
	±	±	±	±	±	±	±	±
	24,17	2,55	5,70	12,94	3,90	13,80	11,93	20,04
CD14 <sup>+</sup>	3,11	5,12	2,85	1,30	4,60	2,81	3,16	1,5
	±	±	±	±	±	±	±	±
	2,10	6,06	1,24	0,71	6,97	2,08	3,27	1,04
CD16 <sup>+</sup>	3,90	3,77	5,49	3,94	5,60	6,46	7,08	5,51
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,64	1,74	2,67	2,06	4,59	3,09	3,99	2,18
MHC I <sup>+</sup>	88,08	96,64	97,16	97,37	94,82	92,05	92,05	93,70
	±	±	±	±	±	±	±	±
	23,33	2,61	3,09	2,27	6,49	6,49	11,70	4,60

### 4.3.1. CD16<sup>+</sup>-Zellen

In den beiden Fütterungsgruppen zeigte die CD16<sup>+</sup> Population eine ähnliche Entwicklung. Ihr Prozentanteil nahm in beiden Fütterungsgruppen zwischen dem 28. und dem 31. Lebenstag zu, um anschließend abzufallen. Bei 31 Tage alten Tieren erreichte die Population ihr Maximum. In jeder Altersklasse hatten die Tiere der Probiotikumgruppe einen signifikant höheren Anteil an CD16<sup>+</sup>-Zellen in den distalen Peyerschen Platten (p=0,006)

Abb. 4.22 A

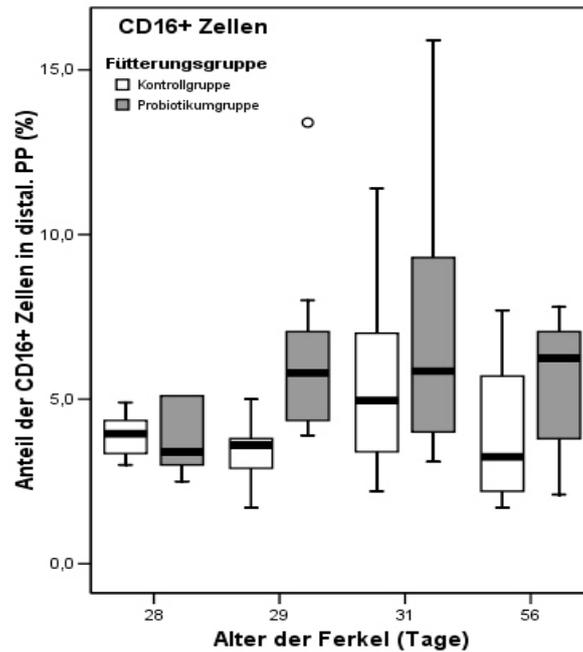


Tabelle 4-10

Alter der Ferkel			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
28 Tage	N	Gültig	8	9
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		3,90	5,61
	Standardabweichung		0,64	4,59
	Perzentile	25	3,27	2,92
75		4,42	7,00	
29 Tage	N	Gültig	9	8
		Fehlend	1	2
	Mittelwert		3,77	6,46
	Standardabweichung		1,747	3,09
	Perzentile	25	2,60	4,32
75		4,40	7,52	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		5,49	7,08
	Standardabweichung		2,67	3,99
	Perzentile	25	3,35	3,95
75		7,12	9,42	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		3,94	5,51
	Standardabweichung		2,06	2,18
	Perzentile	25	2,12	3,05
75		5,90	7,17	

Abb. 4.22 B

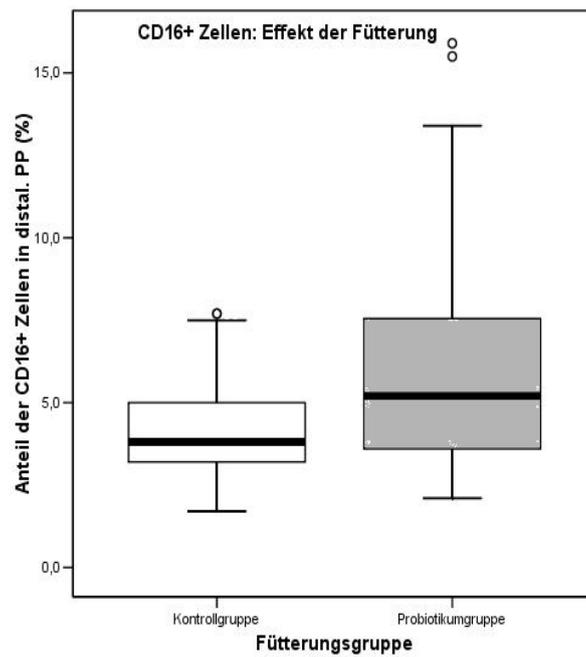
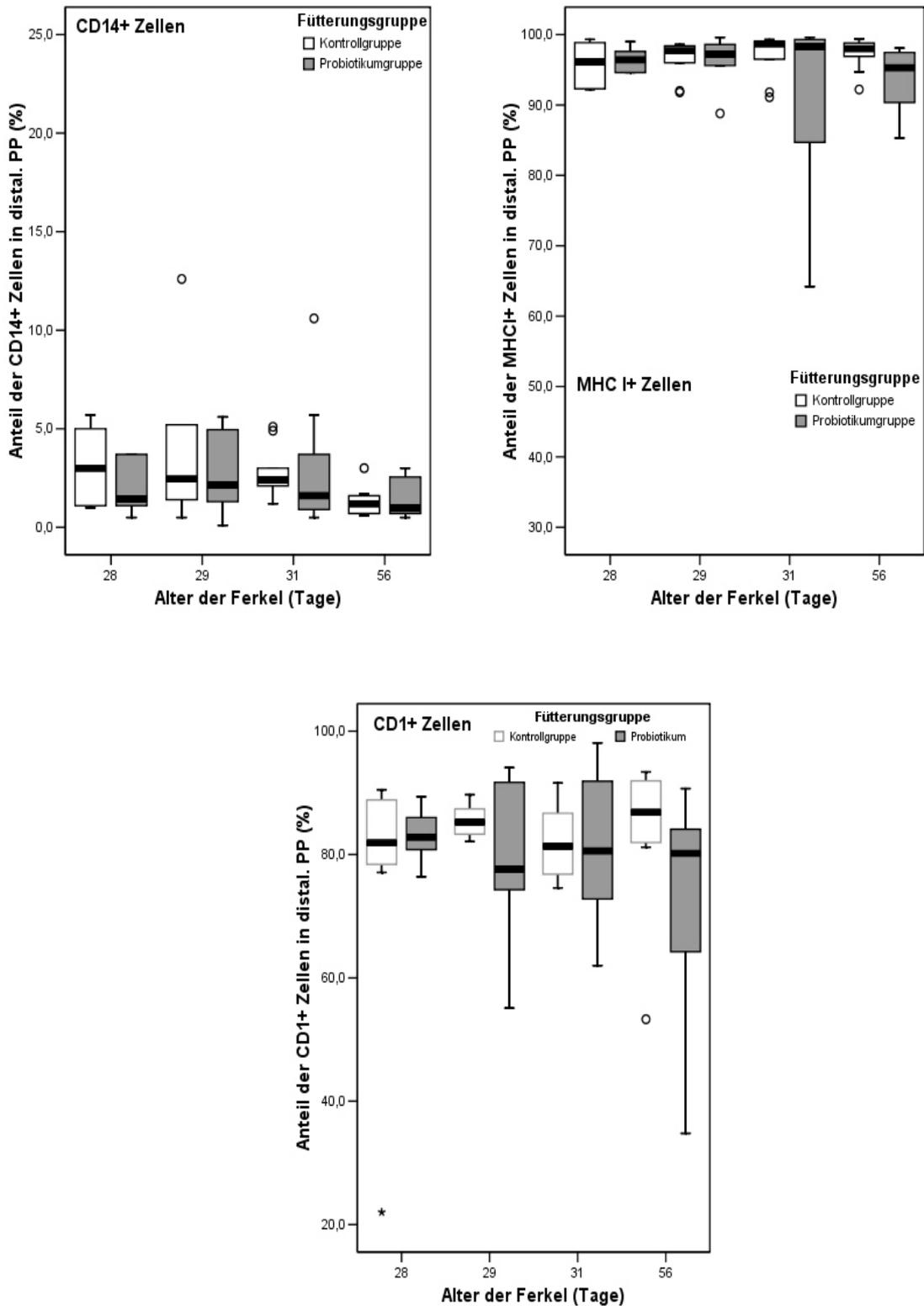


Abb. 4.22

A Entwicklung des Anteils der CD16<sup>+</sup>-Zellen in den distalen Peyerschen Platten der Probiotikumgruppe (grauer Balken) und der Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Tabelle 4-9 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Perzentile an.

B. Fütterungseffekt auf die CD16<sup>+</sup>-Zellen. Die Tiere der Probiotikumgruppe hatten unabhängig vom Alter der Tiere signifikant mehr CD16<sup>+</sup>-Zellen als die Kontrollgruppe ( $p=0,006$ ).



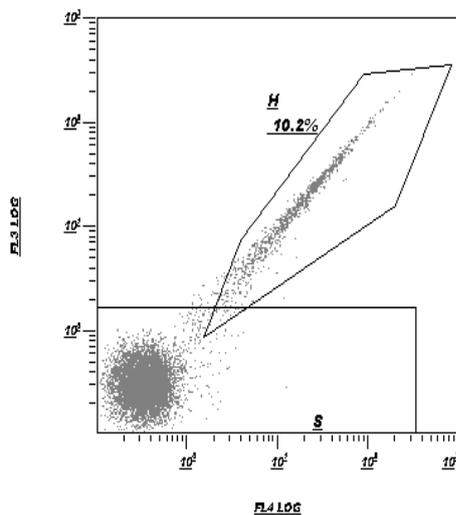
**Abb. 4.23** Altersabhängige Anteile ausgewählter Immunzellpopulationen in den Peyerschen Platten der probiotisch behandelten Tiere (graue Balken) und der Kontrolltiere (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

#### 4.4. Ergebnisse der Phänotypisierung der Immunzellpopulationen aus den jejunalen Peyerschen Platten (prox. PP)

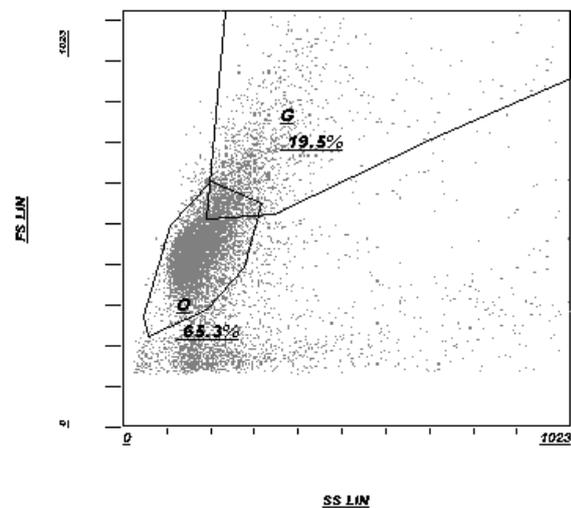
Insgesamt wurden die Anteile von 13 verschiedenen Immunzellpopulationen in den proximalen Peyerschen Platten bestimmt: CD1<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD21<sup>+</sup>-Zellen, CD25<sup>+</sup>-Zellen, MHC1<sup>+</sup>-Zellen, IgA<sup>+</sup>-Zellen und  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen.

Anhand eines Beispiels soll jetzt erläutert werden, wie die Analysefenster festgelegt, und welche Gesichtspunkte dabei berücksichtigt wurden.

[F1]Ungated Prox. PP S1 III CD 21 00015848 2006-09-27 315.LMB : FL4 LOG FL3 LOG - ADC



[F1]Ungated Prox. PP S1 III CD 21 00015848 2006-09-27 315.LMB : SS LIN FS LIN - ADC

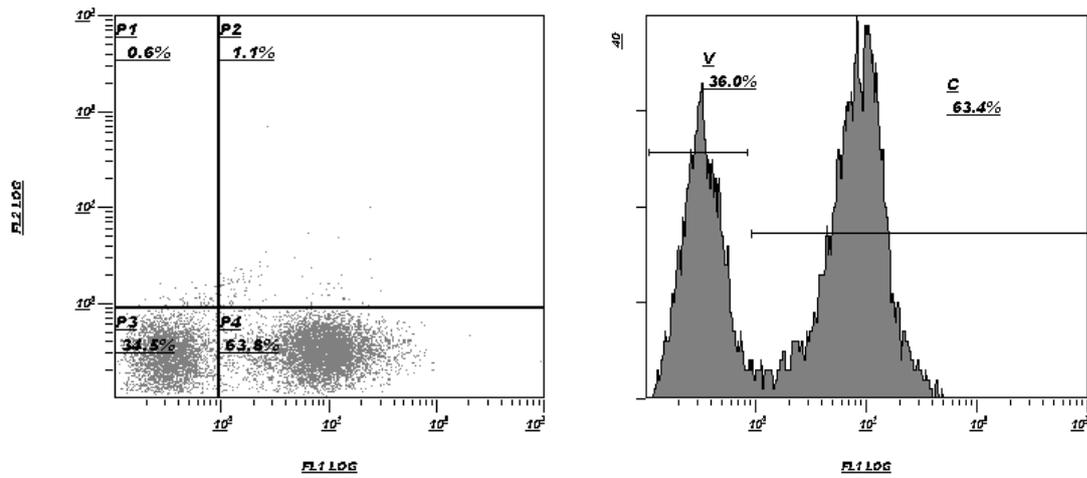


**Abb. 4.24** Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen der Immunzellen aus den proximalen PP. **Links:** Tote (mit PI gefärbte) Zellen befinden sich in der Region H (10,2%). In die weitere Analyse gehen nur lebende Zellen ein (Region S, 88,8%). **Rechts:** Ein Analysefenster für Lymphozyten (Region O) und ein Analysefenster für Monozyten und Granulozyten (Region G) wurden so festgelegt, dass Zelltrümmer unberücksichtigt blieben.

## Ergebnisse

[F1](S1) Prox. PP 51 III CD 21 00015848 2008-09-27 315.LMD : FL1 LOG(FL2 LOG - ADC

[F1](Un gated) Prox. PP 51 III CD 21 00015848 2008-09-27 315.LMD : FL1 LOG - ADC



**Abb. 4.25 Links:** Dot-Plot Darstellung FL1 vs FL2. Mit Fluoreszeinisothiocyanat gefärbten CD21<sup>+</sup>-Zellen werden in der Region P4 dargestellt (FL1 Kanal). Ihr Prozentanteil macht 63,8% aus. Die restlichen 34,5 % sind CD21<sup>-</sup>-Zellen und werden daher in den Regionen P1 und P3 gezeigt. **Rechts:** Das Histogramm mit FL1 als x-Achse ermöglicht die Darstellung der Populationen nach Fluoreszenz-Intensität und relativer Häufigkeit, mit der eine bestimmte Intensität auftritt.

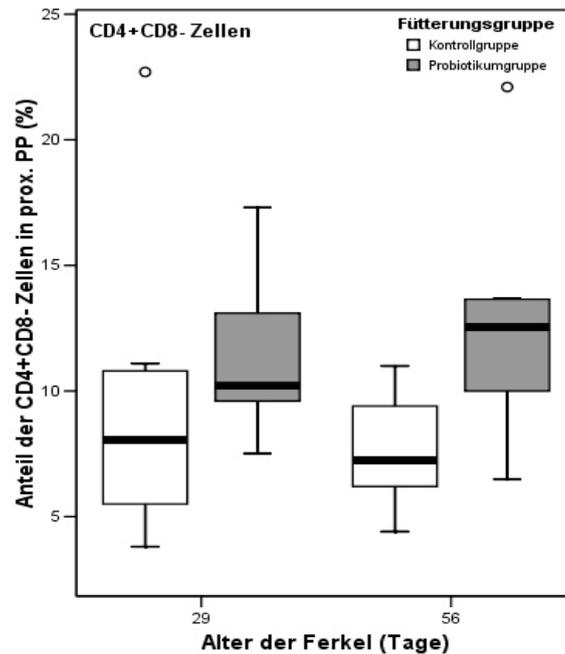
**Tabelle 4-11** Auflistung der Prozentanteile (Mittelwerte) und Standardabweichungen verschiedener Lymphozytenpopulationen in den aus jejunalen (proximalen) Peyerschen Platten gewonnenen Zellfraktion

Analysierte Zellpopulation	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)		Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)	
	29	56	29	56
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,55 ± 2,79	11,75 ± 2,62	11,33 ± 3,13	13,63 ± 4,59
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	9,23 ± 5,31	7,50 ± 2,12	11,33 ± 3,17	12,63 ± 4,56
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	20,48 ± 7,75	16,54 ± 6,13	13,32 ± 5,91	17,91 ± 6,54
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	16,31 ± 5,02	16,80 ± 6,07	12,98 ± 3,63	16,43 ± 4,49
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	11,33 ± 6,47	6,38 ± 1,71	10,14 ± 2,92	8,90 ± 3,77
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	15,14 ± 10,01	10,12 ± 4,36	7,60 ± 4,14	13,53 ± 5,54
CD1 <sup>+</sup>	78,36 ± 5,33	83,72 ± 4,09	81,14 ± 6,93	77,88 ± 11,17
CD14 <sup>+</sup>	4,43 ± 2,36	3,56 ± 1,58	3,77 ± 2,50	3,25 ± 1,73
CD21 <sup>+</sup>	58,54 ± 8,07	61,78 ± 5,35	62,51 ± 8,35	50,35 ± 13,41
CD25 <sup>+</sup>	20,68 ± 9,43	16,43 ± 7,30	17,31 ± 6,74	14,41 ± 7,23
IgA <sup>+</sup>	41,84 ± 8,23	36,37 ± 10,12	43,56 ± 14,15	31,95 ± 5,16
δγ <sup>+</sup> (TCR1)	8,23 ±4,32	9,13 ± 3,31	15,32 ± 22,14	7,48 ± 3,59
MHC I <sup>+</sup>	95,57 ± 3,80	96,61 ± 3,26	98,42 ± 0,93	93,24 ± 9,95

**4.4.1. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>-Zellen**

Während der Anteil dieser Subpopulation bei den Kontrolltieren zwischen dem 29. und 56. Lebensstag leicht abnahm, stieg er bei den probiotisch behandelten Tieren leicht an. Unabhängig vom Alter der Tiere zeigten die Tiere der Probiotikumgruppe einen signifikant höheren prozentualen Anteil an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen.

**Abb. 4. 26 A**



**Tabelle 4-12**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		9,23	11,33
	Standardabweichung		5,31	3,17
	Perzentile	25	5,40	9,40
75		10,88	13,90	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		7,50	12,63
	Standardabweichung		2,12	4,56
	Perzentile	25	6,00	9,55
75		9,53	13,68	

Abb. 4.26 B

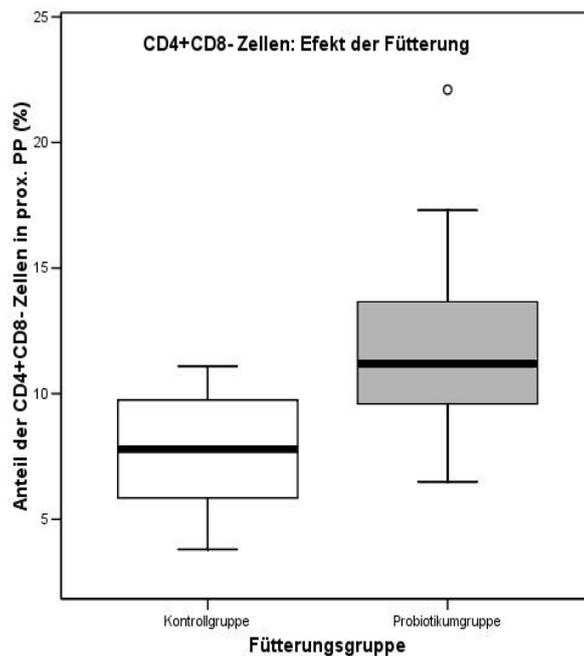


Abb. 4.26

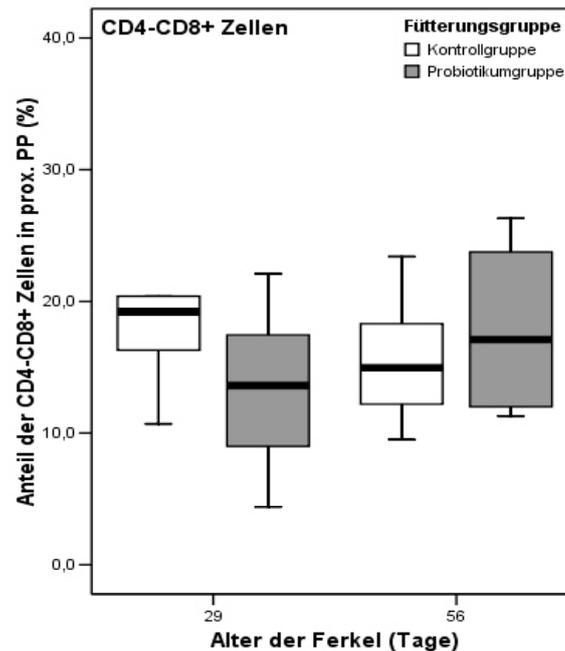
**A** Entwicklung des Anteils der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen in den aus jejunalen PP gereinigten Immunzellen in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-12 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Perzentile an.

**B** Darstellung des Fütterungseffekts auf die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Population. Die Tiere der Probiotikumgruppe hatten (unabhängig vom Alter) signifikant höhere Anteile an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen als die Kontrolltiere (p=0,013).

**4.4.2. CD4 CD8<sup>+</sup>-Zellen**

Bei den 29 Tage alten Tieren hatten die Kontrolltiere einen höheren prozentualen Anteil an CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen als die probiotischen Tiere. Dieses Verhältnis kehrte sich bei den 56 Tage alten Tieren um. Ein signifikanter Effekt der Fütterung war aber nur bei 29 Tage alten Tieren zu verzeichnen (T-Test, t(16)= -3,29, P=0,025).

**Abb. 4.27**



**Tabelle 4-13**

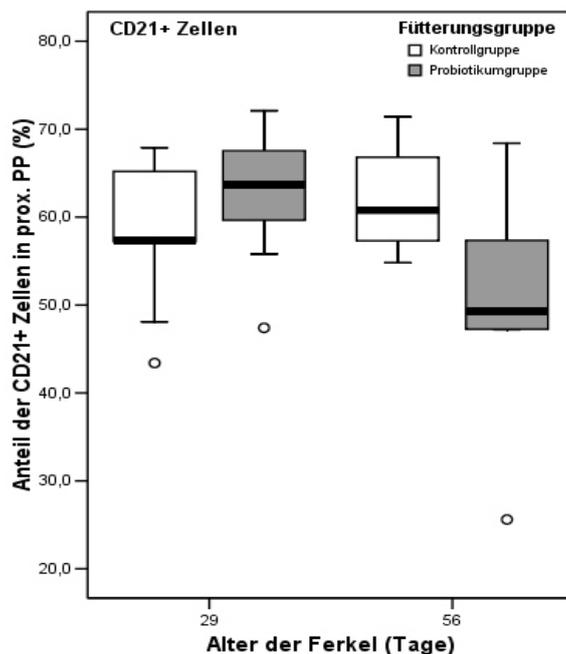
Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		20,48	13,32
	Standardabweichung		7,45	5,91
	Perzentile	25	16,05	8,10
75		23,25	17,72	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		16,54	17,91
	Standardabweichung		6,13	6,54
	Perzentile	25	12,2	11,85
75		19,57	24,22	

**Abb. 4.27** Entwicklung des Anteils der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in den aus jejunalen PP gereinigten Immunzellen in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-13 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die Perzentile an.

### 4.4.3. CD21<sup>+</sup>-Zellen

56 Tage alte Tiere der Probiotikumgruppe wiesen signifikant weniger CD21<sup>+</sup>-Zellen in den jejunalen (proximalen) PP auf als die gleichaltrigen Tiere aus der Kontrollgruppe. Am 29. Lebenstag waren die Unterschiede nicht signifikant.

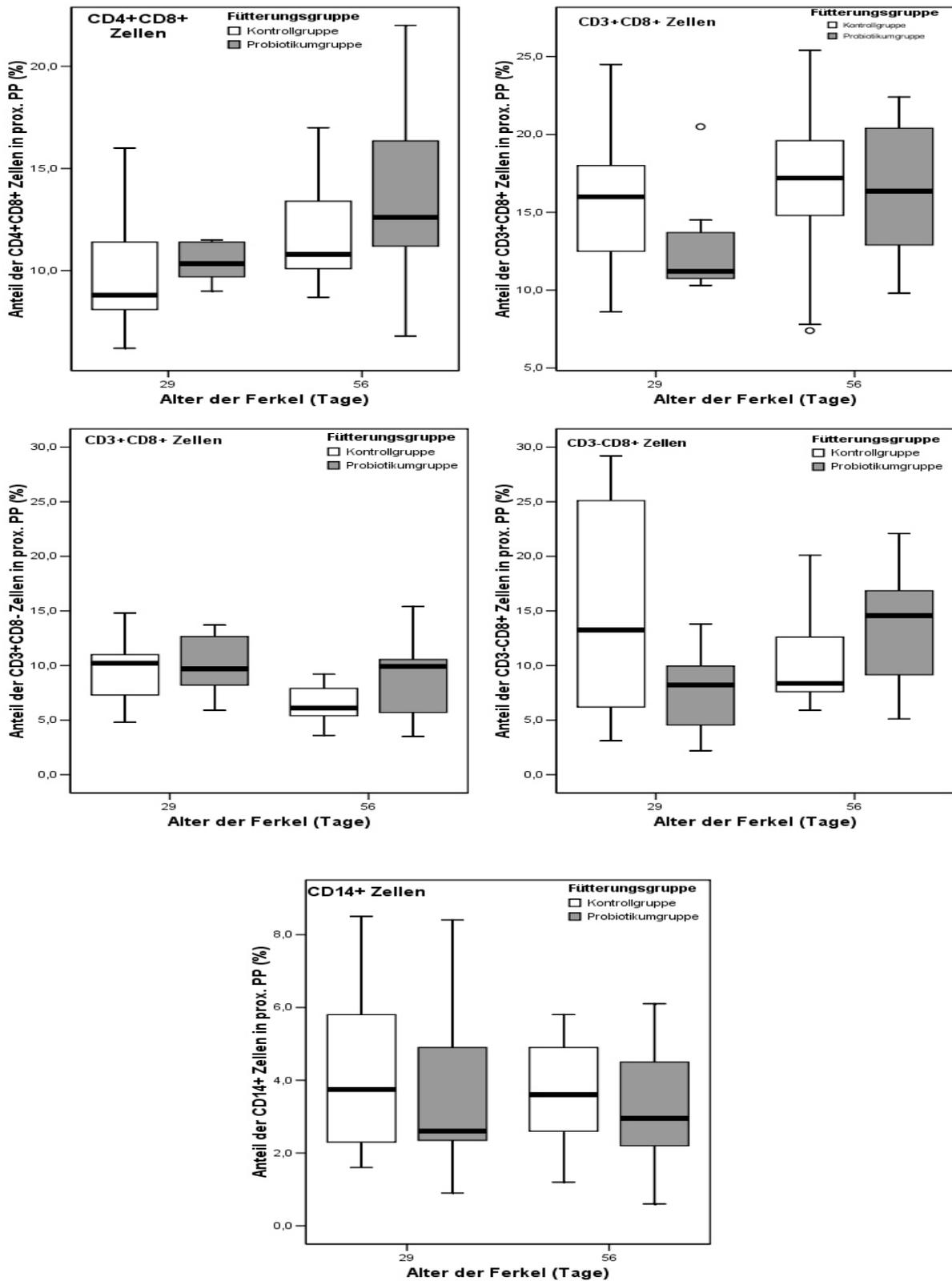
**Abb. 4.28**



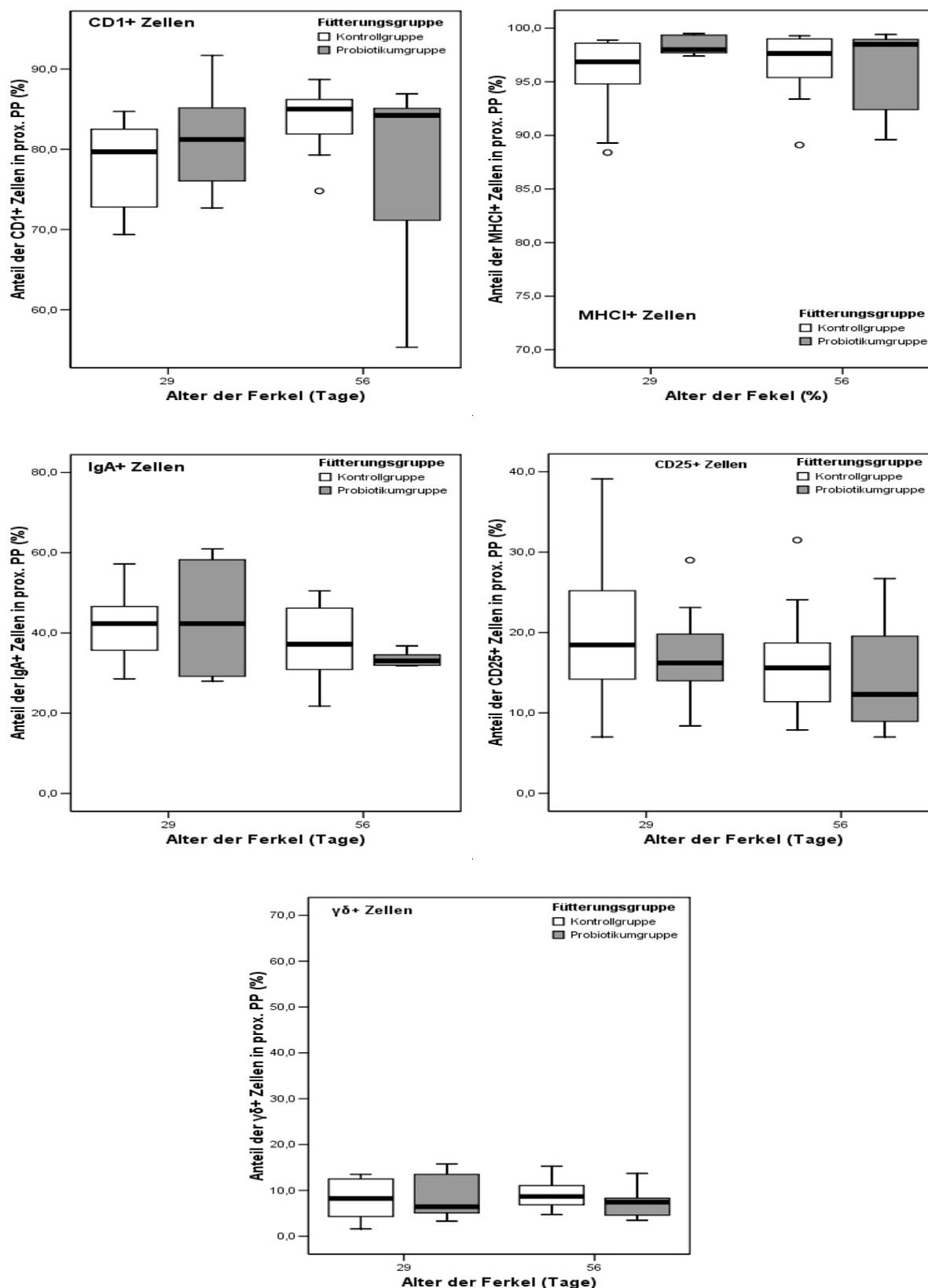
**Tabelle 4-14**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	7
		Fehlend	0	1
	Mittelwert	58,54	62,51	
	Standardabweichung	8,07	8,35	
	Perzentile	25	54,92	55,80
		75	65,62	68,10
56 Tage	N	Gültig	10	7
		Fehlend	0	1
	Mittelwert	61,78	50,35	
	Standardabweichung	5,35	13,41	
	Perzentile	25	57,27	47,20
		75	67,02	60,80

**Abb.4.28** Entwicklung des Anteils der CD21<sup>+</sup>-Zellen in den aus jejunalen PP gereinigten Lymphozyten in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-14 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die Perzentile an.



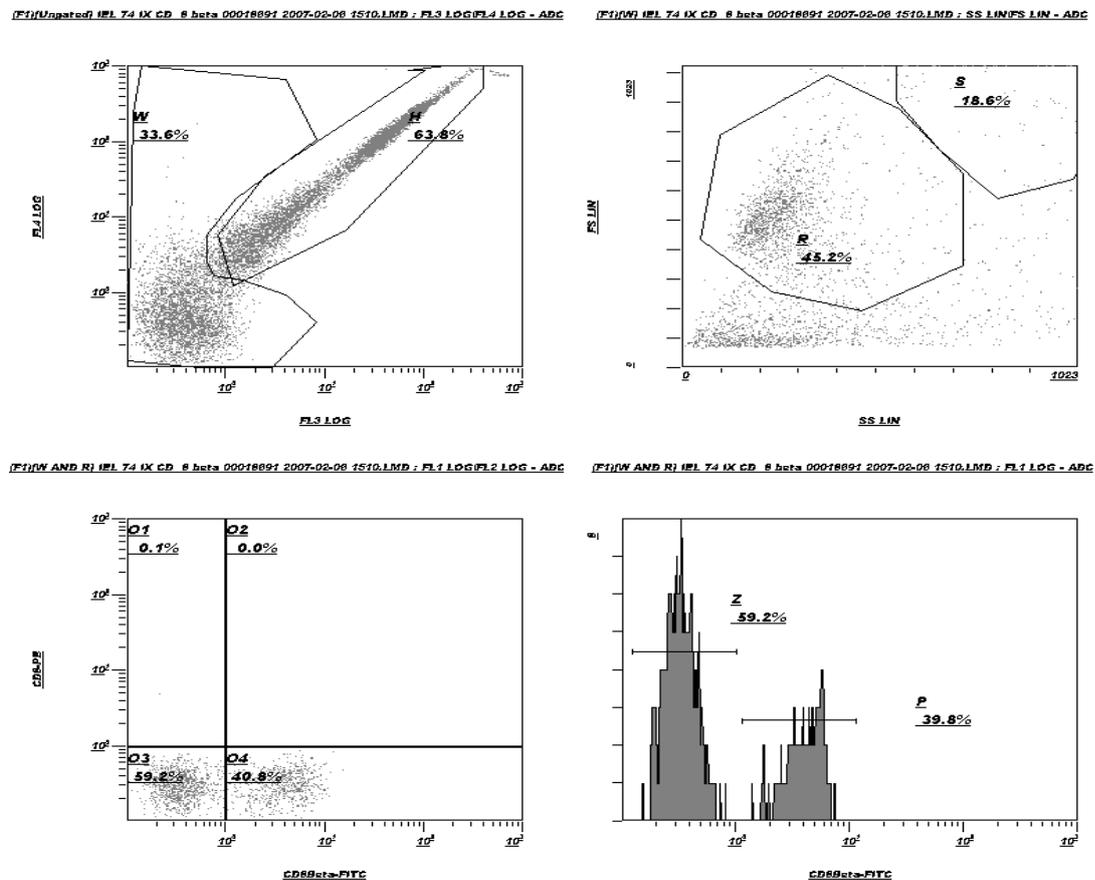
**Abb. 4.29 A** Altersabhängige Prozentanteile verschiedener Lymphozytenpopulationen in den aus den proximalen Peyerschen Platten gereinigten Zellfraktionen bei probiotisch behandelten Ferkeln (graue Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.



**Abb. 4.29 B** Altersabhängige Prozentanteile verschiedener Immunzellpopulationen in den aus den proximalen Peyerschen Platten gereinigten Zellfraktionen bei probiotisch behandelten Ferkeln (graue Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

**4.5. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen an intraepithelialen Lymphozyten (IEL)**

In den aus dem Jejunum gereinigten Zellfraktionen wurden die prozentualen Anteile von zehn ausgewählten Lymphozytenpopulationen bestimmt: CD1<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD8β<sup>+</sup>-Zellen, CD11<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD25<sup>+</sup>-Zellen, CD45<sup>+</sup>-Zellen und γδ<sup>+</sup>-T-Zellen. Bei der Auswertung der Daten wurden die toten Zellen und die Zelltrümmer nicht in die Analyse einbezogen. Wie die Analysefenster gesetzt wurden, soll anhand der CD8β<sup>+</sup>-Zellen erörtert werden.



**Abb. 4.30**

**Oben links:** Mit Propidiumjodid gefärbten toten Zellen befinden sich in Region H, (63,8%). In die weitere Analyse gingen nur lebende Zellen (Region w, 33,6%) ein.

**Oben rechts:** Ein Analysefenster für Lymphozyten (Region R) und ein Analysefenster für die Epithelzellen (Region G) werden so festgelegt, dass Zelltrümmer nicht mitberücksichtigt werden.

**Unten links:** In die Analyse der im Epithel befindlichen Lymphozyten gingen nur Zellen aus der Region R ein. Epithelzellen (Region G) wurden bei der Analyse der intraepithelialen Lymphozyten nicht berücksichtigt. Die CD8β<sup>+</sup>-Zellen strahlen in FL1 (FITC). Sie bilden einen Anteil von 40,8% innerhalb der Lymphozytenregion (R). Die restlichen 59,2 % der Region R sind CD8β<sup>-</sup>-Zellen. Sie werden daher im Fluoreszenz-Dot-Plot in der Region O3 und O1 dargestellt.

**Unten rechts:** Das Histogramm mit FL1 als x-Achse ermöglicht die Darstellung der Populationen nach Fluoreszenz-Intensität und relativer Häufigkeit, mit der eine bestimmte Intensität auftritt.

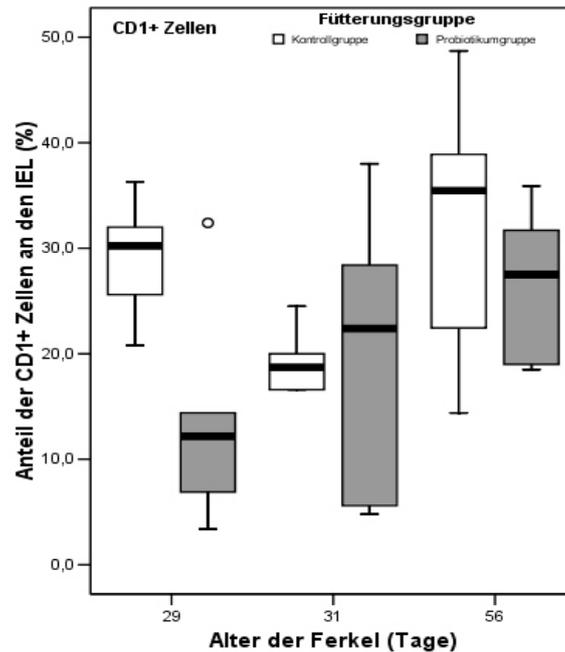
**Tabelle 4-15** Auflistung der Prozentanteile (Mittelwerte) und Standardabweichungen der gemessenen Lymphozytenpopulationen im Jejunum-Epithel (IEL)

Analysierte Zellpopulation	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)			Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)		
	29	31	56	29	31	56
CD1 <sup>+</sup>	29,20 ± 5,37	16,81 ± 7,55	32,08 ± 11,68	13,58 ± 10,08	20,26 ± 13,04	26,68 ± 7,03
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	19,10 ± 12,94	12,83 ± 4,29	22,98 ± 11,58	6,63 ± 4,22	12,27 ± 6,95	18,66 ± 6,28
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	24,19 ± 8,89	27,37 ± 10,66	19,58 ± 7,22	16,06 ± 3,85	17,35 ± 6,31	19,25 ± 7,42
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	5,32 ± 5,60	4,92 ± 2,47	6,47 ± 6,70	4,95 ± 8,27	4,48 ± 5,54	5,01 ± 2,91
CD8 β <sup>+</sup>	21,75 ± 8,84	11,86 ± 3,29	24,20 ± 8,31	4,58 ± 4,80	10,61 ± 7,92	20,40 ± 4,54
CD11 <sup>+</sup>	2,72 ± 2,0	1,42 ± 0,67	1,38 ± 0,99	2,63 ± 0,87	2,26 ± 1,98	0,52 ± 0,24
CD16 <sup>+</sup>	18,76 ± 7,15	20,06 ± 7,28	16,1 ± 4,16	15,85 ± 4,53	19,73 ± 13,11	16,90 ± 8,31
CD25 <sup>+</sup>	3,07 ± 1,59	2,22 ± 1,41	1,79 ± 0,99	4,13 ± 2,07	3,36 ± 2,28	1,67 ± 0,80
CD45 <sup>+</sup>	45,55 ± 22,01	41,91 ± 12,81	50,16 ± 11,59	25,30 ± 12,93	34,95 ± 23,11	41,60 ± 10,51
δγ <sup>+</sup> (TCR1)	13,24 ± 8,16	16,37 ± 9,77	6,43 ± 7,53	6,62 ± 4,63	9,63 ± 5,98	6,08 ± 1,88

**4.5.1. CD1<sup>+</sup>-Zellen**

Ein Effekt der Fütterung auf diese Population der Darmzellen war nur tendenziell zu verzeichnen (p=0,076). Deutlicher (signifikant) war der Unterschied zwischen den Altersgruppen. Insbesondere zeigten die 31 Tage alten Tiere unabhängig von der Fütterung einen signifikant niedrigeren Wert als die 56 Tage alten Tiere.

**Abb. 4.31 A**



**Tabelle 4-16**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	6	6
		Fehlend	4	4
	Mittelwert	29,20	13,58	
	Standardabweichung	5,37	10,08	
	Perzentile	25	24,40	6,02
		75	33,07	18,90
31 Tage	N	Gültig	6	6
		Fehlend	4	4
	Mittelwert	16,81	20,26	
	Standardabweichung	7,55	13,04	
	Perzentile	25	13,05	5,40
		75	21,12	30,80
56 Tage	N	Gültig	8	6
		Fehlend	2	2
	Mittelwert	32,08	26,68	
	Standardabweichung	11,68	7,03	
	Perzentile	25	19,82	18,87
		75	39,85	32,75

Abb. 4.31 B

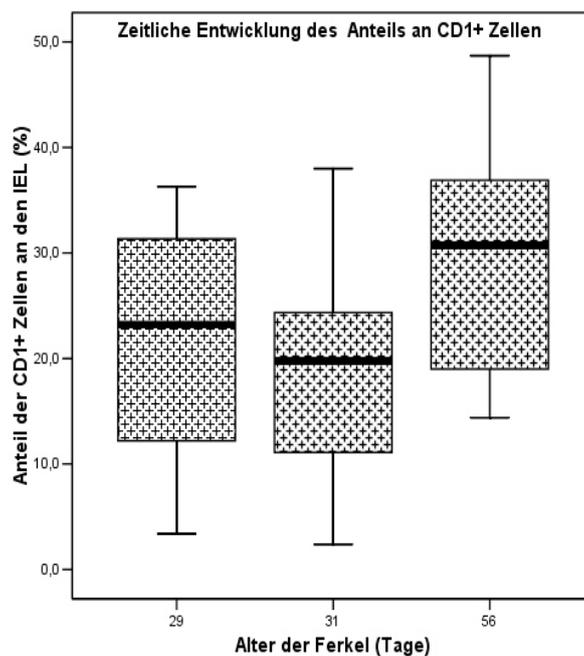


Abb. 4.31

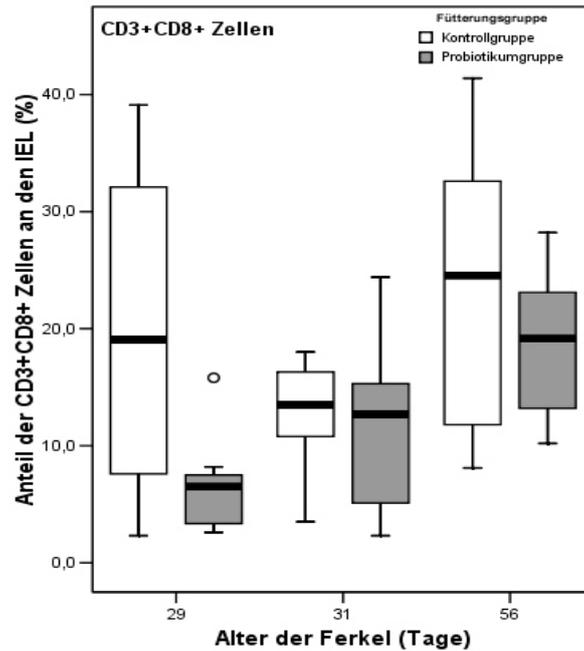
**A** Entwicklung des Anteils der CD1<sup>+</sup>-Zellen an den intraepithelialen Lymphozyten in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-15 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

**B** Zeitliche Entwicklung der CD1<sup>+</sup>-Zellen. Unabhängig von der Fütterung hatten 31 Tage alte Tiere mehr CD1<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der IEL-Fraktion als 56 Tage alte Tiere (Tamahan, p=0,036).

**4.5.2. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen**

Bei allen Altersgruppen hatten die probiotisch behandelten Tiere signifikant niedrigere Anteile an CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen als die Kontrolltiere (p=0,04). Vergleicht man die Altersklassen miteinander, so stellt man fest, dass 56 Tage alte Tiere unabhängig von der Fütterung signifikant mehr CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen als 29 Tage und 31 Tage alte Tiere hatten.

**Abb. 4.32 A**



**Tabelle 4-17**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	2
	Mittelwert		19,10	6,63
	Standardabweichung		12,94	4,22
	Perzentile	25	6,57	3,07
75		32,32	7,85	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		12,83	11,27
	Standardabweichung		4,29	6,95
	Perzentile	25	10,32	4,92
75		16,45	15,37	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		22,98	18,66
	Standardabweichung		11,58	6,28
	Perzentile	25	11,02	12,75
75		32,92	24,15	

Abb. 4.32 B

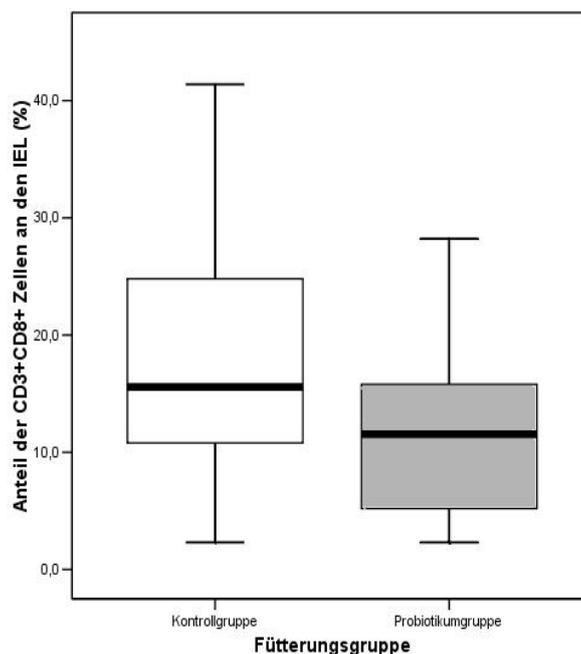


Abb. 4.32 C

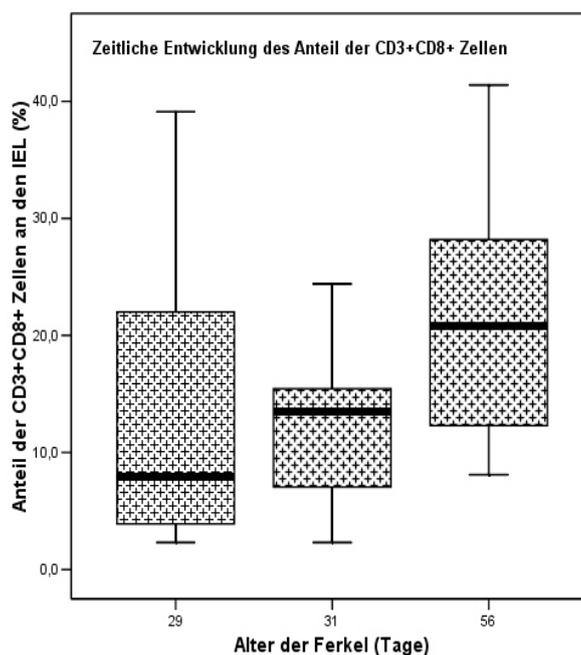


Abb. 4-32

**A** Entwicklung des Anteils der  $CD3^+CD8^+$ -Lymphozyten an den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

**B** Darstellung des Fütterungseffekts ( $p=0,036$ ).

**C** 56 Tage alte Tiere hatten signifikant mehr  $CD3^+CD8^+$ -IEL als 29 Tage alte Tiere (Tamahan,  $p=0,032$ ) und signifikant mehr als 31 Tage alte Tiere (Tamahan  $p= 0,003$ ).

### 4.5.3. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen

Die Ferkel der Probiotikumgruppe hatten zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant niedrigere Werte als die der Kontrollgruppe. (p=0,056). Der prozentuale Anteil dieser Population nahm bei den Kontrolltieren mit dem Alter tendenziell ab, während er bei den Ferkeln der Probiotikumgruppe unverändert blieb.

Abb. 4. 33 A

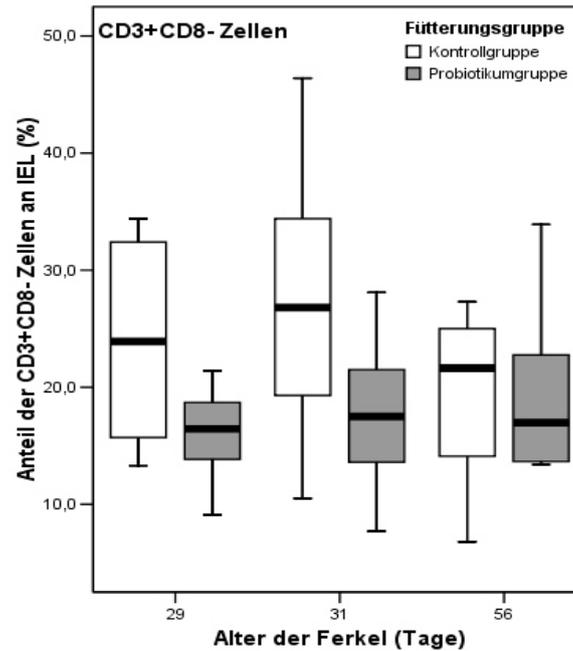


Tabelle 4-18

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	2
	Mittelwert		24,19	16,06
	Standardabweichung		8,89	3,85
	Perzentile	25	15,37	13,47
75		32,77	19,10	
31 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		27,37	17,35
	Standardabweichung		10,66	6,316
	Perzentile	25	18,62	12,65
75		34,90	22,20	
56 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		19,58	19,25
	Standardabweichung		7,22	7,42
	Perzentile	25	12,80	13,62
75		25,27	24,97	

Abb. 4.33 B

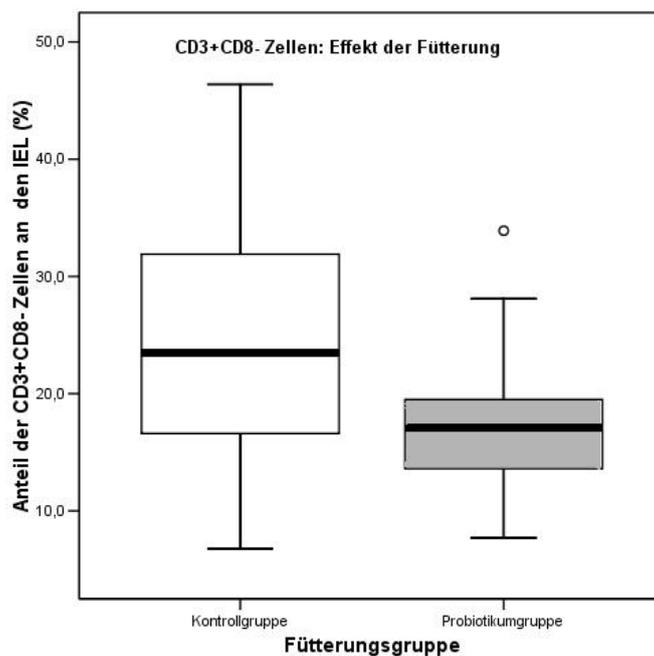


Abb. 4.33

A Entwicklung des Anteils der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen an den intraepithelialen Lymphozyten (IEL) in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und in der Kontrollgruppe (weiße Balken).

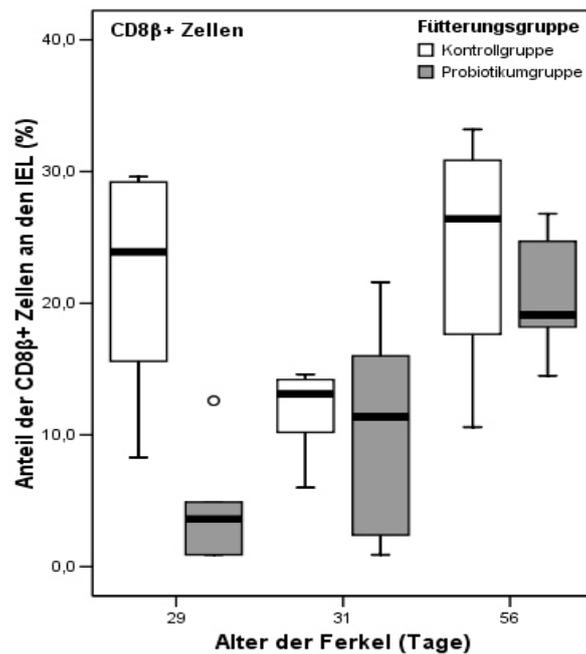
Die Tabelle 4-18 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

B Darstellung des Fütterungseffekts (p=0,056)

**4.5.4. CD8 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen**

Bei den probiotisch behandelten Tieren war der Prozentsatz dieser Population unabhängig vom Alter der Tiere signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren (p=0,001). Dieser Unterschied war insbesondere am 29. Lebenstag zu beobachten. Vergleicht man die Werte der Altersklassen miteinander, ohne Berücksichtigung der Fütterung, so stellt man fest, dass 56 Tage alte Tiere signifikant höhere Werte haben als 31 Tage alte Tiere (Tamahan, p=0,001).

**Abb. 4.34 A**



**Tabelle 4-19**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	6	5
		Fehlend	4	5
	Mittelwert		21,75	4,58
	Standardabweichung		8,84	4,80
	Perzentile	25	13,77	0,90
75		29,30	8,75	
31 Tage	N	Gültig	6	6
		Fehlend	4	4
	Mittelwert		11,86	10,61
	Standardabweichung		3,29	7,92
	Perzentile	25	9,15	2,02
75		14,30	17,40	
56 Tage	N	Gültig	8	6
		Fehlend	2	2
	Mittelwert		24,20	20,40
	Standardabweichung		8,31	4,54
	Perzentile	25	15,82	17,27
75		31,57	25,22	

Abb. 4.34 B

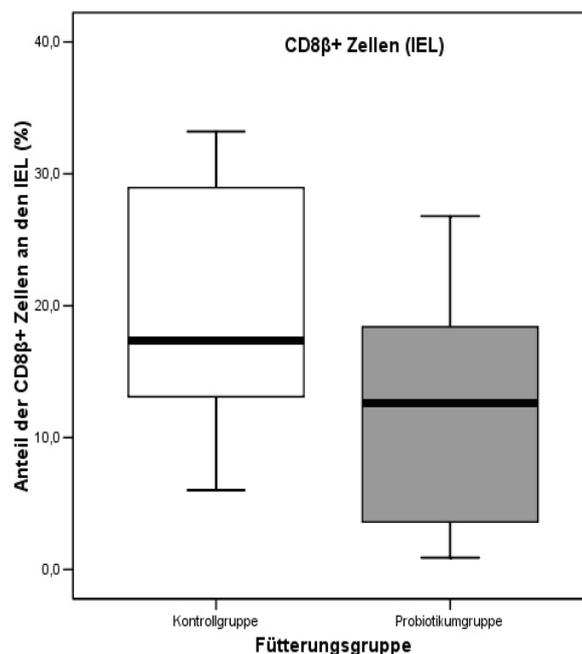


Abb. 4. 34 C

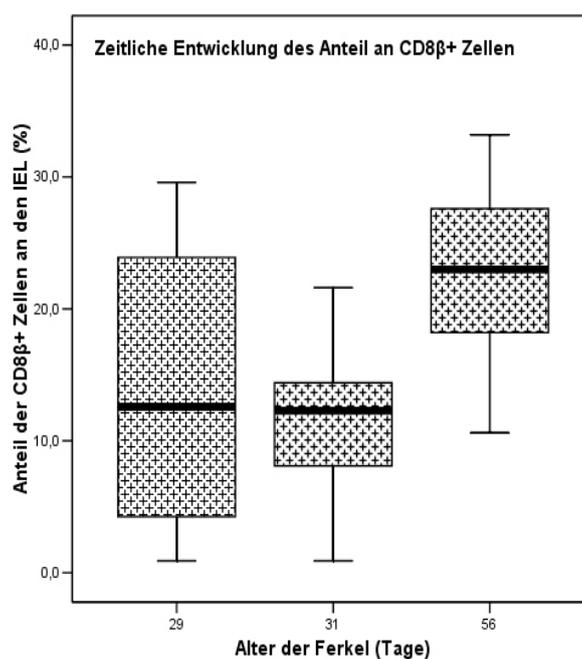


Abb. 4-34

**A.** Entwicklung des Anteils der CD8β+-Zellen an den IEL der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-19 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

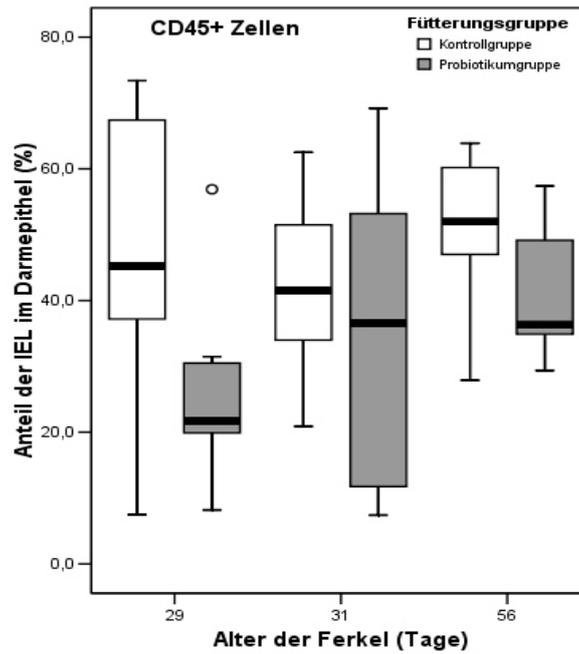
**B.** Darstellung des Fütterungseffekts ( $p=0,001$ ),

**C.** Darstellung der zeitlichen Entwicklung: Die 31 Tage alten Tiere hatten signifikant weniger von diesen Zellen als 56 Tage alte Tiere (Tamahan  $P= 0,001$ )

**4.5.5. CD45<sup>+</sup>-Zellen**

In der Probiotikumgruppe nahm der Anteil der IEL (CD45<sup>+</sup>-Zellen) im Epithel zwischen dem 29. Lebenstag und dem 56. Lebenstag zu. In dieser Zeit hatten die Kontrolltiere signifikant höhere Anteile an Immunzellen im Epithel als die probiotisch behandelten Tiere (p=0,037).

**Abb. 4.35 A**



**Tabelle 4-20**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	10	10
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		45,55	25,30
	Standardabweichung		22,01	12,93
	Perzentile	25	31,82	19,22
75		67,50	30,75	
31 Tage	N	Gültig	10	8
		Fehlend	0	2
	Mittelwert		41,91	34,95
	Standardabweichung		12,81	23,11
	Perzentile	25	32,27	10,37
75		52,40	55,20	
56 Tage	N	Gültig	10	7
		Fehlend	0	1
	Mittelwert		50,16	41,60
	Standardabweichung		11,59	10,51
	Perzentile	25	43,75	34,80
75		60,32	53,20	

Abb. 4.35 B

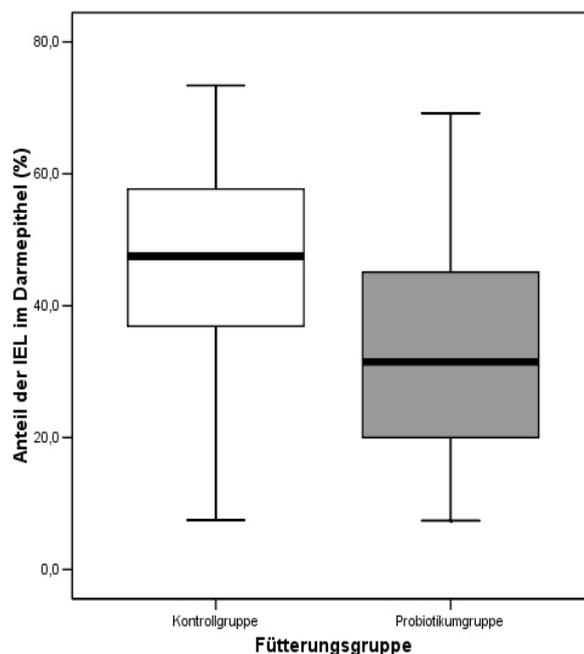


Abb. 4-35 C

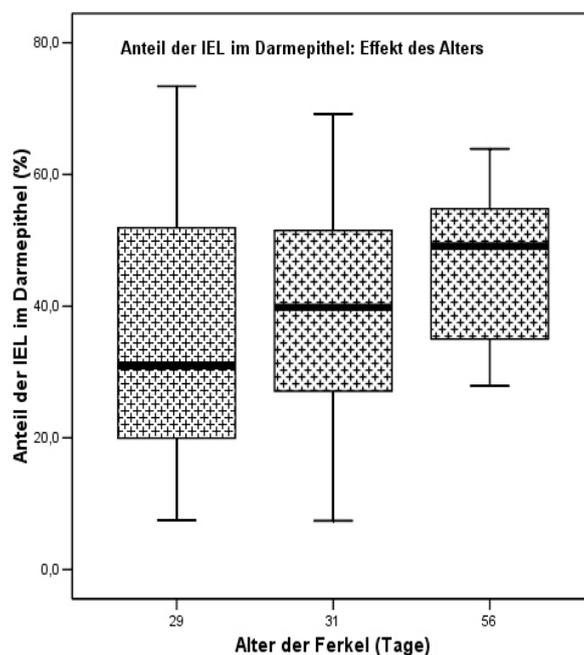
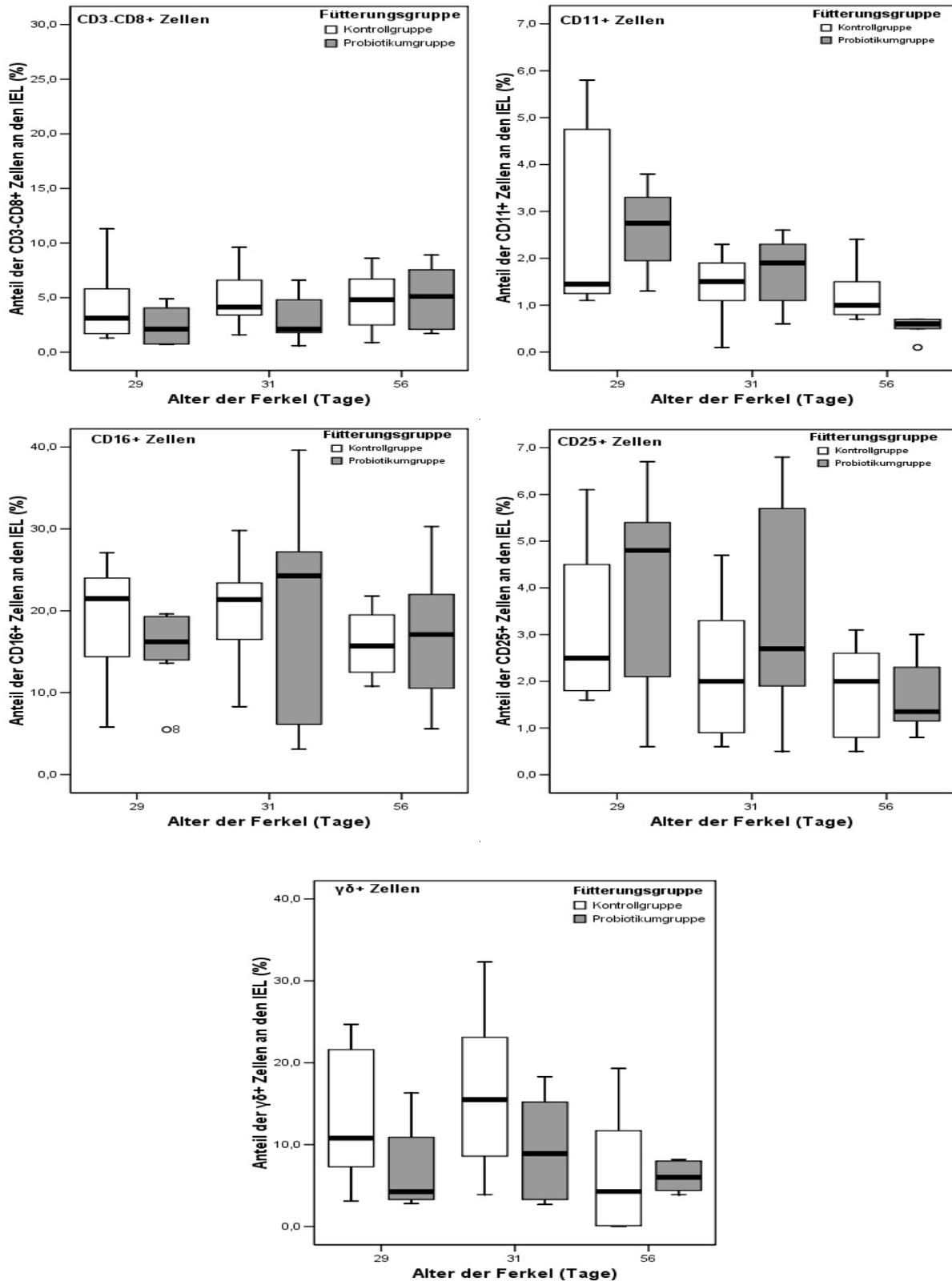


Abb. 4.35

A. Anteil der IEL (CD45<sup>+</sup>-Zellen) im jejunalen Epithel in der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

B. Darstellung des Fütterungseffekts (p=0,037).

C. Darstellung der Altersabhängigkeit: Die 31 Tage alten Tiere hatten signifikant weniger von diesen Zellen als 56 Tage alte Tiere (Tamahan P= 0,001).

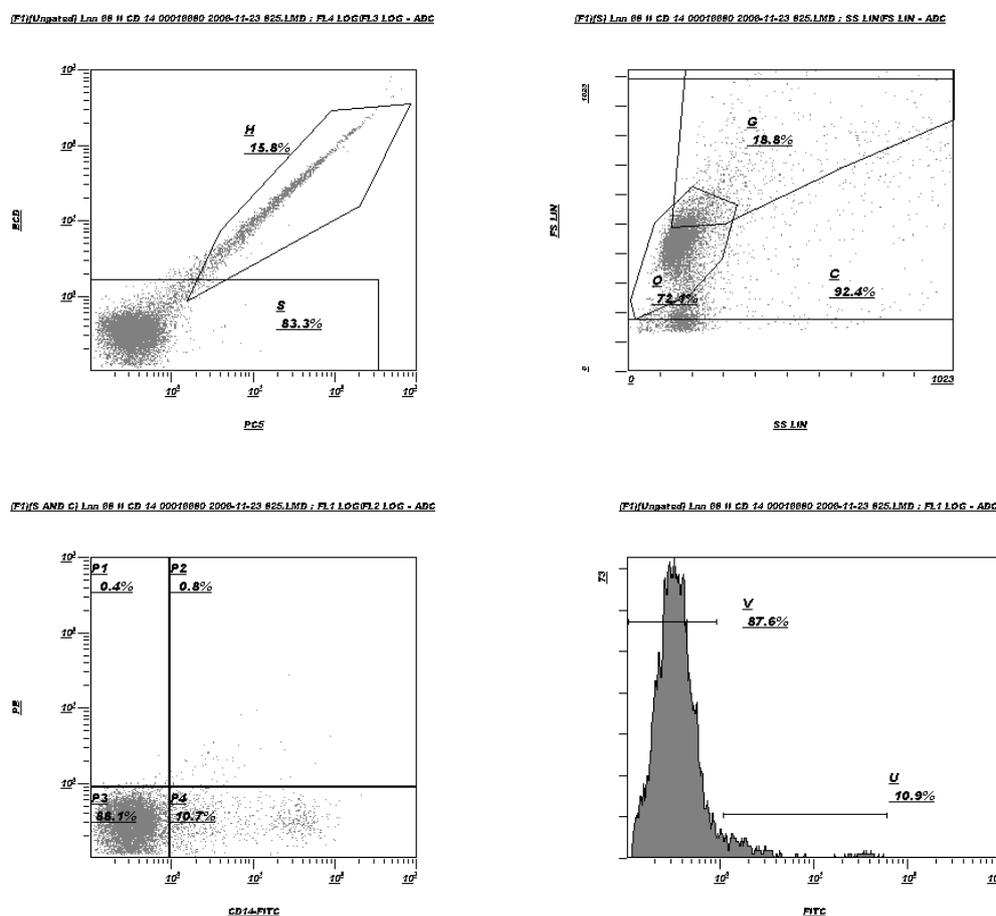


**Abb. 4.36** Altersabhängige Anteile ausgewählter Lymphozytenpopulationen in der aus dem proximalen Epithel gereinigten Zellfraktion bei probiotisch behandelten Tieren (graue Balken) und bei Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

#### 4.6. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von Immunzellen aus den mesenterialen Lymphknoten

Die Prozentsätze der folgende Immunzellpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen,  $\gamma\delta^+$ -Zellen, CD14<sup>+</sup>-Zellen, CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD21<sup>+</sup>-Zellen und CD25<sup>+</sup>-Zellen.

Zur Auswertung der Daten wurden Analysefenster so festgelegt, dass weder Zelltrümmer, noch die mit Propidiumjodid gefärbten toten Zellen in die Analyse einbezogen wurden. Wie die Analysefenster gewählt wurden, soll am Beispiel der Auswertung von CD14<sup>+</sup>-Zellen erläutert werden.



**Abb. 4.37.** Auswertung der durchflusszytometrischen Daten der aus den Lymphknotendaten isolierten Lymphozyten.

**Oben links:** Mit Propidiumjodid gefärbte tote Zellen befinden sich in der Region H (15,8%). In die weitere Analyse gingen nur lebende Zellen aus der Region S ein (83,3%).

**Oben rechts:** Analysiert werden alle Zellen in Region C, so dass Zelltrümmer ausgeschlossen werden

**Unten links:** Dot-Plot Darstellung FL1 vs FL2. CD14<sup>+</sup>-Zellen werden in den Regionen P4 und P2 dargestellt (mit FITC gefärbt). Ihr Prozentsatz macht 10,7% aus. Die restlichen 88,1 % sind CD14<sup>-</sup>-Zellen und werden daher in den Regionen P3 und P1 dargestellt.

**Unten rechts:** ein Histogramm mit FL1 als x-Achse.

## Ergebnisse

---

**Tabelle 4-21** Prozentanteile (Mittelwerte) und Standardabweichungen ausgewählter Immunzellpopulationen in der aus den mesenterialen Lymphknoten gereinigten Zellfraktion (Organproben aus 31 Tage alten Ferkeln)

Analysierte Zellpopulation	Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	9,2 ± 2,38	9,0 ± 2,93
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	30,23 ± 12,93	39,15 ± 5,94
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	27,53 ± 8,12	24,17 ± 8,83
CD14 <sup>+</sup>	10,54 ± 6,16	6,06 ± 3,07
CD16 <sup>+</sup>	22,41 ± 10,36	15,27 ± 8,63
CD21 <sup>+</sup>	22,33 ± 9,87	20,94 ± 10,68
CD25 <sup>+</sup>	14,82 ± 7,79	11,2 ± 4,61
γδ <sup>+</sup> (TCR1)	10,05 ± 5,28	8,60 ± 0,00

#### 4.6.1. CD14<sup>+</sup>-Zellen

Die probiotisch behandelten Tiere hatten signifikant weniger CD14<sup>+</sup>-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten als Kontrolltiere. (p=0,01)

Abb. 4.38

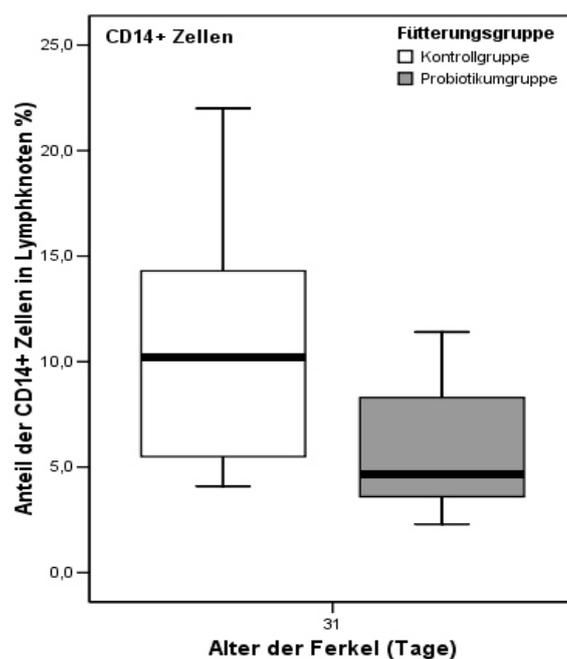


Tabelle 4-22

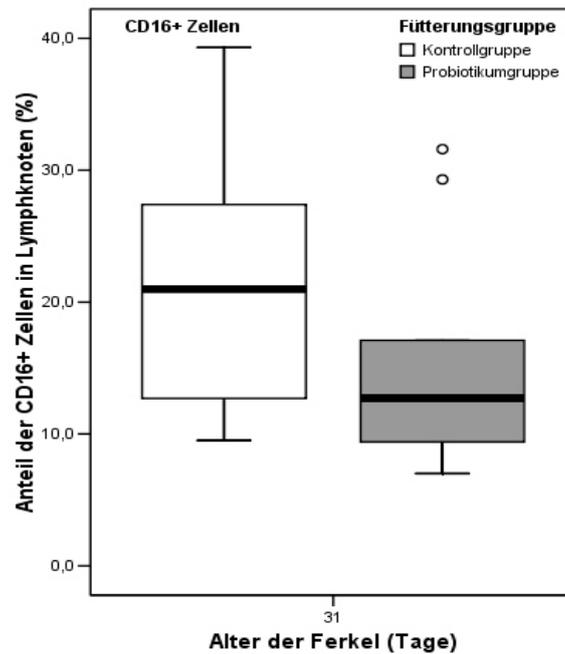
Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
31 Tage	N	Gültig	9	10
		Fehlend	1	0
	Mittelwert		10,54	6,06
	Standardabweichung		6,16	3,07
	Perzentile	25	5,30	3,57
75		15,65	8,65	

**Abb. 4.38** Anteil der CD14<sup>+</sup>-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-22 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichungen und die Perzentile an.

**4.6.2. CD16<sup>+</sup>- Zellen**

Die Tiere der Probiotikumgruppe hatten signifikant weniger CD16<sup>+</sup>-Zellen als Tiere der Kontrollgruppe (p<0,001).

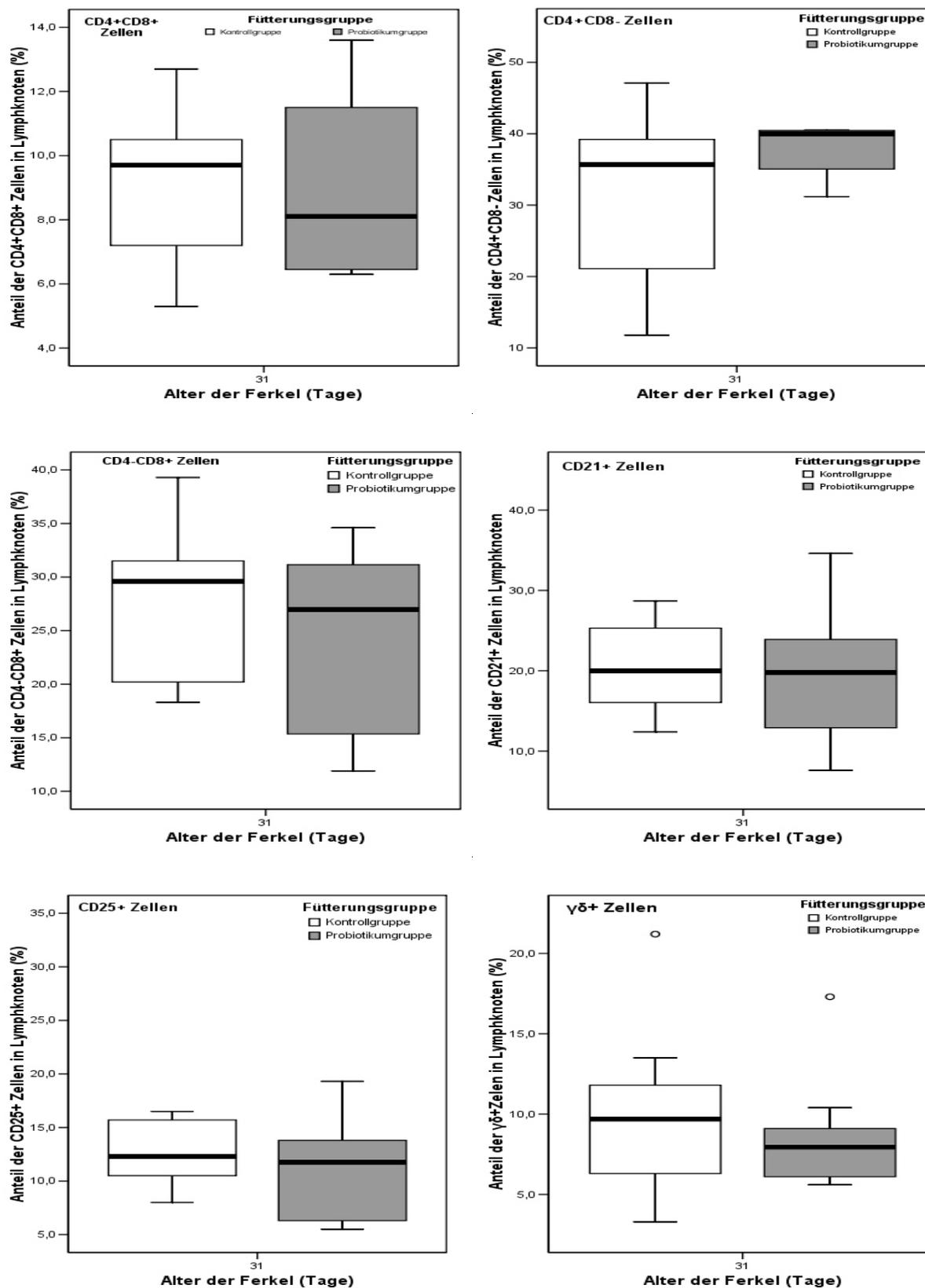
**Abb. 4-39**



**Tabelle 4-23**

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
31 Tage	N	Gültig	9	10
		Fehlend	1	0
	Mittelwert		22,41	15,27
	Standardabweichung		10,36	8,63
	Perzentile	25	12,50	9,05
75		31,60	20,15	

**Abb. 4.39** Anteil der CD16<sup>+</sup>-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-23 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie die Perzentile an.

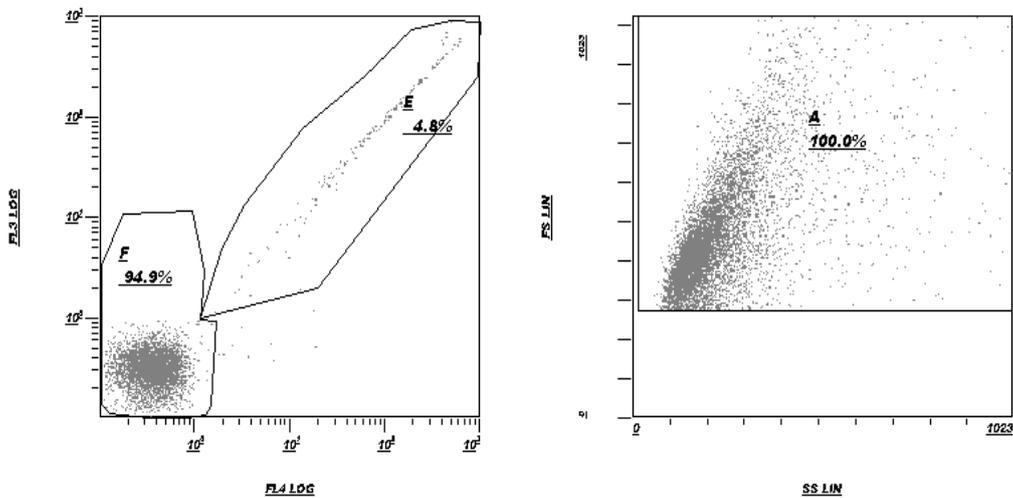


**Abb. 4.40** Altersabhängiger prozentualer Anteil der analysierten Immunzellsubpopulationen in der aus mesenterialen Lymphknoten gereinigten Zellfraktion bei probiotisch behandelten Tieren (graue Balken) und Kontrollieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

#### 4.7. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von Immunzellen aus den Tonsillen

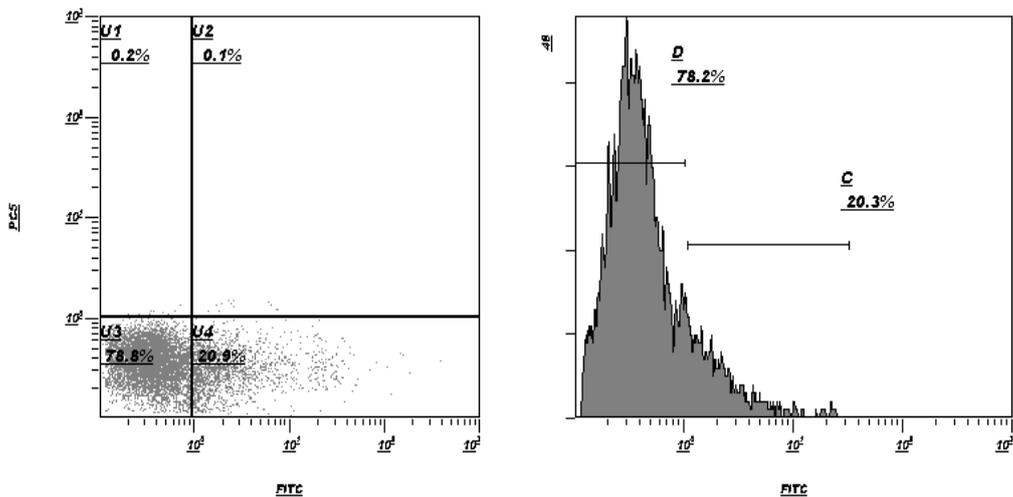
Die Prozentsätze folgender Immunzellsubpopulationen wurden bestimmt: CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, TCR1<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>-Zellen, CD14<sup>+</sup>-Zellen und CD21<sup>+</sup>-Zellen. Zur Auswertung der Rohdaten der Durchflußzytometrie wurden nur lebende Zellen berücksichtigt. Tote Zellen (mit Propidiumjodid gefärbt) und Zelltrümmer wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Das folgende Beispiel (TCR1<sup>+</sup>-Zellen) soll zeigen, wie die Analysefenster festgelegt wurden.

Fl1(A) Tonsil. T4 | Gam delta 00017393 2007-01-10 1095.LMD : FL4 LOG FL3 LOG - ADC Fl1(A) AND Fl Tonsil. T4 | Gam delta 00017393 2007-01-10 1095.LMD : SS LINFS LIN - ADC



Fl1(A) AND Fl Tonsil. T4 | Gam delta 00017393 2007-01-10 1095.LMD : FL1 LOG FL4 LOG - AE

Fl1(A) Tonsil. T4 | Gam delta 00017393 2007-01-10 1095.LMD : FL1 LOG - ADC



**Abb. 4.41** Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen von Immunzellen aus den Tonsillen . **Oben links:** Tote Zellen (mit Propidiumjodid gefärbt) befinden sich in der Region E (4,8%). In die weitere Analyse gingen nur lebende Zellen ein (Region F, 93,9%). **Oben rechts:** Ein Analysefenster für Lymphozyten (Region A). **Unten links** Dot-Plot-Darstellung FL1 vs FL2. TCR1<sup>+</sup>-Zellen (γδ-T-Zellen) werden in der Region U4 dargestellt (mit FITC angefärbt), ihr Prozentsatz beträgt 20,9. Die restlichen 78,8% sind TCR1<sup>-</sup> Zellen und werden daher in der Region U3 gezeigt. **Unten rechts:** ein Histogramm mit FL1 als x-Achse

**Tabelle 4-24** Prozentanteile (Mittelwerte) und Standardabweichungen ausgewählter Immunzellpopulationen in der aus Tonsillen gereinigten Zellfraktion

Analysierte Zellpopulation	Kontrollgruppe (Alter in Tagen)			Probiotikumgruppe (Alter in Tagen)		
	29	31	56	29	31	56
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,4 ± 0,14	0,3 ± 0,21	0,14 ± 0,21	1,03 ± 1,28	0,87 ± 0,96	0,25 ± 0,70
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	10,3 ± 0,42	4,45 ± 1,45	4,45 ± 1,45	5,15 ± 2,28	3,17 ± 0,78	9,65 ± 2,05
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	2,9 ± 0,28	3,53 ± 1,82	3,53 ± 1,82	6,20 ± 9,76	3,55 ± 3,07	2,15 ± 0,21
TCR1 <sup>+</sup> (δγ T-Zellen)	3,15 ± 0,77	3,02 ± 2,84	3,02 ± 2,84	8,67 ± 9,76	12,17 ± 10,17	3,70 ± 1,55
CD4 <sup>+</sup>	30,05 ± 3,46	12,4 ± 2,64	12,4 ± 2,64	18,47 ± 3,42	19,50 ± 5,42	28,75 ± 1,62
CD14 <sup>+</sup>	1,55 ± 0,21	3,40 ± 1,60	3,40 ± 1,60	8,90 ± 9,17	5,85 ± 4,71	1,20 ± 0,14
CD21 <sup>+</sup>	61,50 ± 00	64,52 ± 4,68	64,52 ± 4,68	52,02 ± 6,16	68,77 ± 2,99	68,45 ± 4,73

4.7.1. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen

Die Probiotikumgruppe hatte tendenziell mehr CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in den Tonsillen (p=0,07)

Abb. 4-42 A

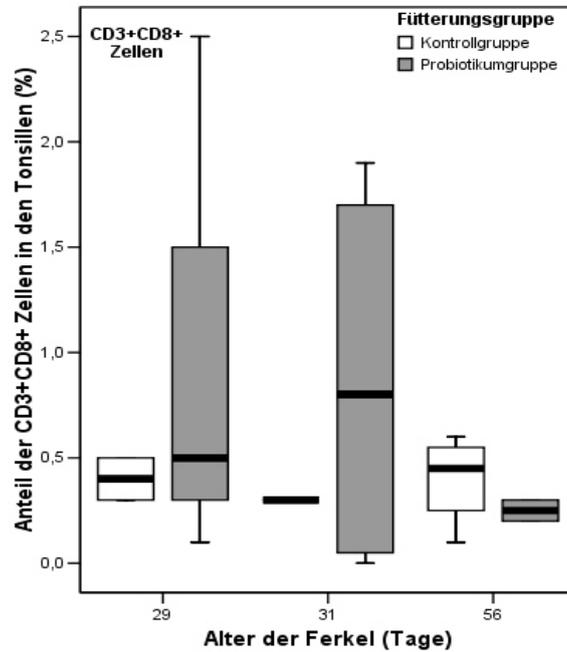


Tabelle 4-25

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	2	3
		Fehlend	0	1
	Mittelwert		0,40	1,03
	Standardabweichung		0,14	1,28
	Perzentile	25	0,30	,10
75		0,50	2,50	
31 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		0,30	0,87
	Standardabweichung		0,00	0,96
	Perzentile	25	0,30	0,02
75		0,30	1,80	
56 Tage	N	Gültig	4	2
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		0,40	0,25
	Standardabweichung		0,21	0,07
	Perzentile	25	0,17	0,20
75		0,57	0,30	

Abb. 4.42 B

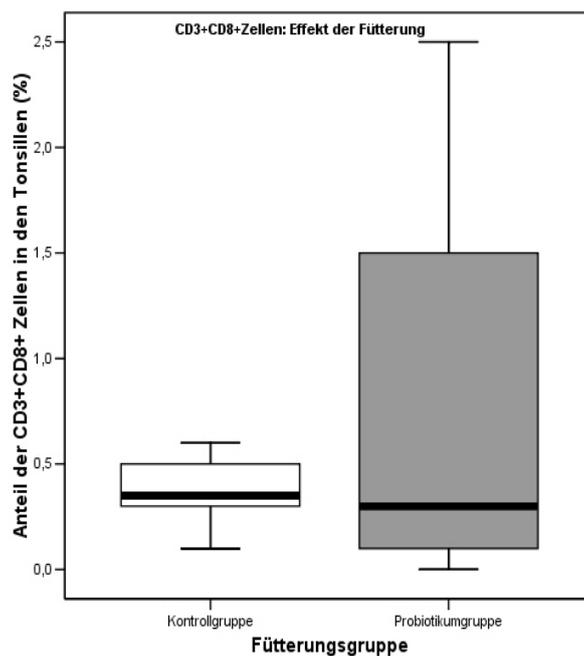


Abb. 4.42

**A** Entwicklung des Anteils der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen in Tonsillen der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-25 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte und Standardabweichungen an.

**B** Darstellung des Fütterungseffekts(p=0,07).

4.7.2. CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>-Zellen

Der Effekt der Fütterung war bei den 29 Tage alten und 56 Tage alten Ferkeln signifikant. Bei den 29 Tage alten Tieren hatten die probiotisch behandelten Tiere signifikant weniger CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen (p=0,041), bei den 56 Tage alten Tieren hatten die probiotisch behandelten Tiere signifikant mehr von diesen Zellen (p=0,008).

Abb. 4.43

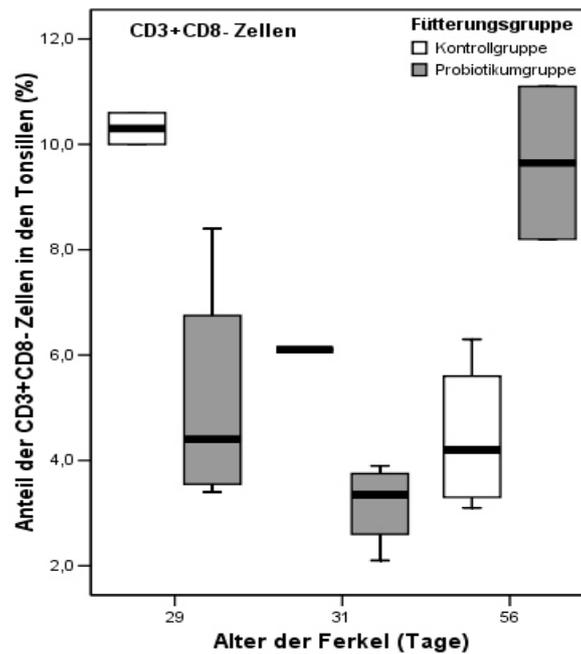


Tabelle 4-26

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		10,30	5,15
	Standardabweichung		,424	2,28
	Perzentile	25	10,00	3,47
75		10,60	7,57	
31 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		6,10	3,17
	Standardabweichung		000	0,78
	Perzentile	25	6,10	2,35
75		6,10	3,82	
56 Tage	N	Gültig	4	2
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		4,45	9,65
	Standardabweichung		1,45	2,05
	Perzentile	25	3,20	8,20
75		5,95	11,10	

Abb. 4.43 Entwicklung des Anteils der CD3+CD8<sup>-</sup>-Zellen in den Tonsillen der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichungen und Perzentile an.

4.7.3. TCR1<sup>+</sup>-Zellen ( $\gamma\delta$ -T-Zellen)

Ein tendenzieller Effekt der Fütterung war unabhängig vom Alter der Tiere zu verzeichnen. Die probiotische Behandlung erhöht den Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen tendenziell ( $p=0,074$ ).

Abb. 4.44 A

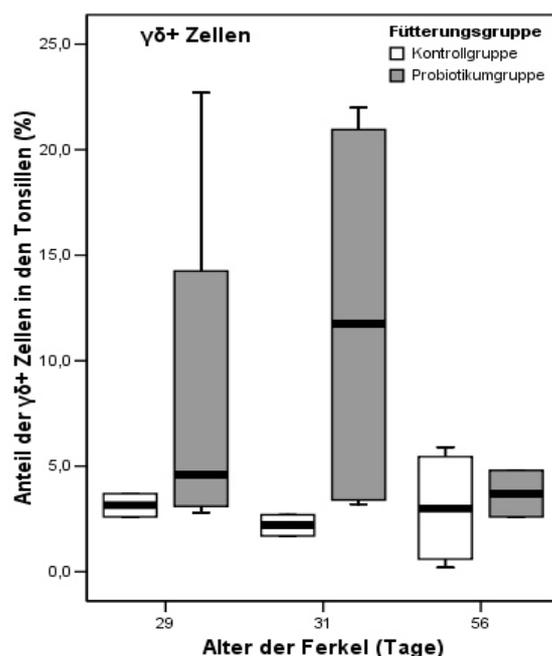


Tabelle 4-27

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		3,15	8,67
	Standardabweichung		0,77	9,43
	Perzentile	25	2,60	2,95
75		3,70	18,47	
31 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		2,20	12,17
	Standardabweichung		0,70	10,17
	Perzentile	25	1,70	3,30
75		2,70	21,47	
56 Tage	N	Gültig	4	2
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		3,02	3,70
	Standardabweichung		2,84	1,55
	Perzentile	25	0,40	2,60
75		5,67	4,80	

Abb. 4.44 B

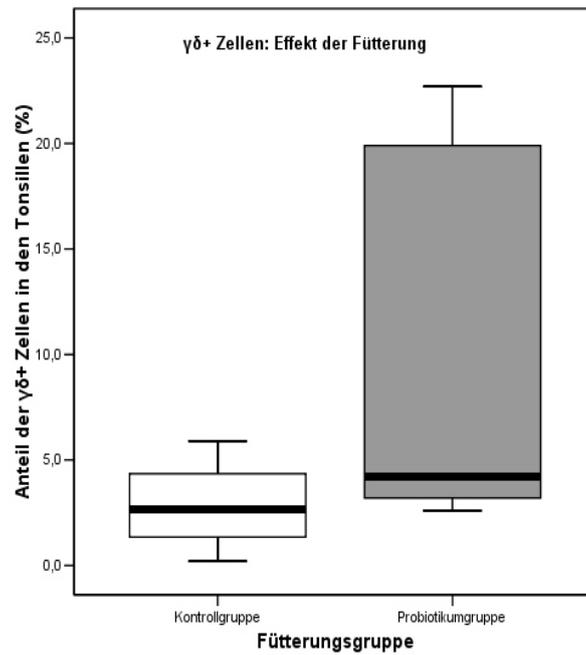


Abb. 4.44

A Entwicklung des Anteils der TCR1<sup>+</sup>-Zellen in den Tonsillen der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-27 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichung sowie Perzentile an.

B Darstellung des Fütterungseffekts (p=0,074).

#### 4.7.4. CD4<sup>+</sup>-Zellen

Auch auf diese T-Zell-Population hatte die Fütterung einen signifikanten Effekt, aber nur bei den 29 und 56 Tage alten Tieren. Bei den 29 Tage alten Kontrolltieren war der Prozentsatz dieser Zellen signifikant höher (T-Test,  $p=0,01$ ). Hingegen war ihr Anteil bei den 56 Tage alten Kontrolltieren signifikant niedriger als in der Probiotikumgruppe ( $p=0,001$ ).

Abb. 4.45 A

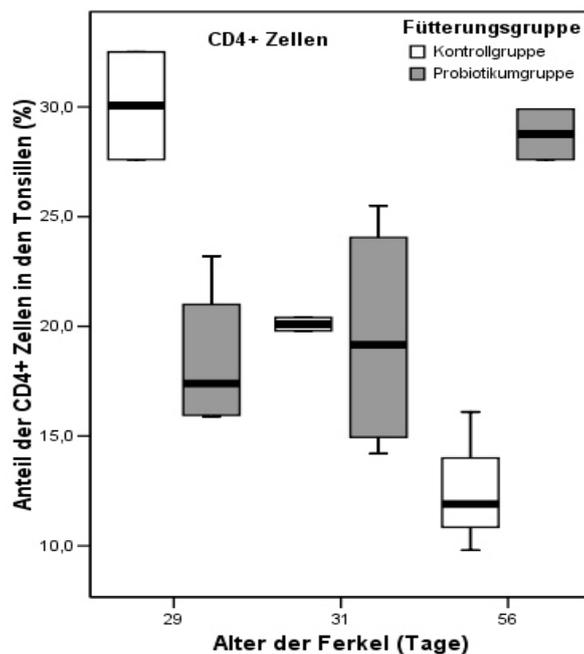


Tabelle 4-28

Alter der Tiere			Fütterungsgruppe	
			Kontrollgruppe	Probiotikumgruppe
29 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		30,05	18,47
	Standardabweichung		3,46	3,42
	Perzentile	25	27,60	15,92
75		32,50	22,10	
31 Tage	N	Gültig	2	4
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		20,10	19,50
	Standardabweichung		0,42	5,42
	Perzentile	25	19,80	14,57
75		20,40	24,77	
56 Tage	N	Gültig	4	2
		Fehlend	0	0
	Mittelwert		12,42	28,75
	Standardabweichung		2,64	1,62
	Perzentile	25	10,32	27,60
75		15,05	29,90	

Abb. 4.45 B

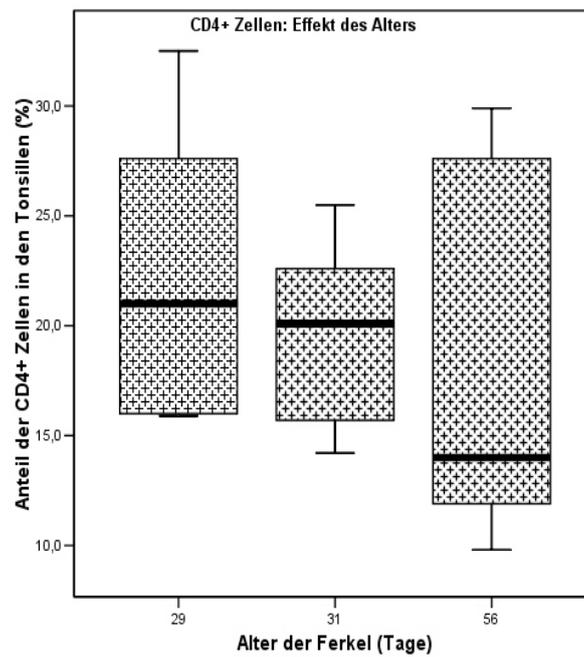
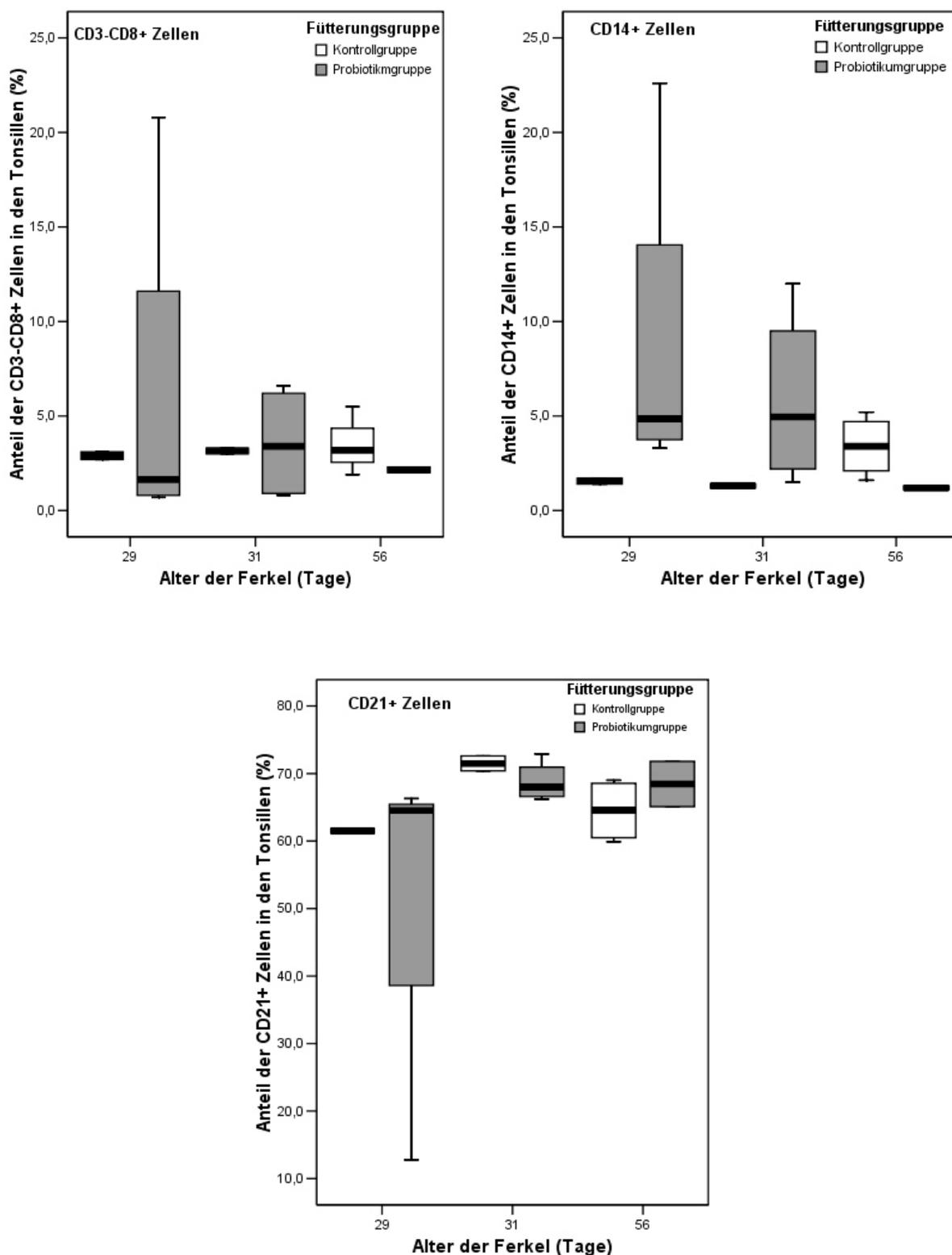


Abb. 4.45

A Entwicklung des Anteils der CD4<sup>+</sup>-Zellen in Tonsillen der Probiotikumgruppe (graue Balken) und der Kontrollgruppe (weiße Balken). Die Tabelle 4-28 gibt die Stichprobengröße, Mittelwerte, Standardabweichung und die Perzentile an.

B Darstellung der Altersabhängigkeit (Keine statistische Signifikanz).



**Abb. 4.46** Prozentanteile ausgewählter Immunzellpopulationen in den aus Tonsillen gereinigten Zellfraktionen bei probiotisch behandelten Tieren (graue Balken) und Kontrolltieren (weiße Balken). Zwischen den Fütterungsgruppen liegen bezüglich der dargestellten Ergebnisse keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

### 5. Diskussion

#### 5.1. Das Studiendesign

##### 5.1.1. Das Schwein als Tiermodell

Der Verdauungstrakt des Schweins weist eine Reihe von anatomischen und physiologischen Übereinstimmungen mit dem Magen-Darm-Trakt des Menschen auf, und auch die Verdauungshormone und Verdauungsenzyme des Schweins sind den menschlichen ähnlich (BROWN & TERRIS, 1996; TUMBLESON & SCHOOK, 2005). Beide sind Omnivoren, weshalb die Kommensalflora ebenfalls Ähnlichkeiten aufweist.

Aufgrund dieser generellen Übereinstimmungen in Struktur und Funktion finden sich auch Ähnlichkeiten in Hinblick auf die Empfindlichkeit gegenüber oral aufgenommenen Darm-pathogenen wie Salmonellen und enterohämorrhagischen *Escherchia coli* (REEDS & ODLE, 1996; ROHRER et al., 2002), weiterhin in Hinblick auf die Zusammensetzung der Nahrung und die Verzehrmenen (ROHRER et al., 2002; TUMBLESON & SCHOOK, 2005) sowie im Hinblick auf die Organgrößen (BASSAGANYA-RIERA et al., 2004) und nicht zuletzt in Hinblick auf die genetische Homologie, was das Risiko einer Organabstoßung nach einer Xenotransplantation zwischen Mensch und Schwein reduziert (BASSAGANYA-RIERA et al., 2004; HOLTMEIER et al., 2002; TUMBLESON & SCHOOK, 2005).

Im Vergleich zu den herkömmlichen Labortieren bietet das Schwein aufgrund seiner Körpergröße die Möglichkeit, große Mengen an Gewebe zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei jeder Tötung eines Ferkels Probenmaterial für mehrere Arbeitsgruppen aus sechs Fachrichtungen gewonnen werden, wodurch die Zahl der notwendigen Tötungen auf ein Minimum reduziert wurde.

Bei dieser Arbeit steht das zelluläre Immunsystem des Schweins im Vordergrund. Diesbezüglich weist das Schwein eine Reihe von Besonderheiten auf. Im Gegensatz zu Primaten und Nagern hat das Schwein eine *Plazenta epitheliochoriales*, weshalb während der Trächtigkeit keine maternalen Antikörper auf die Feten übertragen werden.

Der Fetus ist daher immunologisch von der Mutter getrennt, umso wichtiger ist die Kolostrumzufuhr, denn erst mit der Aufnahme von Kolostrum bekommt das Neugeborene wirksame Antikörper, die während der ersten Stunden nach der Geburt die Darmbarriere passieren können und systemisch wirken. Schon nach wenigen Tagen werden diese maternalen Antikörper nicht mehr resorbiert, da die Darmbarriere für sie nicht mehr passierbar ist. Sie wirken aber lokal im Darm und leisten einen wichtigen Beitrag zum Schutz gegen Darminfektionen.

Anders als beim Menschen ist der Darm des neugeborenen Ferkels frei von Leukozyten (ROTHKÖTTER & PABST, 1989). Erst nach der Geburt beginnen die Leukozyten, in das sog. Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) einzuwandern. Die bakterielle Besiedlung im Darm scheint diese Einwanderung der Lymphozyten zu stimulieren (HAVERSON et al., 2002), ferner führt die Besiedlung des Darms mit kommensalen Mikroorganismen zur Entstehung oraler Toleranz und reguliert somit die Immunantwort (HOOPER & GORDON, 2001; HOOPER et al., 2001). Auch die Entwicklung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) wird maßgeblich durch gram-negative Bakterien stimuliert (ROTHKÖTTER et al., 1989). Z. B. So stimulieren die bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS) die IEL zur IL-15-Produktion. IL-15 spielt eine große Rolle bei der Entwicklung von TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$  (KANEKO et al., 2004). Diese Beobachtung unterstreicht die Wichtigkeit der Darmflora bei der Entwicklung des Darmimmunsystems.

### **5.1.2. Versuchsdiät**

Die Fütterung der Sauen wurde ihren StoffwechsellLeistungen angepasst (tragende oder laktierende Sauen). Ihre Grundversorgung mit Ballaststoffen wurde durch die Verwendung von Getreide (Gerste und Weizen) gewährleistet. Hinsichtlich Futterverwertung und -aufnahme bestand kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Bei den Ferkeln wurde die tägliche Futterrationsration an das steigende Körpergewicht der Tiere angepasst. Die Festsetzung des Probiotikum-Anteils im Futter ( $1,4 \times 10^6$  bis  $7,5 \times 10^6$  KBE/Gramm Futter), orientierte sich an früheren Studien zur Immunmodulation des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10414 (SCHAREK et al., 2005; TARAS et al., 2006; SIMON et al., 2001).

Schon während der Saugperiode wird die kommensale Flora der Muttersau auf die Saugferkel übertragen. In einer Studie mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 konnte bewiesen werden, dass diese probiotischen Bakterien in den Faeces von 14 Tage alten Ferkeln nachweisbar waren, wenn ihre Muttersauen mit dem gleichen Probiotikum gefüttert worden waren (MACHA et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Untersuchungen anderer Autoren (VAN BELLE et al., 1990; SIMON et al., 2001).

### **5.1.3. Auswahl der Salmonelleninfektionsdosis und der Infektionsmethode**

Basierend auf den Ergebnissen aus mehreren Studien mit verschiedenen Probiotika konnte gezeigt werden, dass bestimmte Probiotika-Präparate oder Kombinationspräparate mit mehreren

Probiotika in der Lage sind, das Vorkommen von bestimmten pathogenen Keimen zu reduzieren und aktiv gegen eine Infektion zu wirken. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass bestimmte pathogene *E. coli* Serovare nach der Verfütterung des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 an die Ferkel im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant seltener aus den Tieren isoliert werden konnten (SCHAREK et al., 2005)

Die Behandlung mit dem gleichen Probiotikum reduziert die Übertragung von Chlamydien von positiv getesteten Sauen auf die Ferkel (POLLMANN et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde der Effekt der Supplementierung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die zelluläre Immunität von Ferkeln während einer experimentellen Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 (definitive typ 104 oder Phagotyp 104) untersucht. Die Auswahl der Salmonellen für diesen Versuch fand unter Berücksichtigung mehrerer Aspekte statt.

Insbesondere *Salmonella typhimurium* und *Salmonella cholerasuis*, sind die am häufigsten isolierten Salmonellen-Spezies aus dem Schwein (HIGGINS & GOTTSCHALK, 1999). *Salmonella typhimurium* war im Jahr 2000 die am häufigsten isolierte Salmonella-Spezies bei an Salmonellose erkrankten Menschen (RABSCH et al., 2001), ferner wurde *Salmonella typhimurium* DT104 bei Menschen regelmäßig nach dem Verzehr von Fleisch aus infizierten Tieren isoliert (WALL et al., 1994; BESSER et al., 1997). *Salmonella typhimurium* DT104 ist weltweit der häufigste aus Menschen und Tieren isolierte Phagotyp (LAVAL et al., 1989; BROWN et al., 2007). Die Bedeutung dieses Serovars für die Öffentlichkeit ist steigend (HELMS et al., 2005). Es wird geschätzt, dass in den USA jährlich ca. vier Millionen Fälle von Salmonellose mit ca. 500 Todesfällen auftreten. Die meisten davon werden durch *Salmonella typhimurium* verursacht (GLYNN et al., 1992).

Subklinische Infektionen, kontaminierte Umwelt, lang anhaltende oder intermittierende Ausscheidung sowie die Empfänglichkeit des Schweins für eine große Anzahl von Salmonellen-Serovaren, die für das Schwein wenig pathogen sind, für den Menschen aber eine Gefahrenquelle darstellen – insbesondere nach dem Verzehr von Schweinefleisch oder anderen Produkten – unterstreichen die Wichtigkeit der Salmonellose als Zoonose.

Aus diesen Gründen haben viele Länder weltweit nationale Programme entwickelt, um die Verbreitung von Salmonellen in den Tierbeständen zu bekämpfen (POPPE et al., 1998; HOGUE et al., 1997; RIBOT et al., 1985). Da eine völlige Verdrängung der Salmonellen aus den Tierbeständen realisierbar ist (BLAHA et al., 2002; BLAHA et al., 1993), streben die meis-

ten Bekämpfungsprogramme „salmonellenfreie“ Tierbestände an. Neben der Überwachung der verschiedenen Produktionsstufen stellen das Management, die Therapie und die Vakzination die wichtigsten Säulen der Salmonellenbekämpfungspläne dar. Sehr zu empfehlen sind weiterhin Maßnahmen wie die Rein-Raus-Belegung, eine rigorose Reinigung und Desinfektion von Gerätschaften und Ställen, die Vermeidung der Einschleppung von infektiösem Material, der auf wenige Personen begrenzte Zugang zu den Tierställen, Fliegen- und Schädnerbekämpfung, die Minimierung der Staub- und Aerosolbildung und ein salmonellenfreies Futter (DAHL et al., 1996a).

Von Vermehrungsbeständen bis hin zu den Schlachtprodukten werden mit Hilfe eines für Salmonellen-Antikörper spezifischen ELISA die Tiere und ihre Schlachtprodukte auf Antikörper untersucht. Prozesskontrollen während der Futtermittelherstellung und Kontrollen der fertigen Futtermittel nach der Wärmebehandlung finden bei allen registrierten Futtermittelherstellern statt (EGAN et al., 1997; FEDORKA-CRAY et al., 1997a).

Die medikamentelle Behandlung und Sanierung von Salmonellenträgern ist weder beim Menschen noch bei Tieren sehr erfolgreich. Sie führt in der Regel lediglich zu einer Verlängerung der Erregerausscheidung und birgt darüber hinaus das Risiko eines vermehrten Auftretens von Resistenzen. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass mehrfachresistente Salmonellen-Serovare in Deutschland häufiger nachzuweisen waren als in den skandinavischen Ländern. Daher ist die Ausmerzung von Dauerausscheidern die beste Lösung, um die Verbreitung von Salmonellen zu verhindern (GANTER et al., 1998; SELBITZ et al., 1992; WIERUP et al., 1997).

Die Durchführung von Impfmaßnahmen gegen Salmonellen dient in erster Linie der Verhinderung der Infektion und damit einer besseren Immunabwehr und einer Reduzierung der Salmonellenbelastung in den Tierbeständen. Auf dem Markt sind mehrere lebende und attenuierte Impfstoffe erhältlich. Die Vakzination ist erwiesenermaßen ein effektives Mittel, um die klinische Salmonellose bei Mastschweinen zu verhindern. Allerdings ist sie im Rahmen eines Kontrollprogramms nicht geeignet, weil es durch die Impfung zu einem signifikanten Anstieg der Antikörpertiter kommt, der in serologischen Untersuchungen keine eindeutige Aussage über den Salmonellenstatus in den Beständen zulässt (GANTER et al., 1998; ORTMANN et al., 1999).

In der heutigen Schweinehaltung versucht man, die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Maßnahmen mit dem Einsatz weiterer Mittel zu unterstützen, die die Vermehrung der

Salmonellen reduzieren oder den Ausbruch einer Infektion unterbinden sollen. Besondere Fütterungssysteme werden verwendet, um die Vermehrung von Salmonellen im Darm zu verhindern. Es wurde z. B. nachgewiesen, dass saure Futtermittel und Flüssigfütterung die Salmonellenbelastung reduzierten (STEGE et al., 1998). In den meisten Flüssigfütterungssystemen findet aufgrund der Milchsäure-produzierenden Bakterien und Hefen ein natürlicher Fermentationsprozess statt. Die Azidität des Flüssigfutters und die Stabilisierung der gastrointestinalen Flora wirken hemmend auf die Vermehrung von Salmonellen (DAHL et al., 1996b; 1997a; WINGSTRAND et al., 1997).

Auch der Zusatz organischer Säuren bewirkt auf Dauer eine Reduktion der Salmonellen-Prävalenz in den Tierbeständen (DAHL et al., 1997b). Dabei stellt der Ausschluss von Darm-pathogenen aus dem Verdauungstrakt der Schweine durch competitive exclusion (das heißt bevorzugte Kolonisation des Intestinaltraktes mit Kommensalen) eine gute Strategie für die Reduzierung der Salmonellen-Infektionen bei Schweinen dar (STANKER et al. 1997).

Mit der Verfütterung von Bakterienkulturen, die in der natürlichen Darmflora des Schweins vorkommen, wird versucht, das Angehen einer Salmonellen-Infektion zu verhindern. So konnten LETELLIER et al. (2000) durch den Einsatz eines kommerziellen Gemischs aus Probiotika (Ferlac-2<sup>®</sup> besteht aus 4% *Lactobacillus acidophilus*, 65% *L. rhamnosus*, 25% *Enterococcus faecium*, 5.9% *Streptococcus thennophilus* und 0.1% *L. bulgaricus*) bei experimentell mit *Salmonella Typhimurium* infizierten Absatzferkeln die Einwanderung der Salmonellen in die Gewebe hemmen und somit eine Reduktion der Keimträger erreichen. Allerdings konnte die Ausbreitung in die Umgebung nicht vermindert werden. Durch die Etablierung einer robusten Flora im Gastrointestinaltrakt von Saugferkeln mit Hilfe der Verfütterung von Probiotika konnte eine deutliche Reduzierung der Ausscheidung von Salmonellen erzielt werden. Die Autoren betrachten die competitive exclusion als eine Möglichkeit, die Kolonisation junger Schweine mit Salmonellen zu vermindern (FEDORKA-CRAY et al. 1997a; NISBET et al. 1997).

Dementsprechend stellten PULLEN et al. (1999) eine deutlich niedrigere Salmonellen-Prävalenz in den Geweben von Saugferkeln fest, die mit Probiotika behandelt worden waren, als in der Kontrollgruppe. Bei den humanen Salmonellosen werden Dauerausscheider unter anderem mit Laktulose behandelt. Dieser Zucker, der im Darm kaum resorbiert wird, führt zu starkem Durchfall (GANTER 1998a; 1998b; WIEMER 1999). WIEMER (1999) konnte mit dem Einsatz von Laktulose in einem Behandlungsversuch bei Mastschweinen eine signifikan-

te Reduktion der Salmonellenausscheider erreichen, allerdings ist diese Therapieform für die Anwendung unter Praxisbedingungen noch nicht ausgereift.

Frühere Untersuchungen mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* SF 68 wurden häufig mit klinisch gesunden Tieren durchgeführt (TARAS et al., 2006; SCHAREK et al., 2005, SIMON et al., 2001), die Autoren vermuten, dass die erzielten Effekte der Probiotika-Supplementierung in Problembeständen bzw. bei Tieren mit höherer Belastung an Pathogenen möglicherweise wesentlich größer wären.

Für diese Arbeit war bei der Ermittlung einer geeigneten Infektionsdosis die Erzeugung einer subklinischen Salmonellose wichtig. Für diese Art der Infektion wurde der deutlichste Effekt einer Probiotikumfütterung erwartet. Des Weiteren ist das Auftreten von klinischen Erkrankungen nach einer Infektion mit *S. typhimurium* in den Schweinebeständen eher die Ausnahme. Nach den Angaben verschiedener Autoren wurde bei der Salmonelleninfektion mit einer Dosis von  $10^8$  bzw.  $10^9$  Keimen/Tier eine zumeist subklinisch verlaufende Infektion bei guter Wiederfindungsrate der Erreger im Kot gesetzt (KAMPELMACHER et al., 1969). Bei mit *S. typhimurium* infizierten fünf Wochen alten Absatzferkeln bewirkte eine Infektionsdosis von  $10^{10}$  Keimen/Tier einen klinischen Verlauf mit wiederholten Durchfallperioden und einer Salmonellenausscheidung über insgesamt 120 Tage (WILCOCK & OLANDER, 1978). MARG et al. (2001) beschreiben bei experimentell induzierter Salmonellose mit dem multiresistenten *S. typhimurium*-DT104-Stamm ebenfalls milde klinische Symptome. In Anlehnung an diese Erfahrungen und an die Ergebnisse anderer Autoren (FEDORKA-CRAY et al., 1995; ISAACSON et al., 1992; FOSTER et al., 2002; CÔTÉ et al., 2004) wurde für die eigene Studie eine Infektionsdosis von ca  $10^9$  Keimen/Tier gewählt. Um sicher zu gehen, dass alle Versuchstiere möglichst die gleiche Menge an infektiösem Material aufnehmen, wurde unter Verwendung der Magenschlundsonde (nach Sedation) eine gezielte enterale Inokulation der Salmonellen in die Absatzferkel intragastral durchgeführt. Alle Tiere wurden vor der Infektion serologisch-negativ auf Salmonellen mittels des ELISA-Testsystems, Salmotype® Pig STM-WCE (LDL, Leipzig) im Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin) befunden.

#### **5.1.4. Auswahl der Proben und Tötungszeitpunkte**

Die Entwöhnung der Saugferkel von der Mutter (Absetzen) und ihre Umgruppierung stellen für die Ferkel eine Stresssituation dar. Die Kommensalflora stellt sich um, und das Immunsystem befindet sich in einer „Aufbauphase“. In dieser Phase der Ferkelproduktion sind die

Tiere besonders empfänglich für viele darmpathogene Bakterien und Viren, da ihr Immunsystem noch nicht reif und der Schutz durch maternelle Antikörper nicht mehr ausreichend ist gegen Infektionen (immunologische Lücke). Die wirtschaftlichen Verluste bei den Saug- und Absatzferkeln sind in dieser Periode am höchsten. In der Ferkelproduktion beträgt die Mortalität in den ersten sechs Lebenswochen bis zu 20%, wovon die Hälfte auf infektionsbedingte Durchfallerkrankungen zurückzuführen ist (HOEFLING et al., 1989).

In dieser Arbeit wurden deshalb Ferkel in der Entwöhnungsphase und darüber hinaus untersucht, um aufzuklären, wie das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 die zelluläre Immunantwort zu modulieren vermag. Die reale Infektionsgefahr, der die jungen Ferkel in dieser Phase ausgesetzt sind, wurde mit der experimentellen Salmonelleninfektion reproduziert.

Bei einer Studie mit jungen Ferkeln konnten Salmonellen nach einer experimentellen Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT104 schon drei Stunden nach der Infektion aus *Caecum*, *Colon* und mittlerem *Ileum* isoliert werden (FEDORKA-CRAY et al., 1995). In vitro-Versuche zeigten, dass Salmonellen schon fünf Minuten nach der Infektion an den M-Zellen anhefteten. Sie drangen dann zwei bis vier Stunden danach in die Epithelzellen der *Lamina propria* (MEYERHOLZ et al., 2003; SCHAUSER et al., 2004) ein. Das Eindringen der Salmonellen in den Darmepithelzellen beginnt ca 15 min. nach der Infektion und steigt kontinuierlich bis 120 min. p. i. (BROWN et al., 2007). In einer Studie mit Mäusen waren die Salmonellen 4 Stunden p. i. in der Milz (SCHRÖDER et al., 2002). Diese Untersuchungen zeigen, dass die systemische Verbreitung der Salmonellen viel schneller stattfindet als bisher angenommen.

In dieser Arbeit fanden die Tötungen der Ferkel und die Probennahme jeweils drei Stunden, 24 Stunden, 71 Stunden und 28 Tage nach der Salmonellen-Infektion statt. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden so gewählt, dass sowohl sehr frühe als auch spätere Auswirkungen der probiotischen Behandlung auf die zelluläre Immunantwort während einer Salmonelleninfektion untersucht werden konnten. Die Untersuchungen am 28. Tag nach der experimentellen Salmonelleninfektion erlaubten zudem Aussagen über mögliche Auswirkungen der probiotischen Behandlung auf die Langzeitigausscheidung von Salmonellen.

Nach einer Infektion mit Salmonellen heften sich diese Bakterien an Darmepithelzellen und dringen in die *Lamina propria* ein. Dort werden sie durch Makrophagen aufgenommen und in Peyersche Platten, Lymphknoten, Magen und Leber (KRAMER et al., 1995) weiter „transportiert“.

tiert“. Die Anheftung und das Eindringen der Salmonellen in das Darmepithel riefen oft eine entzündliche Reaktion hervor sowie einen Anstieg der Nettosekretion von Flüssigkeiten ins Darmlumen. Der Kontakt der Salmonellen mit den Enterozyten führt zum Verlust der Mikrovilli und zum „ruffling“ der Epithelzellen. Dabei handelt es sich um morphologische Veränderungen der Zellmembran im Sinne von langen Fortsätzen, hervorgerufen durch Polymerisation von Aktinfilamenten (GALAN et al., 1996). Meistens dringen die Salmonellen als erstes über das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) in die Peyerschen Platten ein (JONES et al., 1994; SCHAUSER et al., 2004).

Die Rolle der M-Zellen in der systemischen Verbreitung der Salmonellen wurde in mehreren Studien belegt. Besonders die Lokalisation in der Domregion der Peyerschen Platten ist von großer Bedeutung, denn hier liegen diese Zellen in enger Nachbarschaft zu Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und anderen Immunzellenarten (NEUTRA et al., 2001). In dieser Region treffen die Salmonellen auf die Phagozyten (DC, Makrophagen und Neutrophile). Von den Peyerschen Platten werden die Salmonellen durch verschiedenen Immunzellarten „weitertransportiert“ in regionale Lymphknoten, Blut, Lunge (ISAACSON et al., 1992), in die roten Pulpa der Milz (SALCEDO et al., 2001; RICHTER-DAHLDORS et al., 1997) in die Hepatozyten (MASTROENI et al., 1995, CONLAN et al., 1992) und die Tonsillen (VAZQUEZ-TORRES et al., 1999).

### **5.1.5. Auswahl der untersuchten Immunzellpopulation**

Im Zuge der systemischen Verbreitung der Salmonelleninfektion werden sukzessive verschiedene Organe in Mitleidenschaft gezogen. Während die Immunantwort in den frühen Stadien der Infektion auf den Darm beschränkt ist, finden in den späteren Stadien der Infektion Immunreaktionen in weiteren Organen (z.B. Lunge und Milz) statt. Nach dem Eindringen in die Makrophagen persistieren die Salmonellen intrazellulär in zytoplasmatische Vakuolen und verhindern die Fusion mit Lysosomen (BUCHMEIER et al., 1991; ALPUCHE et al., 1995). In den Makrophagen „verborgen“, können die Salmonellen der humoralen und zum Teil auch der angeborenen Immunantwort entgehen und sich vermehren. Daher ist eine starke zelluläre Immunantwort von entscheidender Bedeutung bei der Beseitigung der sich intrazellulär befindenden Salmonellen (SELL et al., 1987).

Wie bei anderen intrazellulären Keimen wie Leishmanien und Mykobakterien sind die CD4<sup>+</sup>-Zellen (T-Helper, Th) essenziell für die Induktion der Makrophagen-Aktivierung. Th1 produ-

zieren unter anderem  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  und aktivieren dadurch die Makrophagen (REINER et al., 1995; SCHAIBLE et al., 1999).

Die Behandlung von Mäusen mit Antikörpern gegen T- und B-Zellen reduziert ihre Immunantwort bei einer Reinfektion mit dem Wildtyp der Salmonellen (MASTROENI et al., 1992). Der Transfer von Serum aus immunisierten auf mutante Mäuse (Nramp1s) hatte nur einen geringeren Schutzeffekt gegen orale Kontamination mit dem Wildtyp von *Salmonella typhimurium*. Aber der Transfer von Serum und Lymphozyten führte zu ausreichendem Schutz bei den mutanten Empfängermäusen (MASTROENI et al., 1993).

Auch Darmepithel (SKJOLASS et al., 2006), Makrophagen (GARIN et al., 2001; HAAS et al., 2007), Natural Killer-Zellen (NK) (LEE-MAC ARY et al., 2001) Neutrophile (CHEMINAY et al., 2004, ZYCHLINSKY et al., 2003; NADEAU et al., 2002), dendritische Zellen (ANGER & ROSS, 1992; GARCIA DELPORTILLO et al., 2000),  $\text{CD4}^+$ -Zellen (HESS et al., 1996; MASTROENI et al., 1998),  $\gamma\delta^+$ -Zellen (DAVIES et al., 2003) und  $\text{CD8}^+$ -Zellen (AGGARWAL et al., 1990) sind von zentraler Bedeutung in der Beseitigung von Salmonellen. Menschen mit genetisch bedingter Immundefizienz verschiedener Komponenten des zellulären Immunsystems sind besonders hoch empfänglich für die Infektion mit Salmonellen (DE JONG et al., 1998).

Diese Ergebnisse machen deutlich, wie wichtig die zelluläre Immunantwort bei der Beseitigung von Salmonellen ist, daher wurden in dieser Arbeit ausgewählte Immunzellsubpopulationen in verschiedenen Effektor- und Induktionsorganen des Immunsystems analysiert.

Bei der Auswahl der untersuchten Immunzellsubpopulation wurden besonders solche berücksichtigt, die einerseits auf die Behandlung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 ansprechen, z. B.  $\text{CD8}^+$ -Zellen (SCHAREK et al., 2005), andererseits wurden Subpopulationen untersucht, die besonders relevant sind für die Immunantwort gegen Salmonellen. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist es, die immumodulatorischen Eigenschaften des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Veränderungen der Immunzellsubpopulationen sowohl lokal im Darm (IEL, proximale PP, distale PP) als auch in der Peripherie (Blut) ermittelt. Im Zusammenhang mit der Kompartimentierung des GALT wurden die jejunalen und ilealen Peyerschen Platten als Vertreter der Induktorregion des GALT, sowie IEL des proximalen Jejunums als Effektorregion ausgewählt. Als Schnittstelle des GALT zur Peripherie wurden die Tonsillen und mesenteriale Lymphknoten gewählt. Die Immunzellen aus den mesenterialen Lymphknoten sind anders als

jene in den Peyerschen Platten oder IEL nicht im Darm angesiedelt, sondern sie sind durch Lymph- und Blutgefäße mit dem Darm verbunden. Als Vertreter des systemischen Immunsystems wurde die Immunzellpopulation in der Milz und im Blut untersucht.

## **5.2. Einfluss der probiotischen Supplementierung auf die Zusammensetzung der Immunzellpopulation**

Um den Einfluss der biotischen Faktoren wie Alter der Tiere, Keimbelastung in den Ställen und Stress sowie der abiotischen Faktoren wie Stallklima und Stallhygiene auf das Immunsystem so gering wie möglich zu halten, wurden die Haltungsbedingungen für alle Versuchstiere – bis auf die Fütterung – gleich gestaltet. Die Probengewinnung und -bearbeitung wurde von den gleichen Personen und zu identischen Zeitpunkten durchgeführt. Im Vergleich zu einer probiotisch unbehandelten Kontrollgruppe konnten bei der mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) gefütterten Versuchsgruppe Veränderungen bestimmter Immunzellsubpopulationen beobachtet werden. Diese Effekte der probiotischen Behandlungen werden im Folgenden diskutiert.

### **5.2.1. CD8<sup>+</sup>-Zellen und CD16<sup>+</sup>-Zellen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der CD8<sup>+</sup>- und CD16<sup>+</sup>-Zellen erlaubten Rückschlüsse auf die Wirkung der probiotischen Behandlung auf die folgende Fraktionen der CD8<sup>+</sup>-Zellen: CD8<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (NK Zellen), CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> (zytotoxische T-Zellen und memory-helper Zellen), CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (die memory-helper T-Zellen), CD8αβ (Zellen mit heterodimerem CD8) und CD8<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup>-Zellen.

Sowohl im Blut als auch im Epithel der probiotisch behandelten Tiere waren signifikant weniger CD8<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden.

Im humanen Immunsystem, bei der Maus und beim Schwein ist CD8 ein Marker für die zytotoxischen Zellen (PESCOVITZ et al., 1998; ZUCKERMANN et al., 1990; MARTIN et al., 1998b; YANG et al., 1997). Allerdings sind nicht alle CD8<sup>+</sup>-Zellen des Schweins zytotoxische Zellen. Die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen des Schweins sind memory-helper-Zellen (ZUCKERMANN et al., 1999, SAALMÜLLER et al., 2002). Die zytotoxischen Fähigkeiten der Immunzellen beim Schwein weisen eine Reihe von Besonderheiten auf und scheinen zum Teil nicht MHC- restringiert zu sein (SAALMÜLLER & WIRT, 1994; PAULY et al., 1996). Beim

## Diskussion

---

Schwein beträgt ferner die Ratio CD8: CD4 ca. 2, was eine relativ hohe zytotoxische Aktivität bedeutet (YANG & PARKHOUS, 1996; ROTH & THACKER, 2006). Beim Menschen hingegen beträgt sie ca. 0,6 (YANG & ROTH, 1996).

Der Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen schwankte in den Lymphknoten zwischen 36,7% und 33,37%, in den Tonsillen zwischen 7,23% und 3,93%, in den prox. PP zwischen 31,7% und 20,58%, in der Milz zwischen 44,71% und 32,03%, im Blut zwischen 36,47% und 18,4%. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben anderer Autoren überein (ZUCKERMANN et al., 1996; YANG & PARKHOUS, 1996).

Im Blut der probiotisch behandelten Tiere waren signifikant weniger CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> und CD8αβ<sup>+</sup> Zellen vorhanden als bei den Kontrolltieren, dieser signifikante Effekt der Fütterung war bei allen Altersklassen und insbesondere bereits vor der Infektion mit Salmonellen zu verzeichnen. Darüber hinaus waren weder CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, noch γδ<sup>+</sup>-Zellen durch die Fütterung beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die probiotische Behandlung nur eine ganz bestimmte Subpopulation der CD8<sup>+</sup>-Zellen beeinflusst, nämlich die CD8αβ<sup>+</sup>-Zellen und wahrscheinlich einen Teil der CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>-Zellen, da CD16<sup>+</sup> bei den Tieren der Probiotikumgruppe tendenziell abnimmt.

Frühere Untersuchungen mit dem gleichen Probiotikum zeigten ebenfalls einen reduzierenden Effekt auf die CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation im Epithel (SCHAREK et al., 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Behandlung von Mäusen mit verschiedenen Lactobazillen-Spezies (VITINI et al., 2000).

Die Analyse der CD8<sup>+</sup>-Lymphozytensubpopulation im Epithel zeigte, dass die Tiere der Probiotikumgruppe unabhängig vom Alter signifikant niedrigere Werte an CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen und CD8αβ<sup>+</sup>-Zellen hatten als die der Kontrollgruppe. Auch der Anteil der CD45<sup>+</sup>-Zellen im Epithel war bei den probiotisch behandelten Tieren signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Hingegen war kein signifikanter Effekt der Fütterung auf CD16<sup>+</sup>-Zellen, CD11<sup>+</sup>-Zellen und auf γδ<sup>+</sup>-Zellen im Jejunumepithel zu verzeichnen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die probiotische Behandlung eine Netto-Abnahme der CD8<sup>+</sup>-Zellen hervorruft; dies betrifft hauptsächlich die CD8αβ<sup>+</sup>, welche einen Teil der gesamten CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen ausmachen. Die zeitliche Entwicklung der beiden Populationen ist identisch (siehe Abb. 4-32-A und Abb.4-34-A). Da weder CD16<sup>+</sup>- oder CD11<sup>+</sup>- noch CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen im Epithel von der Fütterung beeinflussbar waren, ist anzunehmen, dass die Natural Killer-Population wenig oder kaum durch das Probiotikum beeinflussbar ist.

Nach der Antigenerkennung setzen  $CD8^+$ -Zellen Perforin frei. Es handelt sich dabei um ein Protein, welches in der Zielzellemembran Poren bildet und so zu Zellyse führt. Daher wird Perforin auch als Marker für zytotoxische Aktivität angesehen (HAMEED et al., 1992). Als Antwort auf Antigenstimulation proliferieren die  $CD8^+$ -Zellen, exprimieren mehr CD25 (eine Untereinheit des IL-2 Rezeptors) und produzieren  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  (LAVAL et al., 2002; BASSAGNY-RIER et al., 2004).

Das CD8-Molekül fungiert als Co-Rezeptor und ist assoziiert mit dem Tyrosine Kinase p56lck. Es ist an der TCR-vermittelten Aktivierung von T-Zellen beteiligt (TURNER et al., 1990). Bei den meisten Säugetieren ist das CD8-Molekül ein Dimer, welches entweder als Homodimer aus zwei gleichen  $\alpha$ -Ketten (TORRES-NAGEL et al., 1992; MOEBIUS et al., 1991) oder als Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (KAVATHAS et al., 1984; SHIUE et al., 1988) zusammengesetzt ist. Die beiden Ketten sind jeweils durch Disulfidbrückenbindung miteinander verbunden (NORMENT et al., 1988). Die Expression der  $\alpha$ -Kette reicht aus, damit das CD8-Molekül seine Funktion entfaltet (DBIC et al., 1987; GABERT et al., 1987). Die Lymphozytenspezifische Kinase Lck ist eine Protein-Tyrosin-Kinase, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort innerhalb der T-Zelle einnimmt. Sie ist essentiell für die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen. Durch die Weitergabe des Rezeptorsignals nach Antigenstimulierung ist sie an der Aktivierung anderer Kinasen und damit an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. Die  $\beta$ -Kette ist vermutlich für die Regulation der physikalischen Struktur des CD8-Moleküls (CASABÓ et al., 1994), die Interaktion mit MHC II (KARAKI et al., 1992) und die IL-2-Produktion verantwortlich (WHEELER et al., 1992) und beeinflusst die Lck- Aktivität (IRIE et al., 1995). Bei Verwendung eines Antikörpers gegen die  $\alpha$ -Kette erfasst man damit alle  $CD8^+$  Zellen, weil alle eine  $\alpha$ -Kette besitzen. Markiert man jedoch die  $\beta$ -Kette, erfasst man damit nur den Anteil der  $CD8\alpha\beta$ -Zellen. Durch die Verwendung eines Antikörpers gegen die  $\beta$ -Kette von CD8 konnte der Anteil der  $CD8\alpha\beta$ -Zellen an der Gesamtheit der  $CD8^+$ -Zellen bestimmt werden. Ca. 60% der  $\gamma\delta^+$ -Zellen sind beim Schwein  $CD8\alpha\alpha^+$ . Die Heterodimere Form des CD8 ( $CD8\alpha\beta$ ) kommt nicht auf  $\gamma\delta^+$ -Zellen vor (PARK et al., 1999).

Alle CD8-Zellen im Thymus sind  $CD8\alpha\beta$ .  $CD8\alpha\alpha$  wurden nur in der Peripherie beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die  $\beta$ -Kette eine Rolle bei der positiven Selektion von  $CD8^+$ -Zellen spielt (NAKAYAMA et al., 1994; CROOKS et al., 1994). Außerdem ist die  $\beta$ -Kette an der T-Zell-Reifung im Thymus beteiligt (NAKAYAMA et al., 1994; CROOKS et al., 1994). Bei Menschen und Mäusen sind  $CD8\alpha\alpha$  sehr häufig in der Mukosa, aber selten in der zirkulieren-

## Diskussion

---

den Fraktion, wie dem Blut (HAYDAY et al., 2000), denn die meisten zirkulierenden reifen CD8<sup>+</sup>-Zellen sind CD8αβ. Die Expression von CD8αα innerhalb des lymphatischen Pools beschränkt sich auf die NK und IEL (SUN et al., 1997).

Die CD8<sup>+</sup>-Zellen beim Schwein sind phänotypisch und funktionell sehr vielfältig. Die Dominanz der CD8αβ-Zellen in der Peripherie verschleiert die tatsächliche Rolle anderer CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen (GOLLOB et al., 1998). Im Blut hingegen sind CD8αβ<sup>+</sup>-Zellen nicht die dominierende Fraktion der CD8<sup>+</sup>-Zellen, und sie überschatten daher nicht die Rolle der CD8αα (ZUCKERMAN et al., 1996). Bei Mäusen sind CD8αβ besonders wichtig für die Entwicklung der Immuntoleranz gegenüber Nahrungsantigenen (SYDORA et al., 1996; KIM et al., 1997). Sie werden in den PP aktiviert und kehren ins Epithel entlang des Dünndarms zurück (GUY-GRAND et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der reduzierende Effekt des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut und im Epithel, vor allem den Anteil der CD8αβ<sup>+</sup>-Zellen betrifft. Andere Subpopulationen der CD8<sup>+</sup>-Zellen, wie die Memory-Helper (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) oder NK, waren dabei nur geringfügig im Blut, nicht aber im Epithel betroffen.

CD8<sup>+</sup>-Zellen, insbesondere die TCRαβ CD8αβ<sup>+</sup> sind wichtig für die Immunantwort gegen pathogene Keime, speziell gegen solche, die sich intrazellulär vermehren, wie z.B. Viren, intrazelluläre Bakterien (z.B. Salmonellen), Parasiten, Hefen und neoplastische Zellen. Bei der Infektion mit intrazellulären Pathogenen, wie z. B. *Cryptococcus neoformans* oder *Mycobacterium tuberculosis* reduziert sich der Anzahl dieser Zellen, was zu einer Beeinträchtigung der Entwicklung einer adäquaten zellulären Immunantwort führt (MODY et al., 1994; HARTY et al., 1999). Bei Schweinen geht eine erhöhte Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen mit besseren Leistungsparametern einher, wahrscheinlich durch die bessere Immunabwehr und die bessere zellvermittelte Immunantwort (SUZUKI et al., 1994).

Im Rahmen dieses Projektes wurde von TEDIN und Mitarbeitern (2008) die Fähigkeit der Immunzellen aus dem Blut und dem Epithel beider Fütterungsgruppen bestimmt, eine mit Salmonellen infizierte Zellkultur zu töten (gesamt Zytotoxizität). Die IEL und PBMC aus den 28, 29 und 31 Tage alten Kontrolltieren waren besser in der Lage, die mit Salmonellen infizierten Zellen zu töten. Die Salmonellentiter in der Zellkultur waren nach der Gabe von IEL und PBMC aus den Kontrolltieren bis zu 50% reduziert, verglichen mit dem Ausgangstitern der Salmonellen. PBMC und IEL aus den probiotisch behandelten Tieren waren am 28. Le-

benstag kaum in der Lage, Salmonellen zu töten. Ihre Fähigkeit stieg aber mit dem Alter der Tiere an, und so konnten sie bei 56. Tage alten Tieren die Salmonellen sehr effizient töten (TEDIN et al., persönliche Mitteilung, 2008).

SZABÓ und Mitarbeiter (2008) stellten im Rahmen dieses Projektes (DFG-Forschergruppe) signifikant höhere Salmonellen-Belastungen in den Organen der Probiotika-Tieren fest (SZABÓ et al., 2008, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung und die oben beschriebene reduzierte zytotoxische Aktivität der Immunzellen aus den Probiotika-Tieren sprechen dafür, dass die reduzierten Anteile an  $CD8\alpha\beta^+$ -Zellen in den Probiotika-Tieren eine deutliche Schwächung der zellulären Abwehr gegen die Salmonellen bedeutete.

### **5.2.2. CD45<sup>+</sup>-Zellen: Anteil der Leukozyten im Darmepithel**

Das CD45-Antigen ist ein membranständiges Protein, dessen intrazellulärer Abschnitt eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität aufweist, es wird von allen Leukozyten verlässlich exprimiert und fungiert daher als Pan-Leukozytenmarker (ZUCKERMANN et al., 2001). Makrophagen und Histozyten zeigen ein variables Expressionsmuster an CD45.

Beim vorliegenden Tierversuch nahm der Anteil der CD45<sup>+</sup>-Zellen im jejunalen Epithel bei beiden Fütterungsgruppen mit dem Alter zu, allerdings hatten die probiotisch behandelten Tiere signifikant niedrigere Werte als die gleichaltrigen Kontrolltiere.

Die Bestimmung des Anteils einer bestimmten Lymphozytensubpopulation, wie z.B. CD8<sup>+</sup>-Zellen, erlaubt nur Aussagen darüber, ob Verschiebungen innerhalb der Leukozytenfraktion vorliegen. Die Bestimmung des Anteils der gesamten Leukozyten (CD45<sup>+</sup>-Zellen) ermöglicht darüber hinaus zu beurteilen, ob die absolute Zellzahl der Leukozyten im Epithel sich verändert hat. Da die probiotisch behandelten Tiere weniger Leukozyten (im Verhältnis zu Epithelzellen) im Jejunum aufwiesen als die Kontrolltiere, lässt sich vermuten, dass die absolute Zahl der  $CD8\alpha\beta^+$  T-Zellen im Epithel der Ferkel durch *E. faecium* vermindert wurde.

Dieser Befund scheint für *E. faecium* NCIMB 10415 spezifisch und nicht auf andere Probiotika übertragbar zu sein. Untersuchungen mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* zeigten, dass dieses Probiotikum den Leukozytenanteil (CD45<sup>+</sup>-Zellen) im Jejunumepithel von Ferkeln erhöht. Unter der Fütterung von *B. cereus* konnte ein positiver Einfluss auf die  $\gamma\delta$ -Zellen des Epithels gemessen werden (ALTHERR et al., 2005).

### **5.2.3. CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> - und CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> -Zellen**

Im vorliegenden Fütterungsexperiment führte die probiotische Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der CD4<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulation in der Milz (aller Altersgruppen), den proximalen PP (aller Altersgruppen) und in den Tonsillen (nur bei den 56. Tage alten Tieren), während im Blut und in den Lymphknoten kein signifikanter Einfluss der probiotischen Behandlung zu verzeichnen war.

Dieser Effekt der Fütterung war auf die naive Subpopulation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, also CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen beschränkt, da CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen kaum von der probiotischen Behandlung beeinflusst waren.

Im Blut schwankte der Prozentsatz dieser CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Subpopulation der T-Zellen zwischen 24,03% und 15,1%, in der Milz, zwischen 14,42% und 9,39%, in den prox. PP zwischen 12,63% und 7,50%, in den Lymphknoten zwischen 39,15% und 30,23%. In den Tonsillen wurde die Gesamtheit aller CD4<sup>+</sup>-Zellen bestimmt, ihr Anteil schwankte zwischen 30,05% und 12,4 %. Alle diese Werte stimmen mit anderen Literaturangaben überein. (YANG & PARKHOUS, 1996; ZUCKERMAN & HUSMAN, 1996; BOEKER et al., 1999; SALLES & MIDDLETON, 2000).

In der Milz nahm in beiden Fütterungsgruppen der Anteil dieser Population mit der Zeit ab, blieb jedoch zu allen Zeiten bei den Probiotikumtieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren.

In den prox. PP der Probiotikatiere war diese Population signifikant höher als bei den Kontrolltieren.

In den Tonsillen hatten die Probiotikumtiere am 29. Lebenstag ebenfalls signifikant weniger CD4<sup>+</sup>-Zellen (Gesamtheit aller CD4<sup>+</sup>-Zellen), ca. 24 Stunden danach hatten alle Tiere ähnliche Werte. Am 56. Lebenstag hatten die probiotisch behandelten Tiere wiederum mehr als doppelt so viele CD4<sup>+</sup>-Zellen wie die Kontrolltiere.

In einer früheren Untersuchung mit dem Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 konnte kein signifikanter Effekt der Fütterung auf der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation festgestellt werden (SCHAREK et al., 2005), allerdings wurde bei mehreren Untersuchungen ein Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellpopulation nach der Behandlung mit dem gleichen Probiotikum bei anderen Tierarten bewiesen. Bei Katzen z. B. führte die Supplementierung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 zu einem signifikant höheren Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen (VEIR et al.,

2007). In einer Studie mit Mäusen führte das gleiche Probiotikum ebenfalls zu einem Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellen in den Peyerschen Platten und in der Milz (BENYACOUB et al., 2005).

Eine vergleichbare Studie mit dem Probiotikum *Bacillus cereus* var. *toyoi* bei klinisch gesunden Ferkeln zeigte, dass die Ratio CD4<sup>+</sup>-Zellen : CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut probiotisch behandelte Tiere signifikant höher war als in der Kontrollgruppe, was mehr CD4<sup>+</sup>-Zellen bei den probiotisch behandelten Tieren vermuten lässt (SCHIERACK et al., 2007).

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (auch T-helper genannt) haben unter anderem die Aufgaben, die Makrophagen zu aktivieren (HOLT et al., 1988; BOLUIN et al., 1994) und die Funktionalität, Expansion und Verteilung der CD8<sup>+</sup>-Zellen zu kontrollieren (BLAZAR et al., 1997). Sie haben ferner regulatorische Funktionen, vor allem stimulieren sie die B-Zellen zur Antikörperproduktion, was zu einem Anstieg der humoralen Immunantwort führt (SAALMÜLLER et al., 2002). Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden in zwei wichtige Untergruppen unterteilt, nämlich: CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T-Zellen, sog. naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit fremdem Antigen hatten, und die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, sog. Memory-helper T-Zellen. Nach der Stimulation mit viralen, allogenen oder parasitären Antigenen werden die naiven CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen zu CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Memory-helper Zellen) (SALLMÜLLER et al., 1987; DILLENDER & LUNNEY, 1993).

Es ist denkbar, dass das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen direkt beeinflusste und dass dieser Einfluss nur bei einer gleichzeitigen Infektion (mit Salmonellen) deutlich wird. Frühere Untersuchungen mit dem gleichen Probiotikum bei klinisch gesunden Schweinen zeigten keinen Effekt der Fütterung auf die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen (SCHAREK et al., 2005). Wie oben erwähnt, haben CD4<sup>+</sup> T-Zellen unter anderem die Aufgabe, die Funktionalität, die Expansion und die Verteilung der CD8<sup>+</sup>-Zellen zu kontrollieren (BLAZAR et al., 1997). Die beschriebene Reduktion des Anteils der CD8<sup>+</sup>-Zellen könnte also durch die Expansion der CD4<sup>+</sup>-Zellen hervorgerufen sein.

Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die erhöhten CD4<sup>+</sup>-Werte in den Probiotika-Tieren eine Reaktion auf die stärkere Belastung dieser Tiergruppe mit Salmonellen sind. Für diese These spricht, dass das Phänomen der reduzierten CD8<sup>+</sup>-Zellen zeitlich vor dem Anstieg der CD4<sup>+</sup>-Zellen auftrat. Die Unterschiede im Blut und in der Milz wurden im Laufe der Infektion deutlicher. Vor der Infektion konnten keine Unterschiede (die CD4<sup>+</sup>-Population betreffend) im Blut beobachtet werden. Weiterhin zeigten SZABÓ et al. (2008) im Rahmen dieses Projektes, dass im Serum der probiotisch behandelten Ferkel einige Zeit nach der Infektion signifikant mehr IgA, und IgM gegen Salmonellen und tendenziell mehr Salmonellen spezifisches IgG

vorhanden waren (SZABÓ et al., persönliche Mitteilung, 2008). Trotz der erhöhten Serumwerte waren die Probiotika-Tiere jedoch schlechter in der Lage, die Salmonellen-Infektion zu beherrschen. Auch dieser Befund spricht dafür, dass die CD4<sup>+</sup>-Helfer-Zellen und die von ihnen induzierte Antikörperbildung eine Reaktion auf die Salmonellen-Infektion waren. Eine bereits vor Infektion erhöhte humorale Immunantwort hätte einen schwächeren Verlauf der Salmonellen-Infektion in den Probiotika-Tieren erwarten lassen.

### **5.2.4. CD16<sup>+</sup>-Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Prozentsätze der CD16<sup>+</sup>-Zellen in Blut, distal. PP, Milz, IEL und den mesenterialen Lymphknoten bestimmt.

Die Fütterung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium NCIMB 10415* bewirkte bei den Ferkeln einen signifikanten Anstieg der CD16<sup>+</sup>-Zellpopulation in den distalen Peyerschen Platten 24 Stunden nach der Infektion mit Salmonellen und eine signifikante Abnahme dieser Population in den mesenterialen Lymphknoten (gemessen bei 31 Tage alten Tieren).

Im Blut, der Milz und im Epithel hatten die probiotisch behandelten Tiere tendenziell weniger von diesen Zellen als die Tiere der Kontrollgruppe.

Bei CD16 handelt es sich um einen Rezeptor für Fc $\gamma$ , einen Teil des Immunglobulins IgG (KIM et al., 1997; HALLORAN et al., 1994). Sind Bakterien und infizierte Zellen mit IgG opsonisiert, werden sie von den CD16<sup>+</sup>-Zellen mittels Rezeptor erkannt, und eine Phagozytose bzw. antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch Natural Killer-Zellen (NK) wird vermittelt.

Im Blut hatten die Kontrolltiere vor der Infektion mit Salmonellen gleich viele oder tendenziell mehr CD16<sup>+</sup>-Zellen als die Probiotika-Tiere. Im Laufe der Infektion jedoch lagen die Mittelwerte der Probiotika-Tiere insgesamt unter den Werten der Kontrolltiere der jeweiligen Altersklasse. Der Anteil an CD16<sup>+</sup>-Zellen bei den Kontrolltieren schwankte zwischen 21,1 %  $\pm$  6,2 bei den 21 Tage alten Tieren (vor der Infektion mit Salmonellen) und 43,7 %  $\pm$  12,1 bei den 29 Tage alten Tieren (24 Stunden nach der Salmonelleninfektion). Die Anzahl der CD16<sup>+</sup>-Zellen stieg in beiden Fütterungsgruppen am 29. und 31. Lebenstag stark an, um am 56. Lebenstag wieder zu fallen. Es kann vermutet werden, dass dies mit der Salmonellen-Infektion am 28. Lebenstag zusammenhängt, denn bei früheren Untersuchungen an nicht mit Salmonellen infizierten und mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium MCIMB 10415* be-

handelten Ferkeln wurde ab dem 7. Lebenstag ein kontinuierlicher Abfall der CD16<sup>+</sup>-Zellen beobachtet (SCHAREK et al., unveröffentlichte Daten).

In der Milz schwankte der Anteil dieser Subpopulation zwischen 53,1 % ± 6,0 und 63,0 % ± 5,6. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Angaben aus der Literatur (SCHAREK et al., 2005). Zwischen dem 28. und 56. Lebenstag nahm der Anteil dieser Population in beiden Fütterungsgruppen ab, insgesamt erfährt diese Population aber nur wenige Veränderungen mit dem Alter der Tiere. Auch die Infektion mit Salmonellen hatte kaum einen Effekt auf den Prozentsatz der CD16<sup>+</sup>-Zellen in der Milz.

Im Darmepithel der Kontrolltiere blieb der Anteil der CD16<sup>+</sup>-Zellen im Epithel unverändert (18,7 ± 7,2 am 29. Lebenstag und 16,1 ± 4,3 am 56. Lebenstag). Bei den Probiotikum-Tieren waren diese Werte am 31. und am 56. Lebenstag etwas höher als bei den Kontrolltieren, aber auch hier erfuhr diese Population keine signifikanten Veränderungen. Die erhobenen Daten sind mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar (SCHAREK et al., 2005).

In den distalen Peyerschen Platten der Kontrolltiere schwankte der Anteil der CD16<sup>+</sup>-Zellen zwischen 3,9% ± 0,6 am 28. Lebenstag (3 Stunden nach der Salmonelleninfektion) und 5,5 % ± 2,7 am 31. Lebenstag (71 Stunden nach der Infektion). Die probiotische Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg der CD16<sup>+</sup>-Zellen. In jeder Altersklasse hatten die probiotisch behandelten Tiere signifikant höhere Werte als die gleichaltrigen Kontrolltiere. Es lässt sich vermuten, dass die Probiotika-Tiere aufgrund einer stärkeren Salmonellen-Belastung heftiger mit der Einwanderung von CD16<sup>+</sup>-Zellen in die distale PP reagierten. Diese Beobachtung unterstützt die Auffassung, dass der distalen PP eine induktive Rolle bei der Entstehung einer intestinalen Immunantwort zukommt.

Im den mesenterialen Lymphknoten (gemessen bei den 31 Tage alten Tieren) hatten die Kontrolltiere einen signifikant höheren Anteil an CD16<sup>+</sup>-Zellen als die probiotisch behandelten Tiere.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ferkel der Probiotikumgruppe signifikant weniger CD16<sup>+</sup>-Zellen in ihren mesenterialen Lymphknoten und tendenziell weniger im Darmepithel aufweisen, während der Anteil dieser Zellen in den distalen Peyerschen Platten signifikant höher war.

Bei den CD16<sup>+</sup>-Zellen beim Schwein handelt es sich um keine funktionell und morphologisch einheitliche Population. Die Gruppe der CD16<sup>+</sup>-Zellen beinhaltet Natural Killer (NK) Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) (YANG & PARKHOUSE, 1997;

ALLER et al., 1995; HAVERSON et al., 2001). Frühere Untersuchungen zeigten, dass die NK Zellen beim Schwein ein dem humanen CD16-Marker ähnliches Molekül exprimieren (ALLER et al., 1995). Spätere Studien zeigten, dass es sich bei Mensch und Schwein um ähnliche Expressionsmuster von CD16 handelt. Vor allem Monozyten, Makrophagen, DC und neutrophile Zellen sind CD16<sup>+</sup>. In den früheren Reifungsstadien exprimieren die Monozyten nur wenige CD16. Die Makrophagen und DC zeigen dagegen eine starke Expression (HAVERSON et al., 2000).

Nach der Bindung von IgG1- oder IgG3 an den Fc $\gamma$  Rezeptor III (CD16) wird ein zytotoxischer Angriff der NK-Zellen auf die mit Antikörpern überzogenen Zielzellen auslöst. Die Zerstörung von mit Antikörpern bedeckten Zielzellen durch natürliche Killerzellen bezeichnet man als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC).

Bei den Makrophagen und Neutrophilen erleichtert der FC $\gamma$ III-Rezeptor die Aufnahme und den Abbau von Pathogenen, welche zuvor mit den Antikörpern verbunden waren (vor allem mit IgG1 und IgG3). Die akzessorischen Zellen erkennen mit Hilfe des Fc-Rezeptors die mit den Antikörpern opsonisierten Pathogene. Ohne eigene Spezifität können die Makrophagen und neutrophilen Zellen die Erreger und deren Produkte erkennen und aus den extrazellulären Räumen des Körpers entfernen.

Nach der Bindung eines mit Antikörpern überzogenen Erregers an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche eines Phagozyten umschließt dieser das Partikel. Es kommt zur Endozytose, wodurch das Partikel in ein saures zytoplasmatisches Vesikel, das Phagosom, eingeschlossen wird. Das Phagosom verschmilzt dann mit einem oder mehreren Lysosomen zu einem Phagolysosom. Dabei werden die lysosomalen Enzyme ins Innere des Phagosoms freigesetzt, wo sie das Bakterium zerstören. Gegen mehrere Bakterien spp sind CD16<sup>+</sup>-Zellen wirksam (LEEMACARY et al., 2001). Z. B. sind Neutrophile in der Lage, Salmonellen zu phagozytieren (ZYCHLINSKY et al., 2003).

Weil die intestinalen Makrophagen kein CD14 exprimieren und auch keine proinflammatorischen Zytokine als Antwort auf Stimuli produzieren (SMITH et al., 2005; SMYTHIES et al., 2005), scheinen die Neutrophile verantwortlich zu sein für die Steigerung der initialen entzündlichen Reaktion gegen Salmonellen. Die Neutrophile wandern aus der Mukosa der jejunalen PP Richtung Darmlumen (HYLAND et al., 2006).

Besonders die Neutrophile werden durch IL-8 beeinflusst. Nach einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* stieg die IL-8 im *Jejunum* und *Ileum* und beeinflusste die Migration von Neutrophilen (ECKMANN et al., 1997).

Die Domregion der Peyerschen Platten befindet sich als „Brücke“ zwischen dem tiefer gelegenen und dem oberflächlichen Gewebe des Darms. PP beherbergen eine große Anzahl von T- und B-Zellen sowie nicht-lymphoiden Zellen (z. B. Makrophagen und Neutrophile) (MAKALA et al., 2002).

Über das Follikel-assoziierte Epithel der PP (FAE), das aus Enterozyten und M-Zellen besteht, dringen pathogene Keime in die Domregion ein. Sie kommen mit einer Vielfalt an Immunzellen in Kontakt, die fähig sind, gegen die eingedrungenen Keime vorzugehen. Die Makrophagen und DC haben die Fähigkeit, den Lymphozyten fremdes Antigen zu präsentieren und auf diesem Weg die humorale und zellvermittelte Immunantwort einzuleiten. In diesem Zusammenhang könnte die Erhöhung des Anteils an CD16<sup>+</sup>-Makrophagen in den distalen PP vorteilhaft für die humorale Immunantwort sein, denn die distale PP stellt den Hauptproduktionsort der B-Zellen dar, und ca. 80% der Lymphozyten in diesem Organ sind B-Zellen. Nach ihrer Aktivierung wandern die IgA<sup>+</sup> B-Zellen in die *Lamina propria*, wo sie Antikörper produzieren (ROTHKÖTTER et al., 1991).

Im Rahmen dieses Projektes bestimmten SZABÓ et al. (2008) die Konzentrationen von Salmonellen-spezifischem IgA, IgG und IgM im Serum beider Fütterungsgruppen. Die probiotisch behandelten Ferkel hatten höhere Titer an IgA und IgM und tendenziell mehr IgG im Serum (SZABÓ et al., Persönliche Mitteilung, 2008). Dies könnte die Folge der erhöhten Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen in den prox. PP, der Milz und den Tonsillen sein.

Vermutlich induzierte die Infektion mit Salmonellen in den Epithelzellen die Produktion bestimmter Zytokine, insbesondere IL-8 (JUNG et al., 1995). Diese Chemokine führen dann zur Rekrutierung von Immunzellen aus anderen Organen, in diesem Fall CD16<sup>+</sup>-Zellen aus Lymphknoten, Blut und Milz und zu ihrer Anreicherung in den distalen PP, wo sie benötigt werden, um die Salmonellen zu beseitigen.

Da die Probiotika-Tiere aufgrund der reduzierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Epithel eine höhere Salmonellen-Belastung hatten, fiel auch die Immunreaktion in diesen Tieren stärker aus, und es wurden mehr CD16<sup>+</sup>-Zellen in den dist. PP der Probiotika-Ferkel rekrutiert.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in dieser Arbeit der Anteil der CD25<sup>+</sup>-Zellen im Darmepithel der 29 und 31 Tage alten probiotisch behandelten Tieren höher war als bei ihren

gleichaltrigen Kontrolltieren, während in den proximalen PP und Lymphknoten der probiotisch behandelten Tiere weniger von diesen Zellen vorhanden waren. Mehr aktivierte T- und B-Zellen könnten die Folge einer durch Salmonellen induzierte IL-2-Produktion sein.

### **5.3. Integrative Analysen weiterer Ergebnisse innerhalb der Forschergruppe**

SZABÓ et al. (2008) bestimmten der Anzahl der Salmonellen-positiven Proben in verschiedenen Organproben und im Kot (qualitative Bestimmung): War bei diesen Analysen eine Organprobe Salmonellen-haltig, wurde darüber hinaus eine quantitative Bestimmung der Salmonellen durchgeführt (Keimzahl/g Probe). Darüber hinaus wurden rektale Temperatur und die Kotkonsistenz bei allen Versuchtieren bestimmt.

Unter den Kot- und Muskelproben (Muskulatur des Hinterbeins) der probiotisch behandelten Tiere befanden sich signifikant mehr Salmonellen-positive Proben. Hinsichtlich der Gewebeproben aus Leber, Niere, Milz und Lymphknoten (mandibulare und mesenteriale) konnte kein Effekt der probiotischen Fütterung festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Konzentration der Salmonellen in den positiven Proben hatten die probiotisch behandelten Tiere eine signifikant höhere Anzahl an Salmonellen im Kot, in den Tonsillen, im Colon (drei Stunden p.i.) und in der Muskulatur des Vorderbeins.

Die Messung der rektalen Temperatur und die Bestimmung der Kotkonsistenz ergaben keine signifikanten Unterschiede der Probiotika-Fütterung für die Dauer von 28 Tagen, beginnend mit dem Tag der experimentellen Salmonelleninfektion. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Salmonellen sich im Gewebe der mit dem Probiotikum gefütterten Tieren stärker verbreitet haben, was als Resultat einer schlechteren Immunabwehr aufgrund der Reduktion der CD8 $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup>-Lymphozyten im Blut und im Jejunumepithel gedeutet werden muss. Vor der Infektion mit Salmonella konnten keine Unterschiede (die Serum-Antikörper betreffend) zwischen den Tiergruppen festgestellt werden.

Im Institut für Tierernährung (FU Berlin) bestimmten TARAS und Mitarbeiter die Durchfallinzidenz, die Häufigkeit der Virulanzgene in Durchfallproben und verschiedene Leistungsparameter, wie z. B. den mittleren Futteraufwand, die mittlere Futteraufnahme und die mittlere tägliche Zunahme. Wie in früheren Untersuchungen mit dem gleichen Probiotikum (TARAS et al., 2008, persönliche Mitteilung) konnte durch die probiotische Fütterung die Durchfallinzidenz reduziert werden. Im Vergleich zu früheren Untersuchungen wurde bei der vorliegenden Arbeit eine höhere Dosis des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 an die Ferkel verfüttert. Die Reduzierung der Durchfallhäufigkeit in dem vorliegenden Versuch fiel deutlicher aus.

Die Analysen des mittleren Futteraufwandes, der mittleren täglichen Zunahme und der mittleren Futteraufnahme zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen (TARAS et al., 2008, persönliche Mitteilung).

#### **5.4. Mögliche Mechanismen der Immunmodulation durch Probiotika**

Durch welche Mechanismen die probiotische Behandlung die Reduzierung des Prozentsatzes der CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation bewirkt haben könnte, kann nur spekuliert werden. Ein möglicher Mechanismus könnte darin bestehen, dass milchsäurebildende Bakterien, wie das in dieser Arbeit als Probiotikum eingesetzte *Enterococcus faecium* NCIMB 10415, ungeeignet sind, die zytotoxische Aktivität zu induzieren und so zu einer Immunsuppression führen.

Damit die Probiotika immunmodulatorisch wirken können, müssen sie mit dem Immunsystem des Wirts in Kontakt treten. Im Gegensatz zu den Pathogenen sollten die probiotischen Bakterien als „harmlose“ Fremdartigene erkannt werden. Nur so kann ihre Ansiedlung im Darm toleriert werden. In diesem Zusammenhang spielen die dendritischen Zellen (DC) eine große Rolle. Sie sind wichtig in der Frühphase einer Immunantwort sowie für die Einleitung der T-Zellreaktion. Die direkte Interaktion der probiotischen Bakterien mit dem Immunsystem findet statt, wenn sie per Phagozytose aufgenommen werden. Antigene aus dem Darmlumen werden (unter anderem durch M-Zellen) in die Induktorregion der PP aufgenommen. DC aus der *Lamina propria* könnten darüber hinaus durch tight junctions des Epithels hindurch Antigen aus dem Lumen aufnehmen. Nach der Aufnahme gelangen die Antigene über die Lymphdrainage in den mesenterischen Lymphknoten. Nach Verzehr von Probiotika konnten phagozytierte probiotische Bakterien sowohl in der *Lamina propria* (Kryptenbereich) als auch in den PP (IBNOU-ZEKRI et al., 2003; MEDICI et al., 2004) und in den mesenterischen Lymphknoten nachgewiesen werden (IBNOU-ZEKRI et al., 2003).

Mehrere Studien haben belegt, dass der Kontakt der Probiotika mit den DC der erste Schritt ist für eine spätere Immunmodulation durch die Probiotika. In einer in vitro-Studie konnte gezeigt werden, dass *L. rhamnosus* die Reifung der DC induzieren. Bringt man die so gereiften DC mit naiven T-Zellen zusammen, verhalten sich die so geprägten T-Zellen hyporesponsiv bis anergisch, sie proliferieren weniger, exprimieren aber mehr Aktivierungsmarker (BRAAT et al., 2004). In einer ähnlichen Studie bestätigten sich diese Beobachtungen. Es kam außerdem zum Rückgang der IL12-Sekretion, was wiederum eine Inhibierung proinflammatorischer Th1-Zellen bewirkte. Die Autoren beobachteten zudem, dass es zu keinem Wechsel zu Th2-Zellen kam, da die Sekretion von typischen Th2-Zytokinen fehlte. Diese Ergebnisse sprechen daher für die Entwicklung einer regulatorischen T-Zellpopulation und

für die Induktion immuologischer Ignoranz gegenüber dem Probiotikum. Aber auch eine Expansion der bereits vorhandenen regulatorischen T-Zellen nach der Inkubation der DC mit dem Probiotikum ist möglich (HART et al., 2004). Die Induktion regulatorischer Mechanismen hängt stark vom eingesetzten Probiotikum ab (Genus, Spezies und sogar Stamm). Wobei Bifidobakterien bei der Toleranzentwicklung stärker zu agieren scheinen als Laktobazillen (HART et al., 2004; RIGBY et al., 2005).

Andererseits scheinen verschiedene Probiotika bei der Induktion der humoralen Immunantwort gegen andere Antigene als Adjuvans zu fungieren, da sie einen erhöhten Antigentransport, eine verstärkte Antigenpräsentation sowie eine Induktion von co-stimulatorischen Molekülen bewirken (GILL, 2003). Auch die Aktivität der NK-Zellen wird von den Probiotika beeinflusst. Bei einem in vitro-Versuch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NK-Zellen aus dem Blut nur dann möglich ist, wenn Monozyten nach der Aufnahme probiotischer Bakterien co-stimulatorische Signale erzeugen (HALLER et al., 2002a). Aber auch nicht phagozytierte Probiotika konnten Immunreaktionen modulieren. Von besonderer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die intestinalen Epithelzellen, da sie ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. Durch die Ansiedlung im Darm treten die probiotischen Bakterien mit den Darmepithelzellen in Kontakt. Die intestinalen Epithelzellen reagieren auf proinflammatorische Reize mit der Ausschüttung von Chemokin IL-8, das die Migration der Neutrophile in die Infektionsherde und die Entwicklung entzündlicher Prozesse begünstigt. Das Probiotikum *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) kann die Entwicklung einer TNF- $\alpha$ -induzierten entzündlichen Reaktion durch Verminderung von IL-8 Sekretion (ZHANG et al., 2005) und somit eventuell auch chronisch entzündlichen Erkrankungen entgegenwirken. Die intestinalen Epithelzellen können auf Bakterien sehr unterschiedlich reagieren, je nachdem, ob es sich um pathogene, kommensalische oder probiotische Bakterien handelt. Diese Antwort der Epithelzellen hängt sogar vom Stamm des eingesetzten Probiotikums ab (JIJON et al., 2004). Die Freisetzung von Chemokinen durch Enterozyten kann durch verschiedene Probiotika induziert werden. Diese Induktion hängt aber von der Anwesenheit der Lymphozyten ab (HALLER et al., 2000).

Neben intestinalen Epithelzellen, gehören intraepitheliale Lymphozyten (IEL) zu den ersten Zellarten, mit denen probiotische Bakterien in Kontakt treten. Die IEL als wichtige Effektorpopulation des Darms bilden mit den Enterozyten ein immunologisches Netzwerk, das wiederum in Kontakt mit den probiotischen Bakterien steht. In diesem Zusammenhang liefern auch die Monozyten wichtige stimulatorische Signale. In Co-Kulturexperimenten mit Enterozyten, Blutlymphozyten und Probiotika wurde die Freisetzung von regulatorischem TGF- $\beta$

angeregt (HALLER et al., 2000). Die gleichzeitige Inhibition pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- konnte jedoch nur in Anwesenheit von Monozyten erzeugt werden (HALLER et al., 2002b).

Zwar verlangt die Definition von Probiotika, dass die Bakterien lebend in den Darm gelangen, um probiotische Effekte auslösen zu können, jedoch scheinen auch nicht-vitale Probiotika oder sogar nur bakterielle Bestandteile oder Metaboliten immunmodulatorisch wirken zu können (GALDEANO & PERDIGON, 2004; MÉNARD et al., 2004; RACHMIELEWITZ et al., 2004; TAKAHASHI et al., 1993). Es ist allerdings weitgehend unbekannt, welche bakteriellen Bestandteile nötig sind, um die Immunmodulation zu bewirken, wie immunkompetente Zellen diese Strukturen erkennen und welche molekularen Prozesse nach der Erkennung ausgelöst werden. Hitzeinaktive Laktobazillen konnten bei intraperitonealer Gabe an BALB/c-Mäuse die NK-Aktivität verstärken (KATO et al., 1984). Nach oraler Gabe von mit Hitze behandelten Laktobazillen an Mäuse erhöhte sich stammspezifisch die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen im Dün- und Dickdarm (GALDEANO & PERDIGON, 2004). LGG konnte sowohl nach Hitzeinaktivierung als auch als lebendes Bakterium anti-inflammatorische Effekte bei Ratten auslösen (BAHARAV et al., 2004). Die intraperitoneale Gabe der Zytoplasmafraktion von *L. lactis* an Mäuse stimuliert sowohl die NK-Aktivität als auch die Sekretion von IFN- und IL-12, während die Zellwand von *L. lactis* die Phagozytoseaktivität der Peritonealmakrophagen verstärkte. Demnach wurden beide Prozesse der angeborenen Immunabwehr durch unterschiedliche Zellfraktionen stimuliert. In einer Studie von TAKAHASHI et al. (1993) wurden in vitro der Einfluss der Zellwand oder des Zytoplasmas probiotischer Bakterien auf die Proliferation und auf die Antikörperproduktion von Immunzellen aus PP und Milz untersucht. Während bei *L. acidophilus* Zytoplasma und Zellwand immunogen wirkten, war bei *L. longum* nur die Zytoplasmafraktion immunologisch wirksam. Demnach unterscheidet sich die Immunogenität der Zellwand bei diesen beiden Keimen oder sogar bei diesen beiden Spezies grundsätzlich (TAKAHASHI et al., 1993).

Auch innerhalb des Genus der Bifidobakterien gibt es – das immunmodulatorische Potenzial betreffend – Unterschiede, was anhand des Zytokinprofils, das diese Bakterien in Co-Kultur mit Makrophagen erzeugt, bewiesen wurde (HE et al., 2002). So induzierten Bifidobakterien, die mit der Bifidusflora gestillter Kinder assoziiert werden - nämlich *B. infantis*, *B. bifidum* und *B. breve* - die IL-10-Produktion, also eine regulatorische Immunantwort. Hingegen stimulieren Bifidobakterien, die in der adulten Bifidusflora vorkommen, insbes. *B. adolescentis* und *B. longum* mehr pro-inflammatorische Zytokine. Tatsächlich unterscheiden sich diese Bakterienspezies in der Zusammensetzung ihrer Zellwand. Generell enthält die Zellwand

grampositive Bakterien (z. B. *Lactobacillus spp.* oder *Bifidobacterium spp.*) eine dicke Peptidoglykanschicht, die auf die Zytoplasmamembran aufgelagert ist. In diese Schicht sind Teichonsäuren bzw. Lipoteichonsäuren integriert, die nur bei grampositiven Bakterien vorkommen. Das „Muster“ dieser Bestandteile in der Zellwand kann allerdings zwischen bakteriellen Spezies und Stämmen variieren. Zudem können Unterschiede in den Zellwandbestandteilen beim selben Stamm auch in unterschiedlichen Wachstumsphasen variieren. Weiterhin unterschieden sich Bakterien hinsichtlich ihres Anteils an CpG-Oligodesoxynucleotiden in der bakteriellen DNA. Dabei handelt es sich um Oligodesoxynucleotide (Cytidin-Guanosin-Dinucleotide), welches ein phosphoryliertes Rückgrat bildet und in Bakterien meist unmethyliert vorliegt. Tatsächlich kann eine Immunmodulation allein durch diese Strukturen induziert werden. Zielstrukturen auf Immunzellen sind hauptsächlich Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Immunzellen (vor allem TLR9). Lipoteichonsäuren sind Liganden für CD14 und TLR2 (HORNUNG et al., 2002). CD14 ist ein Rezeptor für einen Komplex aus Lipopolysacchariden (LPS) und einem Lipopolysaccharid-bindenden Protein, er wird hauptsächlich auf Granulozyten und Monozyten exprimiert (DATO et al., 1992; HAVERSON et al., 1994). Auch Peptidoglykan wird von TLR2 erkannt (DZIARSKI et al., 2003).

Das Fehlen einer Methylierung bei der bakteriellen CpG-DNA ist verantwortlich für die Stimulation von TLR9 (LATZ et al., 2004).

Die enzymatischen Spaltprodukte von Peptidoglykan und Muramyldipeptid wirken ebenfalls immunogen und binden an NOD-Protein 2 (NOD2, nucleotide-binding oligomerization domain), ein intrazelluläres Protein. Mutationen im NOD-Gen scheinen mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn verknüpft zu sein (GIRARDIN et al., 2003; INOHARA et al., 2003).

*L. plantarum*, der eine TLR2- vermittelte pro-inflammatorische Reaktion induziert, kann bei geringem Gehalt an D-Alanin der Lipoteichonsäuren anti-inflammatorische Reaktionen induzieren. CpG-DNA-Motive aus probiotischen Bakterien aktivieren im GALT TLR9+ dendritische Zellen (DC), die IFN- ausschütten, was zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Tr-Zellen) führt (RACHMILEWITZ et al., 2004).

CpG-DNA-Motive können nach Kontakt mit Blutlymphozyten diese zur anti-inflammatorischen Reaktion anregen (LAMMERS et al., 2003). CpG-DNA-Motive aus *Lactobacillus rhamnosus* GG führen in vitro zur Proliferation von B-Zellen und zur Induktion der DC. In der Milz hingegen wurden pro-inflammatorische Reaktionen induziert (LLIEV et al., 2008).

Die Immunzellen in den PP und den mesenterialen Lymphknoten beim Schwein exprimieren in hohem Maße den TLR9 (SHIMOSATO et al., 2005). In vitro-Versuche zeigten, dass LGG in einer Zelllinie HT29 der Darmenterozyten die Expression von TLR9 induzieren kann (VIZOSO-PINTO, 2006). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass zumindest bestimmte Probiotika ihre Wirkung über CpG-DNA und deren Interaktion mit TLR9 vermitteln. Im Darm spielen die CpG-DNA-Motive wahrscheinlich eine große Rolle in der Immunmodulation, da dort große Mengen freier DNA durch Freisetzung aus letalen Keimen im Darmlumen vorkommen.

Neben Zellwandbestandteilen können auch bakterielle Metabolite probiotischer Bakterien anti-inflammatorische Reaktionen erzeugen. Ein nicht sehr genau definiertes Molekül (kein Protein, unter 3kDa) wird von wenigen Bakterien freigesetzt und führt schon in sehr kleinen Mengen zur Immunmodulation (MÉNARD et al., 2004). Diese Substanz interagiert nicht mit Enterozyten, vielmehr erzielt sie ihre Wirkung nach Übertreten der Darmbarriere (para- oder transzellulär). Bei *Lactobacillus rhamnosus* GG werden die immunmodulatorischen Eigenschaften im Zusammenhang mit sog. Immunomodulinen diskutiert. Es handelt sich dabei um Moleküle, die in post-transkriptionalen Prozessen die LPS-induzierte Ausschüttung von TNF inhibieren. Dabei handelt es sich um einen serum- und kontaktunabhängigen Prozess durch LGG-Metaboliten, die nicht näher charakterisiert sind (PEÑA & VERSALOVIC, 2003). Probiotika haben aber auch einen direkten Einfluss auf die Genexpression bzw. Signaltransduktion im Nukleus. Mittels DNA-Mikroarray konnte nachgewiesen werden, dass der Verzehr von LGG die Genexpression mehrerer immunologisch relevanter Proteine im Duodenum moduliert, dazu gehören die inhibierte Expression des NK-Rezeptors 2B4 (CD244), die Induktion von TGF- $\beta$  und des IL-10-Rezeptors IL-10R (DI CARO et al., 2005).

Mehrfach wurde beschrieben, dass die Aktivierung oder Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der für die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine sorgt, durch Probiotika beeinflusst wird. LGG induziert in Makrophagen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, vermutlich über TLR2.

STAT1 und STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription) sind zytosolischen Transkriptionsfaktoren, die für die Expression des IL-10-Rezeptors verantwortlich sind. Und ebenfalls durch LGG aktiviert werden (MIETTINEN et al., 2000). LGG inhibiert die TNF-induzierte IL-8-Ausschüttung von Enterozyten, da LGG die Aufrechterhaltung der zytosolischen I- $\kappa$ B-Konzentration bewirkt und dadurch die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nucleus inhibiert (ZHANG et al., 2005).

Systemische immunmodulierende Effekte der Pro-Supplementation wurden bei den Untersuchungen am Schwein sowie in zahlreichen anderen Studien festgestellt, bei denen Effekte außer im Blut auch im peripheren Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (Nasen-Rachen-Raum, Urogenitaltrakt) aufgetreten sind. Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, dass nur 2% des kompletten Lymphozytenpools des Körpers sich zu einem bestimmten Zeitpunkt im Blutkreislauf befinden. Das unterschiedliche Migrationsverhalten naiver, Gedächtnis- oder Effektorzellen sollte beachtet werden, denn letztere sind meist auf bestimmte Gewebe beschränkt. Daher ist die systemische Wirkung der Probiotika anhand der Bestimmung von Immunzellpopulationen im Blut relativ schwierig nachzuweisen

Im Darm aufgenommenes Antigen, inkl. probiotisches Antigen kann die Barriere zwischen GALT und Peripherie, die durch die mesenterialen Lymphknoten aufgebaut wird, nicht passieren. Allerdings können aus dem Kontakt mit Probiotika differenzierte Zellen das GALT, über efferente Lymphbahnen, die von den mesenterialen Lymphknoten abwandern, verlassen und die Blutzirkulation erreichen, also in den systemischen Bereich des Immunsystems vordringen.

Der Blutstrom fließt durch die Milz, daher überqueren ca. 50% der gesamten Lymphozyten, die sich im Blut befinden, täglich die Milz, so dass auch dieses Immunorgan mit T-Zellen aus dem GALT in Berührung kommen kann (PABST & BINNS, 1989b). Allerdings können systemische Effekte auch durch CpG-DNA-Motive, die in die Peripherie gelangt sind, induziert werden. Es wurde beschrieben, dass CpG-DNA im oberen Dünndarm resorbiert wurde und in der Milz nachweisbar war. Die Kinetik der Resorption korrelierte dabei mit Signalen der TLR-Transduktion. Da DNA im Dickdarm, wo generell eine hohe Bakteriendichte an kommensalen Keimen herrscht, nicht resorbiert wird, haben die Probiotika gegenüber der endogenen Flora einen entscheidenden Vorteil, da sie in hoher Zahl, wenn auch nur im Transit bei der Darmpassage, im Dünndarm vorkommen, wo ihre CpG-DNA aufgenommen werden kann (RACHMILEWITZ et al., 2004).

### **5.5. Einordnung der Ergebnisse und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 die Immunantwort modulieren vermag. Es konnte ein negativer Einfluss auf die Population der CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden, der bereits vor der Infektion mit *Salmonella* in Erscheinung trat. Die Reduktion der CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation hatte wiederum Auswirkungen auf die Verbreitung der Salmonellen in den abgesetzten Ferkeln. Diese modulatorische Eigenschaft scheint nicht nur auf den Darm beschränkt zu sein, denn die Auswirkungen

der probiotischen Behandlung waren auch im Blut und in der Milz zu verzeichnen. Die stärkere Salmonellen-Infektion der mit behandelten Tiere wurde von einer signifikant stärkeren Immunreaktion gegen die Pathogene beantwortet, führte aber zu keiner schnelleren Beseitigung der Salmonellen.

Um die Fragen zu beantworten, ob nur bestimmte Komponenten des Probiotikums *Enterococcus faecium* oder das intakte vitale Bakterium für die Immunmodulation verantwortlich sind, und welcher Mechanismus zur Reduktion der CD8 $\alpha\beta^+$ -Zellen führt, sind Folgeuntersuchungen notwendig.

### 6. Zusammenfassung

„Untersuchungen zu immunmodulatorischen Eigenschaften des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF 68) auf die zelluläre Immunität beim Schwein während eines Experiments mit *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104“

Die Futterzusatzstoffe, die in der Tierproduktion eingesetzt werden, um die Leistungsparameter der Tiere zu verbessern, sind vielfältig. Probiotika werden als lebende Mikroorganismen definiert, die auf die Gesundheit des Wirtsorganismus (Menschen oder Tiere) positiv Einfluss nehmen. In der Nutztierhaltung und der Humanernährung werden Probiotika erfolgreich eingesetzt sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die mit der Nahrung aufgenommenen probiotischen Bakterien die Immunantwort sowohl im Darm als auch systemisch modulieren können. Der Einsatz von bestimmten Probiotika bewirkt einen gewissen Schutz gegen Darmpathogene. Die dieser Wirkung auf das Immunsystem zugrunde liegenden Mechanismen sind aber zum größten Teil noch unbekannt. Daher werden zahlreiche Wirkungsmechanismen postuliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Tiermodell Schwein untersucht, inwiefern das Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF 68) (Cylactin®) während einer experimentellen Infektion mit *Salmonella typhimurium* DT 104 die zelluläre Immunantwort sowohl systemisch als auch lokal in Effektor- und Induktorregionen des Darm-assoziierten Immunsystems beeinflusst.

Zur Untersuchung der systemischen Immunantwort wurden Proben aus der Milz, dem Blut und aus den Tonsillen herangezogen. Aus den Darm-assoziierten Bereichen wurden Immunzellen aus den jejunalen und ilealen Peyerschen Platten (proximale und distale PP), aus den mesenterialen Lymphknoten, sowie die intraepitheliale Lymphozyten des proximalen Jejunum (IEL) isoliert.

Zehn Muttersauen (Duroc x Deutsche Landrasse) und ihre Würfe wurden zufällig einer Versuchsgruppe (mit Probiotikumsupplementierung) oder Kontrollgruppe (ohne Probiotikumsupplementierung) zugeteilt. Die Sauen der Versuchsgruppe erhielten das Probiotikum vom 90. Tag vor der Geburt bis zum 28. Tag nach der Geburt. Ihre Ferkel wurden vom 14. bis einschließlich 56. Lebenstag mit den probiotischen Kulturen gefüttert, bei ansonsten gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen der Probiotika- und Kontrolltiere. Aus jedem Wurf wurden am 28. Lebenstag zufällig neun Ferkel ausgewählt, mit *Salmonella*

*typhimurium* DT 104 infiziert und 3, 24, 71 Stunden bzw. 28 Tage nach der Infektion getötet und beprobt (insgesamt 78 Ferkel).

Es wurden Blutproben aus den *Vena jugularis* am 21. Lebenstag und kurz vor der Tötung der Tiere entnommen. Nach der Tötung wurden Proben aus dem proximalen Jejunum, jejunalen und ilealen Peyerschen Platten, Milz, Tonsillen und Lymphknoten entnommen. Aus den Organproben wurden anschließend Immunzellen isoliert. Nach Markierung mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden mittels Durchflußzytometrie die relativen Anteile ausgewählter Immunzellpopulationen bestimmt.

Signifikante Effekte der Fütterung mit dem Probiotikum betrafen vor allem die CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und CD16<sup>+</sup>-Subpopulationen.

Im Darmepithel (alle Alterklassen), in der Milz (am 29. Lebenstag), den prox. PP (am 29. Lebenstag) und im Blut (alle Altersklassen) sank durch die probiotische Behandlung der Anteil der CD8<sup>+</sup>-Zellen. Dieser Effekt des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 betraf vor allem die CD8 $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen, welche eine besondere Population der zytotoxischen Zellen darstellen. Auch Anteil der gesamten Immunzellen im Darmepithel, gemessen anhand der Bestimmung des Prozentsatzes an CD45<sup>+</sup>-Zellen, war in der Probiotikumgruppe signifikant niedriger. Es ist daher nicht von einer bloßen relativen Abnahme der CD8<sup>+</sup>-Zellen und einer Verschiebung des prozentualen Anteils innerhalb der gesamten Immunzellen auszugehen, sondern bedeutet eine Reduktion der absoluten Zahl an CD8<sup>+</sup>-Zellen im Darmepithel.

Die probiotische Behandlung führte nach der Infektion (*p.i.*) zu einem signifikant höheren Prozentanteil der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Lymphozyten in der Milz (alle Altersgruppen *p.i.*), den proximalen Peyerschen Platten (alle Altersgruppen *p.i.*) sowie zu einem signifikant höheren Prozentanteil der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten in den Tonsillen (56 Tage alte Ferkel).

Der relative Anteil der CD16<sup>+</sup>-Zellen in den distalen Peyerschen Platten der Versuchsgruppe war signifikant erhöht, hingegen in den mesenterialen Lymphknoten signifikant erniedrigt.

In den Tonsillen führte die probiotische Zufütterung zu einem tendenziell höheren Prozentanteil an CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>-Zellen.

Die Ergebnisse eines parallelen Teilprojekts derselben Forschergruppe (BfR, Berlin), bei dem Proben aus den gleichen Tieren verwendet wurden wie in dieser Arbeit, zeigten, dass in der mit *E. faecium* SF68 gefütterte Ferkelgruppe eine stärkere Besiedlung unterschiedlicher Organe mit *S. typhimurium* festgestellt wurde.

## Zusammenfassung

---

Aufgrund der zeitlichen Abfolge und des Verlaufes muss angenommen werden, dass die Erhöhung der verschiedenen Immunzellpopulationen in der Probiotikagruppe eine Reaktion auf die stärkere Salmonellose darstellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium NCIMB 10415* sowohl die lokale als die systemische zelluläre Immunantwort beeinflusst. Vor allem in den ersten sechs Lebenswochen sind die Auswirkungen der probiotischen Behandlung deutlich. Gegen Salmonelleninfektionen scheint die Supplementierung keinen Schutz zu bieten. Sie verstärkt möglicherweise die Translokation der Pathogene. Der Anteil der für die Beseitigung der intrazellulären Salmonellen sehr wichtigen CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation wird durch die Behandlung mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium NCIMB 10415* reduziert, dies könnte negativ Auswirkung auf die Beseitigung der Salmonellen haben.

## 7. Summary

„Assessment of immunomodulatory properties of the probiotic feed-additives *Enterococcus faecium* NCIMB 10 4 15 (SF 68) on the local and systemic cellular immunity of pigs in an infection challenge model with *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* DT104”

Numerous feed additives are in use to enhance performance parameters in animal production. In recent years, probiotics have gained increased interest as feed supplements as restrictions on the use of antibiotics have become more rigorous. Probiotics are defined as living microorganisms capable of positively influencing the health of the recipient. For animals and humans, probiotics are already successfully in use for both prophylactic and therapeutic uses. Numerous studies indicate that probiotic feed additives show a modulatory effect on the immune system, both intestinal as well as systemic. Selected probiotics are being credited with increasing the resistance against gastrointestinal pathogens.

The mechanisms responsible for the positive influence of probiotics is as yet not clearly understood, although numerous possibilities have been given discussion.

In this work, the influence of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) during an experimental infection with *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* DT104 in a porcine animal model was studied.

The influence of the probiotic on the cellular immune response of the intestine-associated immune system was investigated both locally and systemically. To examine the systemic immune response, samples were taken from the spleen and the peripheral blood of the piglets. To investigate the local immune response, immune cell samples were taken from the jejunal and ileal Peyer's patches (proximal and distal), from mesenteric lymph nodes and tonsils. In addition, epithelial cells and intraepithelial lymphocytes (IEL) isolated from the proximal jejunum were also investigated.

Ten sows (Duroc x Deutsche Landrasse) and their litters were randomly divided into a trial (supplementation with probiotics) and a control groups (without probiotics). Sows received probiotic feed supplements from 90 days ante partum to 28 days post partum. Piglets received probiotics from day 14 to day 56. Apart from the probiotic feed supplementation, trial and control groups were fed and housed identically.

From each litter, nine, 28 day-old piglets were randomly chosen for infection with *Salmonella typhimurium*. The infected piglets were sacrificed 3, 24, and 71 hours and 28 days after infection respectively (78 piglets all in all) for immune cell preparations. Purified immune cells were isolated, incubated with fluorescence-conjugated antibodies and flow cytometry was performed to determine relative percentages of chosen immune cell populations. Blood

## Summary

---

immune cells were prepared from samples taken from the *Vena jugularis* and purified using standard density gradients.

The results indicated that feed supplementation with the *Enterococcus faecium* probiotic significantly affected the CD4+, CD8+ and CD16+ immune cell sub-populations. In the intestinal epithelium (at all investigated time points), in the spleen (at day 29), in the proximal PP (at day 29), and in the blood (at all investigated time points), the percentage of CD8+ cells was decreased. This effect of the *Enterococcus faecium* probiotic mainly affected CD8 $\alpha\beta$ + cells, a sub-population of cytotoxic T cells. Moreover, there was a significantly lower percentage of CD45+ lymphocytes in the jejunal epithelium of the probiotic piglets, indicating a decline in absolute numbers of lymphocytes in the epithelium. This reduction appeared to have negative consequences for the immunity against *S. typhimurium*. Determinations of another research group with the same animals revealed that the probiotic-treated animals showed a more severe infection with *Salmonella* compared to the control animals (personal communication, I. Szabó)

Post-infection (*p.i.*) with *Salmonella*, the probiotic-supplemented animals showed a significantly higher proportion of CD4+ CD8<sup>-</sup> lymphocytes in the spleen (at all time points *p.i.*), in the proximal PP (at all time points *p.i.*), and a significantly higher percentage of CD4+ cells in the tonsils (four weeks *p.i.*). The frequency of CD16+ cells in the distal PP was significantly increased in the probiotic group, while it was significantly lower in the mesenteric lymph nodes. In the tonsils, the probiotic treatment showed a tendency toward elevated proportions of CD8+ T cells and  $\gamma\delta$  T-cells. Based on the temporal course of the observed changes in immune cell populations, the increase in several immune cell populations appears to result from a reaction to a more severe infection with *Salmonella*.

The results of this study show that the treatment with probiotics as feed supplement influences the local and systemic immune response to pathogens. This is most notable during the first six weeks of life. However, probiotic supplementation did not appear to support an increased immune defense against a *Salmonella* infection. The observed reductions in the CD8+ immune cell population would most likely weaken the defense against *Salmonella*. The data therefore suggest a negative influence of *Enterococcus faecium* on the population of CD8 $\alpha\beta$ + cytotoxic T-cells followed by a stronger translocation of *Salmonella* Typhimurium DT104.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (1996):  
Immunologie.  
2. Aufl., Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle
- Abreu-Martin MT, Targan SR. (1996):  
Regulation of immune responses of the intestinal mucosa.  
Crit Rev Immunol. **16** (3), 277-309
- Aggarwal A, Kumar S, Jaffe R, Hone D, Gross M, Sadoff J. (1990):  
Oral Salmonella: malaria circumsporozoite recombinants induce specific CD8+cytotoxic T cells.  
Exp Med. **172** (4), 1083-1090
- Alakomi HL, Mättö J, Virkajärvi I, Saarela MJ. (2005):  
Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations.  
Microbiol Methods. **62** (1), 25-35
- Alander M, Satokari R, Korpela R. (1999):  
Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption.  
Applied and Environmental Microbiology. **65**, 351-354
- Alexopoulos C, karagiannidis A, Kritas SK, Georgoulakis IE, Kyriakis SC. (2001):  
Field evaluation of a bioregulator containing live *Bacillus cereus* spores on health status and performance of sows and their litters.  
J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. **48** (3), 137-145
- Aller SC, Cho D, Kim YB. (1995):  
Characterization of the cytolytic trigger molecules G7/PNK-E as a molecular complex on the surface of porcine phagocytes.  
Cell Immunol. **161** (2), 270-278
- Alpuche-Aranda CM, Berthiaume EP, Mock B, Swanson JA, Miller SI. (1995):  
Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility.  
Infect Immun. **63** (11), 4456-4462
- Altherr B. (2005):  
Untersuchung zum Einfluss von *Bacillus cereus* var. *Toyoi* auf die zelluläre Immunität des Schweins.  
Vet. med. Diss., Freie Universität Berlin
- Audisio C, Oliver G, Apella, MC. (1999):  
Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp.  
Arch. Geflügelk. **68**, 160-163
- Audisio C, Oliver G, Apella MC. (2000):  
Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*  
J. Food Prot. **63**, 1333-1337
- Baharav E, Mor F, Halpern M, Weinberger A. (2004):  
*Lactobacillus* GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats.  
J Nutr. **134** (8), 1964-1969
- Bailey M, Karin Stevens K, Paul W, Bland PW, Stokes CR. (1992):  
A monoclonal antibody recognising an epitope associated with pig interleukin-2 receptors.  
J Immunol Methods. **153**, 85-91
- Bassaganya-Riera J, Hontecillas R, Zimmerman DR, Wannemuehler MJ. (2001):  
Dietary conjugated linoleic acid modulates phenotype and effector functions of porcine CD8+ lymphocytes.  
J Nutr. **131**(9), 2370-2377
- Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. (2004):  
Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease.  
Gastroenterology. **127** (3), 777-791

## Literaturverzeichnis

---

- Bellomo G, Mangiagle A, Nicastrò L, Frigerio G. (1980):  
A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics.  
*Current Therapeutic Research*, **28**, 927-934
- Bennell MA, Husband AJ (1981):  
Route of lymphocyte migration in pigs. I. Lymphocyte circulation in gut-associated lymphoid tissue.  
*Immunology*. **42** (3), 469-474
- Benyacoub J, Pérez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, Antille N, Humen M, De Antoni GL, Cavadini C, Blum S, Schiffrin EJ (2005):  
Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice.  
*J Nutr*. **135**(5), 1171-1176
- Berg, R. (1988):  
Angewandte und topographische Anatomie der Haustiere.  
3. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- Bernardeau M, Vernoux JP, Gueguen M. (2002):  
Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice.  
*Int J Food Microbiol*. **77** (1-2), 19-27
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. (1994):  
Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria.  
*Gut*. **35** (4), 483-489
- Besser TE, Gay CC, Gay JM, Hancock DD, Rice D, Pritchett LC, Erickson ED. (1997):  
Salmonellosis associated with *S typhimurium* DT104 in the USA.  
*Vet Rec*. **140** (3), 75-81
- Bienenstock J, McDermott M, Befus D, O'Neill M. (1978):  
A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel.  
*Adv Exp Med Biol*. **107**, 53-59
- Binns RM. (1982):  
Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **3**, 95-146
- Binns RM. (1994):  
The Null / TcR+ T cell family in the pig.  
*Vet. Immunol. Immunopathol*. **43**, 69-77
- Binns RM, Duncan SJ, Powis A, Hutchings, Butcher G. (1992):  
Subsets of null and T-cell receptor+ T-lymphocytes in the blood of young pigs identified by specific monoclonal antibodies.  
*Immunology* **77**, 219-227
- Binns RM, Licence ST. (1985):  
Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: Evidence of two types of Peyer's patch in the young pig.  
*Adv. exp. Med. Biol*. **186**, 661-668
- Binns RM, Pabst R. (1988):  
Lymphoid cell migration and homing in the young pig: Alternative immune mechanisms in action. In: A.J. Husband (Hrsg.):  
Migration and homing of lymphoid cells.  
CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, Vol. II, S. 137-174
- Binns RM, Pabst R. (1994):  
Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **43** (1-3), 79-87.
- Blaha T. (1993):  
Die Ausbreitungsdynamik von Salmonellen in Tierbeständen.  
*Dtsch. Tierärztl. Wochenschr*. **100**, 278-280
- Blaha T. (2002):  
Das Salmonellenmonitoring- und reduzierungsprogramm für die Schweinefleischproduktion im Rahmen des QS- Prüfzeichens.  
*Prakt. Tierarzt, BPT inf*. **83**, 13-16

- Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Buhlman J, Xu J, Flavell RA, Korngold R, Noelle R, Vallera DA. (1997):
- Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol.* **158** (1), 29-39
- Blouin C, Higgins R, Gottschalk M, Simard J. (1994):  
Evaluation of the antibody response in pigs vaccinated against *Streptococcus suis* capsular type 2 using a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.  
*Can J Vet Res.* **58** (1), 49-54
- Bodmer JG, Bodmer WF. (1984):  
Monoclonal antibodies to HLA determinants.  
*Br Med Bull.* **40** (3), 267-75
- Boeker M, Pabst R, Rothkötter HJ. (1999):  
Quantification of B, T and Null Lymphocyte Subpopulations in the Blood and lymphoid Organs of the Pig.  
*Immunobiol* **201** (1), 74-87
- Boersma WJ, Zwart RJ, Sinkora J, Rehakova Z, Haverson K, Bianchi AT. (2001):  
Summary of workshop findings for porcine B-cell markers.  
*Vet Immunol Immunopathol.* **80** (1-2), 63-78
- Borrueil N, M Caroli M, Casellas F, Antolín M, De Lara F. (2002):  
Increased mucosal tumour necrosis factor production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria  
*Inflammatory bowel disease gut* (**51**), 659-664
- Brandão RL, Castro IM, Bambirra EA, Amaral SC, Fietto LG, Tropaia MJ, Neves MJ, Dos Santos RG, Gomes NC, Nicoli JR. (1998):  
Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Appl Environ Microbiol.* **64** (2), 564-568
- Brandtzaeg, P. (1998):  
Development and basic mechanisms of human gut immunity.  
*Nutr. Rev.* **56**, 5-10
- Brandtzaeg P, Pabst R (2005):  
Let's go mucosal: communication on slippery ground. Laboratory for Immunohistochemistry and Immunopathology.  
*Trends Immunol.* **26** (1), 12-17
- Breves G. (2004):  
Probiotische Mikroorganismen und ihre zellulären Wirkungsmechanismen *Mikrobiologie und Tierernährung.*  
20. Hülsenberger Gespräche, Lübeck, Schriftenreihe der Wilhelm Schaumann Stiftung, 9-13  
*Trends Immunol.* **26** (1), 12-17
- Breves G, Hattenhauer O, Schöneberger M, Winckler C. (1997):  
Untersuchungen zum Einfluss von Probiotika auf die intestinale Glukose- und Alanin-aufnahme beim Schwein.  
*Proc Soc Nutr Physiol.* **6**, 45-50
- Breves G, Walter C, Burmester M, Schröder B. (2000):  
In vitro studies on the effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum.  
*J Anim Phys Anim Nutr.* **84**, 9-15
- Brodersen R, Bijlsma F, Gori K, Jensen KT, Chen W, Dominguez J, Haverson K, Moore PF, Saalmüller A, Sachs D, Slierendrecht WJ, Stokes C, Vainio O, Zuckermann F, Aasted B. (1998):  
Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species.  
*Vet Immunol Immunopathol.* **64** (1), 1-13.
- Brown DR, Price LD. (2007):  
Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine.  
*Vet Microbiol.* **120** (3-4), 328-333

## Literaturverzeichnis

---

- Brown DR, Terris JM. (1996):  
Swine in physiological and pathophysiological research.  
M. Tumbleson and L.B. Schook, Editors.  
Advances in Swine in Biomedical Research  
Plenum Press, vol. 1, New York 5–6
- Brown PJ, Bourne FJ. (1976):  
Development of immunoglobulin-containing cell populations in intestine, spleen, and mesenteric lymph node of the young pig, as demonstrated by peroxidase-conjugated antisera.  
Am J Vet Res. **37**, 1309-1314
- Buchmeier NA, Heffron F. (1991):  
Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*.  
Infect Immun. **59**(7), 2232-2238
- Butler JE, Sun J, Navarro P (1996):  
The swine Ig heavy chain locus has a single JH and no identifiable IgD.  
Int Immunol. **8** (12), 1897-1904
- Buts JP, Bernasconi P, Vaerman J, Dive C. (1990):  
Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*.  
Dig. Dis. Sci. **35**, 251-256
- Buts JP, de Kayser N, de Raedemaker L. (1994):  
*Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines.  
Pediatr Res **36**, 522-527
- Byrne BM, Dankert J. (1979):  
Volatile fatty acids and aerobic flora in the gastrointestinal tract of mice under various conditions.  
Infect.Immun. **23**, 559-563
- Canganella F, Gasbarri M, Massa S, Trovatielli LD. (1996):  
A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding.  
Microbiological Research, **151**, 167-175. .
- Carr FJ, Chill D, Maida N. (2002):  
The lactic acid bacteria: a literature survey.  
Crit Rev Microbiol; **28** (4), 281-370
- Casabó LG, Mamalaki C, Kioussis D, Zamoyska R. (1994):  
T cell activation results in physical modification of the mouse CD8 beta chain.  
J Immunol. **152** (2), 397-404
- Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Marchi M, Suzuki R, Yoshimura A. (1999):  
Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation.  
Blood. **94** (8), 2880-2289
- Castagliuolo I, Lamont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. (1996):  
*Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum.  
Infect. Immun. **64** (12), 5225-5232
- Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, Lamont JT, Pothoulakis C. (1999):  
*Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa.  
Infect. Immun. **67** (1), 302-307
- Chapman HA, Johnson JS, and Cooper MD. (1974):  
Ontogeny of Peyer's patches and immunoglobulin-containing cells in pigs.  
J. Immunol. **112**, 555-563
- Cheminay C, Chakravorty D, Hensel M. (2004):  
Role of neutrophils in murine salmonellosis.  
Infect Immun. **72** (1), 468-77
- Chenoweth C, Schaberg D. (1990):  
The epidemiology of enterococci.  
European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **9**, 80-89

- Chun T, Wang K, Zuckermann FA, Gaskins HR. (1999):  
Molecular cloning and characterization of a novel CD1 gene from the pig.  
*J Immunol.* **162** (11), 6562-6571
- Cindoruk M, Erkan G, Karakan T, Dursun A, Unal S. (2007):  
Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in the 14-day triple anti-*Helicobacter pylori* therapy: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study.  
*Helicobacter.* Aug. **12**(4), 309-16
- Cirillo DM, Valdivia RH, D.M. Monack, Falkow S. (1998):  
Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival.  
*Mol. Microbiol.* **30**, 175-188
- Coconnier MH, Bernet MF, Kernéis S, Chauvière G, Fourniat J, Servin AL. (1993):  
Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion.  
*Microbiol Lett.* **110** (3):299-305
- Collins F, Carter B. (1978):  
Growth of *Salmonellae* in orally infected germfree mice *Infect. Immun.* **21**, 41-47
- Collins MD, Gibson GR. (1999):  
Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut.  
*Am. J. Clin. Nutr.* **69**,1052-1057
- Conlan JW, North RJ. (1992):  
Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes.  
*Infect Immun.* **60** (12), 5164-5171
- Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. (2004):  
Setting the stage: an anatomist's view of the immune system.  
*Trends Immunol.* **25** (4), 210-217
- Crooks ME, Littman DR. (1994):  
Disruption of T lymphocyte positive and negative selection in mice lacking the CD8 beta chain.  
*Immunity.* **1** (4), 277-85
- Czerucka D, Rampal P. (1999):  
Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP- and Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl secretion in T84 cells.  
*Dig. Dis. Sci.* **44** (11), 2359-2368
- Dahl J, Wingstrand A. (1998):  
The effect of dietary administration of an organic acid preparation on *Salmonella* seroprevalence.  
15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, Proc., Vol. 3, 126-260
- Dahl J, Wingstrand A, Baggesen DL, Nielsen B. (1996a):  
Eradication of *Salmonella typhimurium* by strategic removal of pigs in infected herds.  
14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna,  
In Proc. 173-178
- Dahl J, Wingstrand A, Baggesen DL, Nielsen B. (1996b):  
Spread of *Salmonella* infection in pens and between pens.  
In Proc. 172-175
- Dahl J, Wingstrand A, Baggesen DL, Nielsen B. (1997a):  
Salmonella reduction at the farm level.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork  
In Proc. 182-184
- Dahl J, Wingstrand A, Nielsen S, Baggesen DL. (1997b):  
Elimination of *Salmonella typhimurium* infection by the strategic movement of pigs.  
*Vet. Record* **140**, 679-681
- Dato ME, Wierda WG, Kim YB. (1992):  
A triggering structure recognized by G7 monoclonal antibody on porcine lymphocytes and granulocytes.

## Literaturverzeichnis

---

- Cell Immunol. **140** (2), 468-77  
Davidson JN, Hirsh DC. (1976)  
Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs.  
Immun. **13**, 1773-1774
- Davis ME, Brown DC, Maxwell CV, Rehberger T, Touchette KJ, Coalson JA. (2003):  
Influence of *Lactobacillus brevis* 1E-1 on the gastrointestinal microflora, gut morphology, and pig performance pre- and post-weaning.  
9th International Symposium on Digestive physiology in Pigs  
Banff, AB, Canada (2003) Vol. 2, 265-267
- Davis WC, Hamilton MJ. (1998):  
Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals.  
Vet Immunol Immunopathol. **63** (1-2), 7-13
- De Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ. (1998):  
Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *PJ, Kabel Science*. **280** (5368), 1435-1438
- De Simone C, Salvadori BB, Negri R, Terrazzi M, Baldinelli L, Vesely R. (1986):  
The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by ConA-stimulated human peripheral human blood lymphocytes.  
Nutr Rep Int. **33**, 419-433
- De Simone C, Vesely R, Negri R. (1988):  
Enhancement of immune response of murine Peyer's patches by a diet supplemented with yogurt.  
Immunopharmacol Immunotoxicol. **9**, 87-100
- De Vrese M, Feindt F, Kristen H, Fenselau S, Lick S, Bockelmann W, Engel G, Heller KJ, Schrezenmeir J. (2003):  
Nachweis probiotischer Eigenschaften von Milchsäurebakterien *Helicobacter pylori* Infektionen als Untersuchungsmodell.  
BMVEL-Forschungsreport. **2**, 43-46
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. (2001):  
Probiotics--compensation for lactase insufficiency.  
Am J Clin Nutr. **73** (2) Suppl, 421-429
- De Vrese M, Schrezenmeir J. (2002):  
Probiotics and non-intestinal infectious conditions.  
Br J Nutr. **88** Suppl (1), 59-66
- Denham S, Zwart RJ, Whittall JT, Pampusch M, Corteyn AH, Bianchi AT, Murtaugh MP, Parkhouse RM, Tlaskalova H, Sinkora J, Sinkora M, Rehakova Z. (1998):  
Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells.  
Vet Immunol Immunopathol **60** (3-4), 317-328
- Denyer MS, Wileman TE, Stirling CM, Zuber B, Takamatsu HH. (2006):  
Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, NK T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells.  
Vet Immunol Immunopathol. **110** (3-4), 279-292
- Devriese LA, Cruz Colque JI, De Herdt P, Haesebrouck F. (1992):  
Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats.  
Journal of Applied Bacteriology. **73**, 421-425
- Devriese LA, Hommez J, Pot, B, Haesebrouck F. (1994):  
Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs.  
Journal of Applied Bacteriology. **77**, 31-36
- Devriese LA, Laurier L, De Herdt P, Haesebrouck F. (1992):  
Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *Journal of Applied Bacteriology*. **72**, 29-31
- Devriese LA, Pot B, Collins, MD. (1993):  
Phenotypic identification of genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups.  
*Journal of Applied Bacteriology*. **75**, 399-408

- Devriese LA, Van de Kerkhofe A, Killper-Bälz R, Schleifer KH. (1987):  
Characterization and identification of enterococcus spezie isolated from the intestine of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **37**, 257-259
- Di Caro S, Tao H, Grillo A, Elia C, Gasbarrini G, Sepulveda AR, Gasbarrini D. 2005):  
Effects of Lactobacillus GG on genes expression pattern in small bowel mucosa.  
*Dig. Dis.* **37(5)**, 320-329
- Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. (2005):  
Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta bearing regulatory cells. *Immune-Mediated Diseases Section*.  
*J Immunol.* **174** (6), 3237-3246
- Dillender MJ, Lunney JK. (1993):  
Characteristics of T lymphocyte cell lines established from NIH minipigs challenge inoculated with *Trichinella spiralis*.  
*Vet Immunol Immunopathol.* **35(3-4)**, 301-319
- Du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Holzapfel WH. (2000):  
Preliminary characterization of Bakteriozins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces.  
*Journal of Applied Microbiology.* **88**, 482-494
- Duncker S. (2005):  
Auswirkung von oral verabreichten *Escherichia coli* Nissle 1917 auf das Darm-assoziierte Immunsystem des Schweins  
*Vet. med. Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover*
- Dunne C. (2001)  
Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder.  
*Inflamm. Bowel Dis.* **7**-136-140
- Düthorn T, Albert T, Gareis M. (2004):  
Occurrence of antibiotic resistant isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in spreadable raw sausage.  
In Bfelku, BVL, poster: 15. und 16. 11. 2004, Berlin
- Dziarski R. (2004):  
Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system.  
*Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1793-1804.
- Egan J, Sheahan M, Ward J.(1997):  
*Salmonella* and ist control in pigs.  
*Irish Vet. J.* **50**, 744-747
- Eckmann L, Stenson WF, Savidge TC, Barrett KE, J. Fierer J, Smith JR, and Kagnoff MF. (1997):  
Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production.  
*J. Clin. Invest.* **100**, 296-309
- Elliott SE, Buret A, McKnight W, Miller MJ, Wallace JL. (1998):  
Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats.  
*American Journal of Physiology*, **275**, 425-432
- Erickson KL, Hubbard NE. (2000):  
Probiotic Immunomodulation in Health and Disease.  
*J Nutr* **130** (Suppl), 403-409
- Fabia R, Ar'rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R, Molin G, Bengmark S. (1993):  
The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat.  
*Scand. J. Gastroenterol.* **28** (2), 155-162
- Faure GC, Morisset M, Gobert B, Guérin C, Pedone C, Bouley C, Béné MC. (2001):  
Specific IgA to lactic acid bacteria in feces of children consuming milk fermented by yoghurt symbiosis and *Lactobacillus casei* (Danone strain DN 114 001).  
*Adv Exp Med Biol.* **501**, 385-389
- Fedorka-Cray PJ. (1997a):  
Mechanism of host-agent interactions in subclinical *Salmonella* infection in pig herds.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, Copenhagen 1997, Proc., 9-18

## Literaturverzeichnis

---

- Fedorka-Cray PJ, Bailey JS, Stern NJ, Cox NA. (1997b):  
Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella*  
In Proc., 164-165
- Fedorka-Cray PJ, Collins Kelley L, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA. (1995):  
Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine  
Infect. Immun. **63**, 2658-2664
- Fedorka-Cray PJ, Harris DL, Whipp SC. (1997a):  
Using isolated weaning to raise salmonella-free swine.  
Vet. Med. **4**, 375-382
- Fedorka-Cray PJ, McKean J, Beran G. (1997b):  
Tracking *Salmonella* on the farm: A farrow to finish study.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella*  
In Proc., 196-198
- Fierer J, Guiney DG. (2001):  
Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection.  
J. Clin. Invest. **107**, 775-780
- Foster N, Lovell MA, Marston KL, Hulme SD, Frost AJ, Bland P, Barrow PA. (2003):  
Rapid protection of gnotobiotic pigs against experimental salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella enterica*.  
Infect Immun. **71**(4), 2182-2191
- Fuller R. (1989):  
Probiotics in man and animals.  
J. Appl. Bacteriol., **66**, 365-378
- Fuller R. (1991):  
Probiotics in human medicine.  
Gut, **32**, 439-442
- Fuller R. (1992):  
Probiotics. The scientific basis.  
First edition, Chapman and Hall, London
- Fuller R. (1999):  
Probiotics for farm animals. Probiotics: A critical Review.  
Horizon scientific press, Wymondham, UK, 15-22
- Futtermittelverordnung (2006):  
[www.bmelv.de](http://www.bmelv.de)
- Galdeano CM, Perdigon G. (2004):  
Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation.  
J. Appl. Microbiol. **97**, 673-681
- Ganter M. (1998):  
Salmonellen raus.  
Landwirtschaftsblatt Weser-Ems Nr. 31, 30-31
- Ganter M, Müller M, R. Tegeler R, Friedel K. (1998):  
Prevalence of *Salmonella* in finishing pigs of northwest Germany.  
15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham  
In Proc., Vol. 2, 70
- Garvis SG, Beuzon CR, Holden DW, (2001):  
A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages.  
Cell. Microbiol. **11**, 731-741
- Gedek, B. (1992):  
Mikroorganismen als Leistungsförderer beim Ferkel.  
Kraftfutter. **2**, 55-60

- Gedek B, Amselgruber W. (1990):  
Mikrobieller Antagonismus: Zur Eliminierung von enteropathogenen *E. coli*-Keimen und Salmonellen aus dem Darm durch *Saccharomyces boulardii*.  
Ökosystem Darm II. Springer, Berlin, 180-192
- Gerigk K. (1992):  
Einführung in die Problematik - Begriffsbestimmung, Wesen und Definitionen Akademie für Tierärztliche Fortbildung  
Schriftenreihe.  
Interdisziplinäres Symposium Salmonellose am 16./17. November 1992 in Bonn-Bad Godesberg, 1-6
- Gershwin & Krakowka (1995):  
Immunology and immunopathology of domestic animals.  
Second Edition, Mosby-Year Book, Missouri
- Gibson GR., Roberfroid, MB. (1995):  
Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.  
J. Nutr. **125**, 1401-1412
- Gill HS, Pract B. (2003):  
Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract.  
Res Clin Gastroenterol. **17** (5), 755-73
- Girrbach S (2006):  
Untersuchung zum immunmodulatorischen Potenzial von Prä-, Pro- und Synbiotika am Tiermodell Schwein.  
Vet. med. Diss., Universität Karlsruhe
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Ampieri M. (2003)  
Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebocontrolled trial.  
Gastroenterology **124** (5), 1202-1209
- Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. (2003):  
Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing.  
Trends Immunol. **24**(12), 652-8
- Glynn JR, Bradley DJ. (1992):  
The relationship between infecting dose and severity of disease in reported outbreaks of Salmonella infections.  
Epidemiol Infect, **109** (3), 371-388
- Gollob JA, Schnipper CP, Orsini E, Murphy E, Daley JF, Lazo SB, Frank DA, Neuberger D. (1998):  
Characterization of a novel subset of CD8(+) T cells that expands in patients receiving interleukin-12.  
J. Clin. Investig. **102**, 561-575
- Görke B. (2000):  
Untersuchung der Schleimhautmorphologie in Dün- und Dickdarm nach oraler Applikation von *Saccharomyces boulardii*  
und *Bacillus cereus* var. Toyoi beim Schwein.  
Vet. med. Diss, Tierärztl. Hochsch. Hannover
- Görke B, Liebler-Tenorio E. (2001):  
Probiotika: Gibt es wissenschaftliche Grundlagen für ihre Wirkung?  
Dtsch Tierärztl Wsch **108**, 249-251
- Govoni G, F. Canonne-Hergaux CG, Pfeifer SL, Marcus SD, Mills DJ, Hackam S, Grinstein D, Malo BB.(1999):  
Functional Expression of Nramp1 in vitro in the Murine Macrophage Line RAW 264.7.  
Infect. Immun. **67**, 2225-2232
- Gulig PA, Doyle TJ, Clare-Salzler MJ, Maiese RL, Matsui H. (1997):  
Systemic Infection of Mice by Wild-Type but Not Spv- *Salmonella typhimurium* Is Enhanced by Neutralization of Gamma  
Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha.  
Infect. Immun. **65**, 5191-5197
- Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. (1991):  
Two gut intraepithelial CD8+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role of the gut epithelium in T cell  
differentiation.  
J Exp Med. **173** (2), 471-81
- Haley PJ. (2003)  
Species differences in the structure and function of the immune system.  
Toxicology. **188** (1), 49-71

## **Literaturverzeichnis**

---

- Hall GA, Byrne TF. (1989):  
Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets.  
Res Vet Sci. **47** (3), 387-92
- Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. (2000):  
Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures.  
Gut. **47** (1), 79-87
- Haller D, Serrant P, Granato D, Schiffrin EJ, Blum S. (A) (2002a):  
Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes.  
Clin Diagn Lab Immunol. **9** (3), 649-657
- Haller D, Serrant P, Peruisseau G, Bode C, Hammes WP, Schiffrin E, Blum S. (2002b)  
IL-10 producing CD14 low monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria.  
Microbiol Immunol. **46** (3), 195-205
- Halloran PJ, Sweeney SE, Strohmeier CM, Kim YB. (1994):  
Molecular cloning and identification of the porcine cytolytic trigger molecule G7 as a Fc gamma RIII alpha (CD16) homologue.  
J Immunol. **153** (6), 2631-41
- Hameed A, Olsen KJ, Cheng L, Hruban Rh, Podack Er. (1992):  
Immunohistochemical identification of cytotoxic lymphocytes using human perforin monoclonal antibody.  
Am J Pathol. **140** (5), 1025-1030.
- Hampson DJ. (1986):  
Alterations in piglet small intestinal structure at weaning.  
Res. Vet. Sci. **40** (1), 32-40
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. (2004):  
Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria.  
Gut. **53** (11), 1602-9
- Harty JT, Bevan MJ (1999):  
Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. Department of Microbiology.  
Curr Opin Immunol. **11** (1), 89-93
- Havenaar R, M. Huis M. (1992):  
Probiotics : a general view.  
1. Aufl. Verlag Elsevier Applied Science Publisher, Amsterdam
- Haverson K, Bailey M, Higgins VR, Bland PW, Stokes CR. (1994):  
Characterization of monoclonal-antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral-blood and mucosal tissues.  
J Immunol Methods **170** (2), 233-245
- Haverson K, Rehakova Z, Sinkora J, Sver L, Bailey M. (2007):  
Immune development in jejunal mucosa after colonization with selected commensal gut bacteria: a study in germ-free pigs.  
Vet Immunol Immunopathol. **119** (3-4), 243-253.
- Haverson K, Saalmüller A, Alvarez B, Alonso F, Bailey M, Bianchi AT, Boersma WJ, Chen Z, Davis WC, Dominguez J, Engelhardt H, Ezquerro A, Grosmaire LS, Hamilton MJ, Hollemweguer E, Huang CA, Khanna KV, Kuebart G, Lackovic G, Ledbetter JA, Lee R, Llanes D, Lunney JK, McCullough KC, Molitor T, Nielsen J, Niewold TA, Pescovitz MD, de la Lastra JM, Rehakova Z, Salmon H, Schnitzlein WM, Seebach J, Simon A, Sinkora J, Sinkora M, Stokes CR, Summerfield A, Sver L, Thacker E, Valpotic I, Yang H, Zuckermann FA, Zwart R. (2001):  
Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens.  
Vet Immunol Immunopathol **80** (1-2) , 5-23
- Haverson K, Singha S, Stokes CR, Bailey M. (2000):  
Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine  
Immunology. **101**(4), 492-500
- Haverson K, Sinkora J, Stokes C, Bailey M. (2002):  
The effect of commensal bacteria on the immune development of the porcine jejunal lamina propria, Mucosal Immunology Update **10**, 2916

- Hayday AC. (2000):  
 $\gamma\delta$ -Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection.  
*Ann Rev Immunology* **18**, 975-1026
- He F, Morita H, Hashimoto H, Hosoda M, Kurisaki J, Isolauri E, Benno Y, Salminen SJ. (2002):  
Intestinal Bifidobacterium species induce varying cytokine production.  
*Allergy Clin Immunol.* **109** (6), 1035-1046
- He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. (2001):  
Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants.  
*Immunol. Med. Microbiol.* **30**, 43-47
- Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. (1996):  
Salmonella typhimurium aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location.  
*J Immunol.* **156** (9), 3321-3326
- Higgins R, Gottschalk M, Mittal K, Beaudoin M (1990):  
Streptococcus suis infection in swine: A sixteen month survey  
*Can. J. Vet. Res.* **54**, 170-173
- Hirata I, Berrei G, Austin LL, Keren DF, Dobbins WO. (1986):  
Immunohistological characterization of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease.  
*Dig Dis Sci* **31**, 593-602
- Hoefling D. (1989):  
Tracking the culprits behind diarrhea in neonatal pigs.  
*Vet Med* **4**, 427-431
- Hogue A, White P, Guard-Petter J, Schlosser W, Gast R, Ebel E, Farrar J, Gomez T, Madden J, Madison M, McNamara AM, Morales R, Parham D, Sparling P, Sutherlin W, Swerdlow D. (1997):  
Epidemiology and control of egg-associated Salmonella enteritidis in the United States of America.  
*Rev Sci Tech.* **16** (2), 542-553
- Holt ME, Enright MR, Alexander TJ. (1988):  
Immunisation of pigs with live cultures of Streptococcus suis type 2.  
*Res Vet Sci.* **45** (3), 349-352
- Holtmeier W, Kaller J, Geisel W, Pabst R, Caspary WF, Rothkotter HJ. (2002):  
Development and compartmentalization of the porcine TCR delta repertoire at mucosal and extraintestinal sites: the pig as a model for analyzing the effects of age and microbial factors.  
*J Immunol.* **169** (4), 1993-2002
- Hooper LV, Gordon JI. (2001):  
Commensal host-bacterial relationships in the gut.  
*Science.* **292** (5519), 1115-1118
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. (2001):  
Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine.  
*Science.* **291**, 881-884
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Endres S, Hartmann GJ. (2002):  
Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.  
*Immunol.* **168** (9), 4531-4537
- Horter DC, Yoon KJ, Zimmerman JJ. (2003):  
A review of porcine tonsils in immunity and disease.  
*Anim Health Res Rev.* **4** (2), 143-55
- Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. (1998):  
Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat.  
*Biophys. Res. Commun* **244**, 678-682

## Literaturverzeichnis

---

- Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ (2002):  
Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis.  
Dig Dis Sci. **47** (11), 2625-34
- Hyland KA, Kohrt L, Vulchanova L, Murtaugh MP. (2006):  
Mucosal innate immune response to intragastric infection by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis.  
Mol Immunol. **43** (11), 1890-1899
- Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin EJ, von der Weid T (2003):  
Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro  
Infect Immun. **71** (1), 428-436
- Iijima H, Takahashi I, Kiyono H. (2001):  
Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases.  
Rev Med Virol. **11** (2), 117-133
- Iliev ID, Tohno M, Kurosaki D, Shimosato T, He F, Hosoda M, Saito T, Kitazawa H. (2008):  
Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from  
*Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice.  
J Immunol. **67**(4), 370-376
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez J. (2003):  
Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.  
Biol Chem. **278** (8), 5509-5512
- Inoue T, Sugi Y. (1978):  
On gut associated lymphoid tissue of piglets.  
Agric. Yamaguchi Univ. **29**, 21-29
- Irie HY, Ravichandran KS, Burakoff SJ. (1995):  
CD8 beta chain influences CD8 alpha chain-associated Lck kinase activity.  
J Exp Med. **181** (4), 1267-1273
- Isaacson RE, Kinsel M. (1992):  
Adhesion of *Salmonella typhimurium* to porcine intestinal epithelial surfaces: identification and characterization of two phenotypes.  
Infect Immun. **60** (8), 3193-3200
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. (2001):  
Probiotics: effects on immunity.  
Am J Clin Nutr. **73** (2 Suppl), 444-450
- Iwasaki A, Kelsall BL (2000):  
Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine.  
J Exp Med. **191** (8), 1381-1394
- Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. (2001):  
G710-9. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **280** (4), 544-550
- Jadamus A, Vahjen W, Kühn I. (1999):  
Zur Wirkung des Probiotikums ToyoCerin in der Geflügelmast  
Lohmann Informationen **2** (99), 1-4
- Jahn, H.U.; Ullrich, R.; Schneider K. (1996):  
Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers.  
Digestion **57**, 95-104
- Janeway CA und Travers P. (1995):  
Immunologie.  
4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

- Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. (2004):  
DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function.  
*Gastroenterology*. **126** (5), 1358-73
- Jin LZ, Marquardt LR, Zhao X. (2000):  
A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *E. coli* K 88 to porcine small intestine mucus  
*Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 66, 10, 4200-4204
- Johansson ML, Molin G. (1993):  
Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup : in vivo colonisation of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora.  
*Appl Environ Microbiol* **58**, 15-20
- Jones BD, Ghori N, Falkow S. (1994):  
*Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches.  
*J Exp Med.* **180** (1), 15-23
- Jonjic S und Koszinowski UH. (1984):  
Monoclonal-antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic lymphocyte-T subset in the swine.  
*J Immunol* **133** (2), 647-652
- Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. (1995):  
A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion.  
*J Clin Invest.* **95** (1), 55-65
- Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, Holtmeier W, Wesch D. (2005):  
Epithelial defence by gamma delta T cells.  
*Int Arch Allergy Immunol.* **137** (1), 73-81
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. (1997):  
Prevention of *Helicobacter pylori* infection by *lactobacilli* in a gnotobiotic murine model.  
*Gut* **41** (1), 49-55
- Kagnoff MF. (1993):  
Immunology of the Intestinal tract.  
*Gastroenterology* **105**, 1275-1280
- Kagnoff MF. (1998):  
Current topics in mucosal immunity.  
*Am J Physiol* **274**, 455-458
- Kaila M, Isolauri E. (1992):  
Enhancement of circulating antibody secreting cell response in human diarrhoea by a human *Lactobacillus strain*  
*Pediatr. Res.*, 32, 141-144
- Kaila M, Isolauri E. (1995):  
Viable versus inactivated *Lactobacillus strain* GG in acute rotavirus diarrhoea  
*Arch. Dis. Child.* **72**, 51-53
- Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. (2001):  
Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.  
*Lancet.* **357** (9262):1076-1079
- Kaneko M, Mizunuma T, Takimoto H, Kumazawa Y. (2004):  
Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4.  
*Biol Pharm Bull.* **27** (6), 883-9
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiya H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A. (2006):  
Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine.  
*Cell Tissue Res.* **324** (3), 353-360
- Karaki S, Tanabe M, Nakauchi H, Takiguchi M. (1992):  
Beta-chain broadens range of CD8 recognition for MHC class I molecule.  
*J Immunol.* **149** (5), 1613-1618

## Literaturverzeichnis

---

- Kararli TT. (1995):  
Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.  
Biopharm Drug Dispos. **16** (5), 351-380
- Kato I, Yokokura T, Mutai M. (1984):  
Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens.  
Immunol. **27**, 209-217
- Kaur IP, Chopra K, Saini A. (2002):  
Probiotics: potential pharmaceutical applications.  
Eur J Pharm Sci. **15**, 1-9
- Kavathas P, Sukhatme VP, Herzenberg LA, Parnes JR. (1984):  
Isolation of the gene encoding the human T-lymphocyte differentiation antigen Leu-2 (T8) by gene transfer and cDNA subtraction.  
Proc Natl Acad Sci. **81** (24), 7688-7692
- Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME. (2000):  
The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen.  
Mol. Mikrobiol. **36**, 1085-1100
- Kennedy J, Hoper M, Deodhar K, Kirk J, Gardiner R. (2000):  
Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis.  
Scand. J. Gastroenterol. **35** (12), 1266-1271
- Kim SK, Reed DS, Heath WR, Carbone F, Lefrançois L. (1997):  
Activation and migration of CD8 T cells in the intestinal mucosa.  
J Immunol. **159** (9), 4295-306
- Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. (2000):  
Exclusion of vanA, vanB and vanC type Glykopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerasechain reaction and hybridization methods.  
Journal of Applied Microbiology. **89**, 815-824
- Kneifel, W. (2005):  
Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika.  
Lohmann Information, **1**, 17-20
- Kokuho T, Hiraiwa H, Yasue H, Watanabe S, Yokomizo Y, Inumaru S. (2000):  
Cloning and chromosomal assignment of the porcine interleukin-2 receptor alpha(IL-2Ralpha) gene.  
J Vet Med Sci. **62** (8), 841-847
- Kraft W und Dürr U (Hrsg.) (1995):  
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.  
3. Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York, 58-62
- Kramer T, Roof MB, Matheson R (1995):  
Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine.  
Am J Vet Res. 1992 Apr;53(4):444-8
- Kneifel, W. (2005):  
Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika  
Lohmann Information, **1**, 17-20
- Krammer M, Karbach U. (1993):  
Antidiarrheal action of the yeast *Saccharomyces boulardii* in the rat small and large intestine by stimulating chloride absorption.  
Gastroenterol. **31**, 73-77
- Kurebayashi S, Ueda E, Sakaue M, Patel DD, Medvedev A, Zhang F, Jetten AM. (2000):  
Retinoid-related orphan receptor gamma (RORgamma) is essential for lymphoid organogenesis and controls apoptosis during thymopoiesis.  
Proc Natl Acad Sci. **97** (18), 10132-10137

- Kyriakis S, Tsioloyannis V, Vlemmas J, Sarris K, Tsinas A, Alexopoulos C, Jansegers L. (1999):  
The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets.  
*Res. Vet. Sci.* **67**(3), 223-228
- Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. (2003):  
Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells.  
*Immunol Med Microbiol.* **38** (2), 165-72
- Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. (2004):  
Mechanisms of TLR9 activation.  
*J Endotoxin Res.* **10** (6), 406-412
- Laval A, Morvan HG, Desprez G, Corbion B. (1989):  
Salmonellosis in swine  
In Proceedings of the International Symposium on Salmonella and Salmonellosis (Ploufragan), 164–175
- Laval F, Paillot R, Bollard S, Fischer L, Audonnet JC, Andreoni C, Juillard V. (2002):  
Quantitative analysis of the antigen-specific IFN $\gamma$ + T cell-mediated immune response in conventional outbred pigs: kinetics and duration of the DNA-induced IFN $\gamma$ + CD8+ T cell response.  
*Vet Immunol Immunopathol.* **90** (3-4), 191-201
- Leclerk H, Devriese LA, Mossel DA. (1996):  
Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: Consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water.  
*Journal of Applied Bacteriology* **81**, 459-466
- Lee Y, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, Salminen S. (2000):  
Quantitative Approach in the Study of Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Intestinal Cells and Their Competition with Enterobacteria.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3692-3697
- Lee Y, Salminen S. (1995):  
The coming age of probiotics.  
*Sci Technol* **6**, 241-245
- Lee-MacAry AE, Ross EL, Davies D, Laylor R, Honeychurch J, Snary D, Wilkinson RW. (2001):  
Development of a novel flow cytometric cell-mediated cytotoxicity assay using the fluorophores PKH-26 and TO-PRO-3 iodide Applied Development Laboratory  
*J Immunol Methods.* **252** (1-2), 83-92
- Lenhardt L, Mozes S.(2003):  
Morphological and Functional Changes of Small Intestine in Growth-Stunted Broilers.  
*Acta Veterinaria Brno.* **72** (3), 353-356
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Møller K. (2002):  
Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited.  
*Appl Environ Microbiol.* **68** (2), 673-90
- Letellier A, Messier S, Lessard L, (2000):  
Assessment of various treatments to reduce carriage of Salmonella in swine.  
*Can J Vet Res.* **64**, 27–31
- Lewenstein A, Frigerio G, Moroni M. (1979):  
Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases.  
*Current Therapeutic Research* **26**, 967-981.
- Li Y, Watkins BA. (1998):  
Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids.  
*Lipids* **33**, 417-425
- Lidbeck A, Nord CE, Gustafsson JA, Rafter J. (1992):  
Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora.  
*Eur J Cancer Prev.* **1** (5), 341-53

## Literaturverzeichnis

---

- Liebich KG. (2003):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere  
4. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart
- Lilley DM, Stilwell RH. (1965):  
Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms.  
Science **147**, 747-748
- Lim BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH. (2002):  
Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse.  
Jpn. J. Cancer Res. **93** (1), 36-41
- Link- Amster H, Rochat F. (1994):  
Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake.  
Immunol Med Microbiol, **10**, 55-64
- Lo Fo Wong DM, Dahl J, Stege H, van der Wolf PJ, Leontides L, von Altrock A. (2004):  
Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds.  
Vet Med. **62**(4), 253-66
- Lodinova-Zadnikova R, Tlaskalova-Hogenova H, Sonnenborn U. (1992):  
Local and serum antibody response in full term and premature infants after artificial colonization of the in the intestine with *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor®)  
Allergy Immunol. **3**, 43-48
- Vinazer R, Berdnik D, Gabin A, Baccharini M.(1999):  
Growth Phase-Regulated Induction of *Salmonella*-Induced Macrophage Apoptosis Correlates with Transient Expression of SPI-1 Genes  
J. Bacteriol. **181**, 3433-3437
- Lunney JK. (1993):  
Characterization of swine leukocyte differentiation antigens.  
Immunol Today. **14** (4),147-8
- Lunney JK, Pescovitz MD. (1987):  
Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.  
Vet Immunol Immunopathol. **17** (1-4), 135-144
- Maaser and Kagnoff (2002):  
Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- *Salmonella* vaccines.  
Gastroenterol. **40**, 525-529
- MacDonald TT. (2003):  
The mucosal immune system.  
Parasite Immunol. **25** (5):235-246
- MacDonald TT, Monteleone G. (2005):  
Immunity, inflammation, and allergy in the gut.  
Science. **307** (5717), 1920-1925
- Macha M, Taras D, Vahjen W, Arini A, Simon O. (2004):  
Specific enumeration of the probiotic strain *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in the intestinal tract and in faeces of piglets and sows.  
Arch. Anim. Nutr. **58**, 443-452
- Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. (2005):  
Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria.  
Immunology. **115** (2), 153-62
- Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. (1999):  
*Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice.  
Gastroenterology. **116** (5), 1107-1114
- Makala LH, Suzuki N, Nagasawa H. (2002):  
Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine.  
Pathobiology. **70** (2), 55-68

- Mangell P, Nejdfor P, Wang M, Ahrné S, Weström B, Thorlacius H, Jeppsson B. (2002):  
Lactobacillus plantarum 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability  
Dig Dis Sci. **47** (3), 511-516
- Männer K, Jadamus A, Vahjen W, Frackenpohl U, Simon O. (2002):  
Effekte probiotischer Zusätze bei Puten auf Leistungsmerkmale und intestinale Mikroflora. *Rodehutscord, Markus (Hrsg)*  
7. Tagung Schweine und Geflügelernährung, 78-80 Universitätsdruckerei, Halle (Saale)
- Männer K, Spieler A. (1997):  
Probiotics in piglets – an alternative to traditional growth promoters  
Microecol. Therapy. **26**, 243-256
- Marteau P, Salminen S. (1999):  
Safety of probiotics: Probiotics, other nutritional factors, and intestinal microflora  
edited by L.A. Hanson and R.H. Yolken  
Nestlé nutrition workshop series, Vol.42
- Martin K, Kirkwood TB, Potten CS. (1998a):  
Age Changes in Stem Cells of Murine Small Intestinal Crypts.  
Exp. Cell Res. **241**, 316-323
- Martin ML, Tejada- Simon MV, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ. (1998b):  
Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T- cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison  
with *Bifidobacteria* sp and *Lactobacillus bulgaricus*.  
J. Food Prot. **61**, 859-864
- Mastroeni P, Harrison JA, Robinson JH, Clare S, Khan S, Maskell DJ, Dougan G, (1998):  
Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in BALB/c  
mice: role of gamma interferon and macrophage activation.  
Infect Immun. **66** (10), 4767-4776
- Mastroeni P, Skepper JN (1995):  
Effect of anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on histopathology of primary Salmonella infections.  
Infect Immun. **63** (9), 3674-3682
- Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. (1993):  
Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both  
immune serum and T cells.  
Infect Immun. **61** (9), 3981-3984
- Mc Ghee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldrige JH. (1992):  
The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development.  
Vaccine **10**, 75-88
- Mebius RE, Kraal G. (2005):  
Structure and function of the spleen.  
Nat Rev Immunol. **5** (8), 606-616
- Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2004):  
Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport.  
Gut. **53**(6), 821-828
- Metschnikoff E. (1901):  
Sur la flore du corps humain.  
Lit. Philos. Soc. **45**, 1-38
- Metschnikoff E. (1905):  
Immunity in Infective Diseases.  
Cambridge University Press, 7-12
- Metschnikoff E. (1907)  
The prolongation of life.  
London, Heinemann Verlag
- Meydani S, Ha K. (2000):  
Immunological effects of yoghurt.  
Am. J. Clin Nutr. **71**, 861- 872

## Literaturverzeichnis

---

- Meyer H. (1999):  
Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - Salmonellosen.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. **106**, 344-351
- Meyerholz DK, Stabel TJ. (2003):  
Comparison of early ileal invasion by *Salmonella enterica* serovars *Choleraesuis* and *Typhimurium*.  
Vet Pathol. **40** (4), 371-375
- Miettinen M, Lehtonen A, Julkunen I, Matikainen S. (2000):  
Lactobacilli and Streptococci activate NF-kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages.  
J Immunol. **164** (7), 3733-3740
- Miettinen, M., Vuopio- Varkila, J. (1996):  
Production of human tumor necrosis factor alpha, Interleukin- 6 and Interleukin- 10 is induced by lactic acid bacteria.  
Infect Immunity **166**, 5403-5404
- Mody CH, Paine R, Jackson C, Chen GH, Toews GB. (1994):  
CD8 cells play a critical role in delayed type hypersensitivity to intact *Cryptococcus neoformans*.  
J. Immunol. **152**, 3970-3979
- Moebius U, Kober G, Griscelli AL, Hercend T, Meuer SC. (1991):  
Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations.  
Eur J Immunol. **21** (8), 1793-800
- Mosimann, W./Kohler, T., (1990):  
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haustiere.  
Paul Parey Verlag Berlin.
- Mowat AM (2003):  
Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens.  
Nat Rev Immunol. **3** (4), 331-341
- Mowat AM, Viney JL. (1997):  
The anatomical basis of intestinal immunity.  
Immunol Rev. **156**, 145-166
- Muscettola M, Massai L, Tanganelli C, Grasso G. (1994):  
Effects of lactobacilli on interferon production in young and aged mice.  
Acad Sci **717**, 226-232
- Nadeau WJ, Pistole TG, McCormick BA. (2002):  
Polymorphonuclear leukocyte migration across model intestinal epithelia enhances *Salmonella typhimurium* killing via the epithelial derived cytokine, IL-6.  
Microbes Infect. **4** (14), 1379-1387
- Nagaoka M, Hashimoto S, Watanabe T, Yokokura T, Mori Y. (1994):  
Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides.  
Biol Pharm Bull. **17** (8), 1012-1017
- Nagler-Anderson C. (2001):  
Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa.  
Nat Rev Immunol. **1** (1), 59-67
- Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Louie MC, Kanagawa O. ( 1994)  
Requirement for CD8 beta chain in positive selection of CD8-lineage T cells.  
Science. **263** (5150), 1131-1133
- Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell G. (1999):  
Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract.  
*Appl. and Environm. Microbiol.* 5134-5138, Vol. 65, No. 11
- Neumann E, Oliveira MA., Cabral CM, Moura LN, Nicoli JR.(1998):  
Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice.  
Braz. J. Med. Biol. Res. **31**, 1565-1573
- Neutra MR, Mantis N, Kraehenbuhl, J. (2001):  
Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues.  
Nat Immunol 2: 1004–1009

- Neutra MR, Philipps TL, Mayer EL, Fishkind DJ. (1987):  
Transport of membrane-bound macromolecules by M cell in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer` patches.  
Cell. Tissue Res. **247**, 537-546
- Newberry RD, Lorenz RG. (2006):  
Organizing a mucosal defense.  
Immunol Rev. **206**, 6-21
- Nicander L, Nafstad P, Landsverk T, Engebretsen RH. (1991):  
A study of modified lymphatics in the deep cortex of ruminant lymph nodes.  
J Anat. **178**, 203-12
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. (1987):  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.  
Band III 6. Auflage Verlag Paul Parey
- Nisbet DN, Anderson RC, Buckley SA, Fedorka-Cray PJ, Stanker LH. (1997):  
Effect of competitive exclusion on Salmonella shedding in swine.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork, Copenhagen  
Proc. 176-178
- Nissle A. (1916):  
Über Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora.  
Deutsche Medizinische Wochenschrift **42**, 1181-4
- Noble CJ. (1978):  
Carriage of group D streptococci in the human bowel.  
Journal of Clinical Pathology **4**, 1182-1186
- Nogossek M. (2001):  
Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pro- und Prebiotika gegen eine Infektion des Verdauungstraktes mit *Escherichia coli*  
bei Kanarienvögeln (*Serinus canaria*)  
Vet. med. Diss., Tierärztl. Hochsch. Hannover
- Norment AM, Littman DR. (1988):  
A second subunit of CD8 is expressed in human T cells.  
Embo J. **7** (11), 3433-3439
- Ochman H, Groisman EA. (1996):  
Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp.  
Infect. Immun. **64**, 5410-5412
- Ohashi, Y, Iboue R, Tanaka K, Matsuki T, Umesaki Y, Ushida K. (2001):  
Lactobacillus casei strain Shirota-fermented milk stimulates indigenous Lactobacilli in the pig intestine.  
J. of Nutr. Science and Vitaminology, **47** (2), 172-176
- Orrhage K, Sillerstrom E, Gustafsson JA, Nord CE, Rafter J. (1994):  
Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria.  
Mutat. Res. **311** (2): 239-248
- Ortmann R. (1999):  
Immunisierungsversuche mit der Salmonella Typhimurium Lebendvakzine Salmoporc® zur Bekämpfung von Salmonellen-  
Infektionen in Ferkelerzeugerbetrieben.  
Vet. med. Diss., Hochschule Hannover
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Gronlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. (1999a):  
Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus.  
Int. Dairy J. **9**, 623-630
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. (1999b):  
Probiotics: mechanisms and established effects.  
International Dairy Journal. **9**, 43-52
- Ouwehand AC, Salminen S. (1998):  
The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria.  
International Dairy Journal, **8**, 749-758

## Literaturverzeichnis

---

- Pabst R, Binns RM. (1989a):  
Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: Several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo.  
*Immunol Rev.* **108**, 83-109
- Pabst R, Binns RM, Westermann J. (1989b):  
What is the function of peripheral lymphocytes migrating to the thymus and of B lymphocytes proliferating in the thymus?  
*Thymus* **13** (3-4), 149-156
- Pabst R, Geist M, Rothkötter HJ, Fritz FJ. (1988):  
Postnatal development and lymphocyte production of Peyer patches in normal and gnotobiotic pigs.  
*Immunology.* **64**, 539-544
- Pabst R, Rothkötter HJ. (1999):  
Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets.  
*Vet Immun Immunopathol* **72**, 167-173
- Park SH, Guy-Grand D, Lemonnier FA, Wang CR, Bendelac A, Jabri BJ (1999):  
Selection and expansion of CD8 $\alpha$ / $\alpha$ (1) T cell receptor  $\alpha$ / $\beta$ (1) intestinal intraepithelial lymphocytes in the absence of both classical major histocompatibility complex class I and nonclassical CD1 molecules.  
*Exp Med.* **190** (6), 885-890
- Parker RB. (1974):  
Probiotics, the other half of the antibiotic story.  
*Anim Nutr Health* **29**, 4-8
- Pauly T, Weiland E, Hirt W, Dreyer-Bux C, Maurer S, Summerfield A, Saalmüller A. (1996):  
Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes.  
*Immunology.* **88** (2), 238-246
- Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. (1998):  
Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milkhypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects.  
*Clin. Exp. Allergy* **28**, 1474-1479
- Peña JA, Versalovic J. (2003):  
Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism.  
*Cell Microbiol.* **5** (4), 277-85
- Perdigon G, Alvarez S. (1992):  
Probiotics and the immune state.  
Probiotics. The scientific basis.  
First edition, Chapman and Hall, London
- Perdigon G, Alvarez S, Pesce De Ruiz Holgado A. (1991):  
Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections  
*J. Dairy Res.* **58**, 485-490
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. (1995):  
Immune System Stimulation By Probiotics.  
*J Dairy Sci* **78**, 1597-1606
- Perdigon G, de Macias M, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. (1986):  
Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice.  
*Infect Immun.* **53**, 404-410
- Perdigon G, Macias D, Alvarez M, Oliver S, Ruiz Holgado A. (1986):  
Effect of perorally administered *Lactobacilli* on macrophage activation in mice.  
*Infect. Immun.* **53**, 404-410
- Perdigon G, de Macias M, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. (1998):  
Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus.  
*Immunology.* **63**, 17-23

Perdigon G, Nader De Ruiz Holgado, ME, Alvarez S, Oliver R, Media, M, De Ruiz Holgado AA. (1986):  
Effect of mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice.  
J. Food Prot. **49**, 986-988

Perdigon G, Vintin E, Alvarez S, Medina M, Medici M. (1999):  
Study of the Possible Mechanisms Involved in the Mucosal Immune System Activation by Lactic Acid Bacteria.  
J Dairy Sci **82**, 1108-1114

Pescovitz MD, Book BK, Aasted B, Dominguez J, Ezquerro A, Trebichavsky I, Novikov B, Valpotic I, Nielsen, J, Arn S, Sachs, DH, Lunney JK, Boyd P., Walker J, Lee R, Lackovic G, Kirkham P, Parkhouse RME. (1998):  
Analyses of monoclonal antibodies reacting with porcine CD3: results from the Second International Swine CD Workshop.  
Vet Immunol Immunopathol. **60** (3-4), 261-268

Pescovitz MD, Hsu MS, Katz SI, Lunney KJ, Shimada S, Sachs DH. (1990):  
Characterization of a porcine CD1 specific monoclonal antibody that distinguishes CD4/CD8  
double positive thymic from peripheral T-lymphocytes.  
Tissue Antigens **35**, 151-156

Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. (1984):  
Preparation and characterization of monoclonal-antibodies reactive with porcine PBL.  
J Immunol. **133** (1), 368-375

Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel AB, Pestel J, Mercenier A. (2002):  
Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients.  
J Allergy Clin Immunol. **110**(4), 617-23.

Pohlenz J und Liebler EM. (1987):  
Zur Funktion und Morphologie des Darmschleimhautimmunsystems.  
Dtsch tierärztl Wschr **94**, 306-311

Pollmann M. (2005):  
Einfluss eines probiotischen *Enterococcus faecium* auf die natürliche Infektionsrate von Chlamydien beim Schwein  
Vet. med. Diss., Freie Univ. Berlin

Poppe C, Smart N, Khakhria R, Johnson W, Spika J, Prescott J. (1998):  
*Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen.  
Can Vet J. **39** (9), 559-565

Pospischil A. (1989):  
Struktur und Funktion von Peyerschen Platten im Darm verschiedener Tierarten.  
Schweiz Arch Tierheilk **131**, 595-603

Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, Lamont JT. (1993):  
*Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum.  
Gastroenterology **104**, 1108-1115

Pullen W, Fedorka-Cray PJ, Reeves D, Bailey JS, Stern NJ, (1999):  
Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine.  
30th Annual Meet. Am. Assoc. Swine Pract., St. Louis, Missouri  
In Proc. 17-18

Puri P, Rattan A, Bijlani RL, Mahapatra, SC, Nath I. (1996):  
Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with *Salmonella typhimurium*.  
Int J Food Sci Nutr. **47**, 391-398

Quan S, Freeman Q, Harsharnjit SG. (2001):  
Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HNO19 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and *E. coli*  
infection in a piglet model.  
J Pediatr Gastroenterol Nutr. **33**, 171-177

Rabsch W, Liesegang A, Tschäpe H. Berl Munch (2001):  
Laboratory-based surveillance of salmonellosis of humans in Germany--safety of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* live vaccines.  
Tierärztl Wochenschr. **114** (11-12), 433-437

## Literaturverzeichnis

---

Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. (2004):

Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. **126** (2), 520-528

Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL. (1988):

Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. **34**, 344-351

Reiner SL, Locksley RM. (1995):

The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*. **13**, 151-77

Reiter K. (2005):

Einfluss des Probiotikums *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB 10415) auf die Morphologie der Darmschleimhaut des Schweines.

Vet. med. Diss., Freie Universität Berlin

Ribot EM, Wierzba RK, Angulo FJ, Barrett TJ (2002):

*Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerg Infect Dis*. **8** (4), 387-391

Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB. (1997):

Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo.

*J Exp Med*. **186** (4), 569-80

Rigby RJ, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. (2005):

Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. *Clin Exp Immunol*. **139** (2), 245-56

Robert Koch Institut (Juli 2001):

Merkblatt für Ärzte "Salmonellose", Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. [www.rki.de/gesund/salm.htm](http://www.rki.de/gesund/salm.htm)

Rolfe RD. (2000):

The role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *J Nutr* **130**, 396-402

Rolle M, Mayr A. (Hrsg.). (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

7. Auflage. Enke Verlag Stuttgart. 414, 483, 506-507, 517-518, 530, 544-545

Roth J, Thacker E. (2006).

Diseases of swine.

Ames, Iowa state University press, 15-36

Rothe G. (2007):

Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.

Basel, Karger. 27-70

Rothkötter HJ, Kirchhoff T, Pabst R. (1994):

Lymphoid and non-lymphoid cells in the epithelium and lamina propria of intestinal mucosa of pigs.

*Gut*. **35**, 1582-1589

Rothkötter H, Pabst R. (1989):

Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs.

*Immunol*. **6**, 103-108

Rothkötter HJ, Ulbrich H, Pabst R. (1991):

The postnatal development of gut lamina propria lymphocytes: Number, proliferation, and T and B cell subsets in conventional and germ-free pigs.

*Pediatr Res*. **29**, 237-242

Roux ME, McWilliams M, Philipps-Quagliata JM, Weisz-Carrington P. (1977):

Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland.

*J. Exp. Med*. **146**, 1311-1322

- Saalmüller A. (1996):  
Characterization of swine leukocyte differentiation antigens.  
*Immunol Today*. **17**, 352-354
- Saalmüller A, Hirt W, Reddehase MR. (1989):  
Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T-lymphocytes.  
*Eur J Immunol* **19**, 2011-2016
- Saalmüller A, Kuebart G, Hollemweguer E, Chen Z, Nielsen J, Zuckermann F, Haverson K. (2001):  
Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte-specific monoclonal antibodies.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **80** (1-2), 35-52
- Saalmüller A, Reddehase MR, Bühring HJ, Jonjić S, Koszinowski UH. (1987):  
Simultaneous expression of CD4 und CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T-lymphocytes.  
*Eur J Immunol*. **17**, 1297-1301
- Saalmüller A, Werner T, Fachinger V. (2002):  
T-helper cells from naive to committed.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **87**, 137-145
- Saalmüller A, Wirt W, Maurer S, Weiland E. (1994):  
Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen.  
*Immunology*. **81** (4), 578-583
- Sahlender HT. (1989):  
Untersuchungen zur Anzahl, Größe, Verteilung und Morphologie der Peyerschen Platten im Dünndarm und der Solitärfollikel im Dickdarm bei Schweinefeten und neugeborenen Ferkeln.  
Vet. med. Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover
- Salcedo SP, Noursadeghi M, Cohen J, Holden DW. (2001):  
Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo.  
*Cell Microbiol*. **3** (9), 587-97
- Salles MW, Middleton DM. (2000):  
Lymphocyte subsets in porcine tonsillar crypt epithelium.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **77** (1-2), 133-144
- Salminen S, Ouwehand YB, Lee YK. (1999):  
Probiotics: How should they be defined?  
*Trend Food Sci. Technol*. **10**, 107-110
- Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. (1998):  
Demonstration of safety of probiotics – a review. International.  
*Journal of Food Microbiology*. **44**, 93-106
- Saxelin M. (1997):  
*Lactobacillus GG*- A human probiotic strain with thorough clinical documentation.  
*Food Rev Int*. **13** (2), 293-313
- Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH (1999):  
Confrontation between intracellular bacteria and the immune system.  
*Adv Immunol*. **71**, 267-377
- Scharek L. (2000):  
Einfluß von *Bifidobacterium adolescentis* auf die humorale Immunreaktion gegen *Bacteroides thetaiotaomicron*.  
Vet. med. Diss., Freie Universität Berlin
- Scharek L, Guth J, Altherr B, Taras D, Schmidt MFG. (2003):  
Influence of an *Enterococcus faecium* probiotic on the immune system of sows and piglets.  
55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Dresden  
Abstr. in *International Journal of Medical Microbiology*. **293** (Suppl. 36), 307
- Scharek L, Guth J, Reiter K, Weyrauch KD, Taras D, Schwerk P, Schierack P, Schmidt MFG, Wieler LH, Tedin K. (2005):  
Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **105**, 151-161

## **Literaturverzeichnis**

---

- Scharek L, Tedin K, Guth J, Schmidt MFG. (2004)  
Das intestinale Immunsystem des Schweines – mögliche Einflüssebenen von Probiotika.  
Lohmann – Information. **1**, 3-6
- Schauser K, Olsen JE, Larsson LI. (2004):  
Immunocytochemical studies of Salmonella Typhimurium invasion of porcine jejunal epithelial cells.  
J Med Microbiol. **53** (7), 691-695
- Schierack P, Wieler L, Taras D, Herwig V, Lucius R, Hlinak A, Scharek L, (2007):  
Bacillus cereus var. toyoi enhances systemic immune response in piglets.  
Veterinary Immunology and Immunopathology. **118**, 1-11
- Schiffirin EJ, Blum S. (2002):  
Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa.  
Europ. J. Clin. Nutr. **56**, 60-64
- Schiffirin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. (1997):  
Immune modulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria.  
J. Dairy Sci. **78**, 491-497
- Schiffirin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. (1994):  
Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria.  
J Dairy Sci. **78**, 491-497
- Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein RL, Springer TA, Tedder TF, Todd RF. (1994):  
CD antigens  
J. Immunol. **152**, 1-2
- Schuberth HJ, Rabe HU, Leibold W. (1998):  
Reactivity of workshop monoclonal antibodies on paraformaldehyde-fixed porcine blood mononuclear cells.  
Vet Immunol Immunopathol. **60** (3-4), 409-17
- Schulze F. (1978):  
Zur quantitativen Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora bei Ferkeln in den ersten zwei Lebenswochen Mitteilung: Zur Entstehung der Magen-Darm-Flora bei natürlich aufgezogenen Ferkeln Arch. exper. Vet. med., **32**, 155-170
- Schwarze L. (1962):  
Kompendium der Veterinär- Anatomie Band II- Eingeweidesystem,  
Gustav Fischer Verlag Jena, 83-107
- Selbitz HJ. (1992)  
Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie  
Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 91-108
- Selbitz HJ, BISPING W. (1995):  
Tierseuchen und Zoonosen - Alte und neue Herausforderungen.  
Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 23-134
- Selbitz HJ, Sinell HJ, Sziegoleit A, Kleer J. (1995):  
Das Salmonellen-Problem.  
Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 78-82, 113-120, 140-141
- Sell S. (1987):  
Immunology, Immunopathology, and Immunity.  
4th ed. New York, Elsevier. 1-317
- Shimosato T, Tohno M, Kitazawa H, Katoh S, Watanabe K, Kawai Y, Aso H, (2005):  
Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches.  
Immunol Lett. **98** (1), 83-9
- Shiue L, Gorman SD, Parnes JR. (1988):  
A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes.  
J Exp Med. **168** (6), 1993-2005
- Sittonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M. (1990):  
Effect of Lactobacillus GG yogurt in prevention of antibiotic associated diarrhea.  
Ann. Med. **22**, 57-59

- Simon O. (2001):  
Probiotika aus der Sicht der Tierernährung: Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier.  
In 8. Symposium, 26. und 27. September 2001, Jena-Thüringen, 39-48
- Simon O. (2005):  
Tierernährung ohne antibiotische Leistungsförderer.  
*Tagungsband, 4. Boku-Symposium Tierernährung, Wien*
- Simon O, Breves G. (2000):  
Probiotics - feed additives with uncertain mode of action.  
6. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Wittenberg
- Simon O, Jadamus A, Vahjen W. (2000):  
Beeinflussung der Mikroflora durch Toyocerin Aktuelle.  
Themen der Tierernährungs- und Veredlungswirtschaft Zusammenfassung der Vorträge der wissenschaftlichen  
In Tagung der Lohmann Animal Health GmbH & Co KG vom 27. und 28. Oktober 1999 in Cuxhafen, 118-127
- Simon O, Jadamus A, Vahjen W. (2001):  
Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action.  
J. Anim. Feed sci., **10**, Suppl. 1, 51-67
- Simon O, Vahjen W, Taras D. (2004):  
Ernährung und intestinale Mikrobiota bei Schwein und Geflügel Mikrobiologie und Tierernährung  
20. Hülsenberger Gespräche, Lübeck, Schriftenreihe der Wilhelm Schaumann Stiftung, 112-124
- Sinkora J, Rehakova Z, Haverson K, Sinkora M, Dominguez J, Huang CA. (2001):  
Monoclonal antibodies putatively recognising activation and differentiation antigens.  
Vet Immunol Immunopathol. **80**(1-2): 143-164
- Sissons JW. (1989):  
Potential of Probiotic Organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals  
Review J. Sci. Food Agric. **49**, 1-13
- Skjolaas TE, Burkey, Dritz SS, Minton JE. (2006):  
Effects of Salmonella enterica serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in  
swine ileum and jejunal epithelial cells  
Vet. Immunol. Immunopathol. **111**, 119–209
- Smith HW, Jones ET. (1963):  
Observations on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pigs  
J. Pathol. Bacteriol. **86**, 387-412
- Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. (2005):  
Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system.  
Immunol Rev. **206**, 149-59
- Smith WE, Kane AV, Campbell ST, Acheson DW, Cochran BH., Thorpe CM. (2003):  
Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p 38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal  
epithelial cells.  
Infect. Immun. **71**, 497-504
- Smollich A, Michel G. (1992):  
Mikroskopische Anatomie der Haustiere.  
Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, , S.152- 170
- Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH. (2005):  
Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity.  
J Clin Invest. **115** (1), 66-75
- Sokal R. and Rohlf F. 1995):  
Biometry: the principles and practice of statistics.  
biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co New York, 887-920
- Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Douglas LW, Lunney JK. (2001):  
Characterization of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine.  
Developmental and Comparative Immunology. **25**, 245-263

## **Literaturverzeichnis**

---

- Solano-Aguilar GI, Vengroski KG, Beshah E, Lunney JK. (2000)  
Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine.  
J Immunol Methods. **241** (1-2), 185-99
- Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. (1997):  
Role of food in the stimulation of cytokine production.  
Am J Clin Nutr. **66**(2), 521-525
- Spahn TW, Kucharzik T. (2004)  
Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs.  
Gut. **53** (3),456-465
- Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. (2004):  
Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity.  
Best Pract Res Clin Gastroenterol. **18**(2), 255-270
- Staines N, Brostoff J, James K. (1994):  
Immunologisches Grundwissen.  
2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena
- Stanker H., Anderson R, Buckley S, Nisbet D. (1997):  
Horizontal transmission of *Salmonella choleraesuis* in weaned pigs exposed to different challenge levels.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of Salmonella  
in Pork, Copenhagen. 1997, Proc. 78-80
- Stecchini, M. L.; M. Del torre u. M. Munari (2001):  
Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria.  
Int. J. Food Microbiol. **64**, 183-188
- Stege H, Stryhn H, Baggesen DL, Christensen J, Nielsen JP. (1998):  
Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes isolated from feed samples collected from the cribs 96 Danish pig herds.  
15th International Pig Veterinary Society Congress, Birmingham, England  
In Proc. Vol. 2, 95
- Straw BE, D'Allaire S, Mengelin WL, Taylor DJ. (1999):  
Diseases of swine.  
8th Edition, Blackwell Science Ltd., Oxford, London, Edinburgh, Malden, Paris
- Sturm A, Rilling K, Baumgart DC, Gargas K, Abou-Ghazalé T, Raupach B, Eckert J, Schumann RR, Enders C, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Dignass AU. (2005):  
*Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling.  
Infect Immun. **73** (3), 1452-65
- Summerfield A, Haverson K, Thacker E, McCullough KC. (1997):  
Differentiation of porcine myeloid bone marrow haematopoietic cell populations.  
Vet Immunol Immunopathol. **80** (1-2), 121-9
- Sun J, Kavathas PB. (1997):  
Comparison of the roles of CD8 alpha alpha and CD8 alpha beta in interaction with MHC class I.  
J. Immunol. **159**, 6077-6082
- Sweeney SE, Halloran PJ, Kim YB (1996):  
Identification of a unique porcine Fc gamma RIIIA alpha molecular complex.  
Cell Immunol. **172** (1), 92-99
- Suzuki M, Kikuchi T, Takatsuki F, Hamuro J. (1994):  
Curative effects of combination therapy with lentinan and interleukin-2 against established murine tumors, and the role of CD8-positive T cells.  
Cancer Immunol Immunother. **38** (1), 1-8
- Sydora BC, Jamieson BD, Ahmed R, Kronenberg M. (1996):  
Intestinal intraepithelial lymphocytes respond to systemic lymphocytic choriomeningitis virus infection.  
Cell Immunol. **167** (2), 161-9

- Sýkora J, Valecková K, Amlerová J, Siala K, Dedek P, Watkins S, Varvarovská J, Stozický F, Pazdiora P, Schwarz J. (2005): Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol.* **39** (8), 692-708
- Szabó I, Wieler L. H, Tedin K, Scharek-Tedin L, Taras D, Hensel A, Appel B, Nöckler K. (2009) Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. *Appl. Environ. Microbiol.* In press
- Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikołajczyk W. (2001): Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J. Pediatr.* **138**, 361-365
- Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T., Yamamoto, Y., (1993): Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 1557-1560
- Tang M, Laarveld B, Van kessel AG, Estrada A, Patience JF. (1999): Effect of Segregated Early Weaning on Postweaning Small Intestinal Development in Pigs. *Journal of Animal Science.* **77**(12), 3191-3200
- Taras D. (2008)  
Persönliche Mitteilungen.  
Im Rahmen der integrativen Analyse der Ergebnisse, DFG- Forschergruppe (For 438)
- Taras D, Vahjen W, Macha M, Simon O. (2005): Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch Anim Nutr.* **59**, 405-417
- Taras D, Vahjen W, Macha M, Simon O. (2006): Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci.* **84**, 608-617
- Tedin et al. (2008):  
Persönliche Mitteilungen.  
Im Rahmen der integrativen Analyse der Ergebnisse, DFG- Forschergruppe (For 438)
- Tejada-Simon MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ. (1998): Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* **82**, 649-660
- Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ. (1999): Effect of lactic acid bacteria ingestion on basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse. *J Food Prot.* **62**, 287-291
- Terzić S, Sver L, Valpotić I, Lojkić M, Miletić Z, Jemersić L, Lacković G, Kovsca-Janjatović A, Orsolić N (2002): Immunophenotyping of leukocyte subsets in peripheral blood and palatine tonsils of prefattening pigs. *Vet Res Commun.* **26** (4), 273-283
- Thacker E, Summerfield A, McCullough K, Ezquerro A, Dominguez J, Alonso F, Lunney J, Sinkora J, Haverson K. (2001): Summary of workshop findings for porcine myelomonocytic markers. *Vet Immunol Immunopathol.* **80** (1-2), 93-109
- Thelen, U. (1997):  
Einfluss zweier Varianten von *Bacillus cereus* als Probiotika beim frühentwöhnten Ferkel unter Einbeziehung ernährungsphysiologischer, mikrobiologischer, histologischer und hämatologischer.  
*Vet. med. Diss., Univ. Giessen*
- Thelen U und Pallauf J. (1996):  
Effect of *Bac. cereus* on the composition of the gut flora in early weaned piglets.  
*Proc Soc Nutr Physiol* **5**, 144-156

## **Literaturverzeichnis**

---

- Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C, Waldkirch E, Pabst R, Rothkotter HJ. (2003):  
Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood.  
*Eur J Immunol* **33**, 1649-1656
- Tizard, I. (2000):  
Veterinary immunology: an introduction  
6. Auflage Company Philadelphia, W. B. Saunders, Pennsylvania,
- Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Williams AF, Hünig T. (1992):  
Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression.  
*Eur J Immunol.* **22** (11), 2841-2848
- Tumbleson M.E. & Schook, L.B. (2005)  
Advances in Swine in Biomedical Research  
Plenum press, New York, USA
- Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. (1990):  
Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs.  
*Cell.* **60** (5), 755-65
- Uhr G. (1993):  
Vergleichende Untersuchungen am Darmtrakt des Wild- und Hausschweins unter besonderer Berücksichtigung des Darmschleimhautimmunsystems.  
Habil.-Schr. Tierärztl. Hochschule Hannover
- Vahjen W, Jadamus A, Simon O. (2002):  
Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults.  
*Arch. Anim. Nutr.* **56**, 419-429
- Vahjen W, Macha M, Taras D, Simon O. (2004):  
Effects of an *E. faecium* probiotic in pigs: modification of intestinal bacterial metabolic activities.  
*Anim. Res.* **53**, 338-345
- Van Belle M, Teller E, Focant M. (1990):  
Probiotics in animal nutrition: A review.  
*Arch Anim Nutr, Berlin*, **40**, 543-567
- Van Briel C. (2002):  
Veränderungen der Anzahl und Verteilung von Plasmazellen und Lymphozytenpopulationen in der Darmschleimhaut des Schweines nach Applikation von Probiotika.  
*Vet. med. Diss., Tierärztl. Hochsch. Hannover*
- Van den Eertwegh AJ, Boersma WJ, Claassen E. (1992):  
Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen.  
*Crit Rev Immunol.* **11** (6), 337-348
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlner AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. (1999):  
Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes.  
*Nature.* **401** (6755), 804-808
- Vega-Lopez MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, Gonzalez-Pozos S, Stokes CR, Ortega MG, Mondragon-Flores R. (2001):  
Development of Intraepithelial cells in the porcine Small Intestine.  
*Developmental Immunology.* **8** (2), 147-158
- Veir JK, Knorr R, Cavadini C, Sherrill SJ, Benyacoub J, Satyaraj E, Lappin MR (2007):  
Effect of supplementation with *Enterococcus faecium* (SF68) on immune functions in cats.  
*Vet Ther.* **8** (4), 229-38
- Viera R, Huska M, Levkut M, Kolodzieyski L, Bartko P. (1999):  
Intestinal mucosal morphometry and analysis of CD3 lymphocytes in the intestinal mucosa of piglets after the application of *Lactobacillus*.  
*Acta Veterinaria, Fac. Of Vet. Med. Vol.* **49**, No. 5-6, 343-352

- Vitini E, Alvarez S, Medina M, Medici M, De Budeguer MV, Perdigon G. (2000):  
Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria.  
*Biocell.* **24** (3), 223-232
- Vizoso Pinto MG, Franz CM, Schillinger U, Holzapfel WH. (2006):  
Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products.  
*Int J Food Microbiol.* **109** (3), 205-214
- Wall PG, Morgan D, Lamden K, Ryan M, Griffin M, Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B. (1994):  
A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant Salmonella typhimurium DT104 in England and Wales.  
*Commun Dis Rep CDR Rev.* **4** (11), 130-135
- Weyrauch KD, Smollich A. (1998):  
Histologiekurs für Veterinärmediziner.  
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- Wheeler CJ, von Hoegen P, Parnes JR (1992):  
An immunological role for the CD8 beta-chain.  
*Nature.* 357 (6375), 247-249
- White F, Wenham G, Sharman GA, Jones AS, Rattray EA, McDonald T. (1969):  
Stomach function in relation to a scour syndrome in the piglet.  
*Br. J. Nut.* **23**, 847-857
- Wiehler S. (1989):  
Zur Beeinflussung der bakteriellen Darmbesiedlung beim Schwein durch Futterzusätze  
*Vet.med. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München*
- Wiemer F. (1999):  
Untersuchungen zur Salmonellenprävalenz in Ferkelerzeugerbetrieben sowie erste Ergebnisse der Behandlung porziner Salmonelleninfektionen mit Lactulose.  
*Vet.med. Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover*
- Wierup M. (1997):  
Principles for integrated surveillance and control of Salmonella in swine production.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork  
In Proc. 42-49
- Wilson KH, Perini F. (1988):  
Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora.  
*Infect. Immun.* **56**, 2610-2614
- Winckler C, Breves G, Boll M, Daniel H. (1999):  
Characteristics of dipeptide transport in pig jejunum in vitro.  
*J. Comp. Physiol.* **169** (7), 495-500
- Winckler C, Schröder B, Breves G. (1998)  
Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum.  
*Z. Gastroenterol. Suppl.* **1**, 30-37
- Wingstrand, A., J. Dahl, L.K. Thomsen, L. Jorgensen u. B.B. Jensen (1997):  
Influence of dietary administration of organic acids and increased feed structure on *Salmonella* Typhimurium infection in pigs.  
2nd Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork  
In Proc. 170-172
- Yan F, Polk DB. (2002):  
Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells.  
*J. Biol. Chem.* **277** (5250959-50965)
- Yang H, Parkhouse ME. (1996):  
Phenotyp classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues.  
*Immunology.* **89**, 76-83

## **Literaturverzeichnis**

---

- Yang H, Parkhouse RM. (1997):  
Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets.  
*Immunology*. **92** (1), 45-52
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J.( 2005):  
Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells.  
*J Nutr*. **135**(7), 1752-1756
- Zimmermann B, Bauer E, Mosenthin R. (2001):  
Pro- and prebiotics in pig nutrition- potential modulator of gut health  
*J of Anim and Feed Sciences*. **10**, 47-56
- Zuckermann FA. (1999):  
Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **72** (1-2), 55-66
- Zuckermann FA, Husmann RJ. (1996):  
Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positiv T cells.  
*Immunology*. **87**, 500-512
- Zuckermann FA, Peavey C, Schnitzlein WM, Schabacker D, Husmann RJ, Yang H, Saalmüller A, Lunney JK. (1998):  
Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **60** (3-4), 367-387
- Zuckermann FA, Schabacker D, Binns RM (1994):  
Biochemical analysis of molecules reactive with monoclonal antibodies specific for porcine CD45.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **43** (1-3), 307-313
- Zuckermann FA, Schnitzlein WM, Thacker E, Sinkora J, Haverson K. (2001):  
Characterization of monoclonal antibodies assigned to the CD45 subgroup of the Third International Swine CD Workshop.  
*Vet Immunol Immunopathol*. **80** (1-2), 165-174
- Zychlinsky A, Weinrauch Y, Weiss J. (2003):  
Introduction: Forum in immunology on neutrophils.  
*Microbes Infect*. **5** (14), 1289-1291

## 9. Anhang

### 9.1 Fütterung der Tiere

**Tabelle 11-1 Saugferkelfutter F I ( 15-28 Tage p.p.)**

Rohstoffe	%
Weizenschrot	45,47
Haferflocken	10,00
Sojaschrot	27,40
Magermilchpulver	12,00
Kohlensaurer Kalk	1,10
Monocalciumphosphat	1,30
Mineralvormischung	1,20
Sojaöl	1,00
Lysin	0,30
Methionin	0,16
Tryptophan	0,07
Probiotikum	0,01

**Tabelle 11-2 Futter für Aufzuchtferkel F II (29-56 Tage p.p.)**

Rohstoffe	%
Weizenschrot	61,3
Gerstenschrot	13,00
Sojaschrot	18,3
Kohlensaurer Kalk	1,6
Monocalciumphosphat	1,49
Mineralvormischung	1,61
Sojaöl	2
Lysin	0,3
Methionin	0,04
Viehsalz	0,36
Probiotikum	0,03

**Tabelle 11-3 Alleinfuttermittel für tragende Sauen (-91 bis 1 Tage a.p.)**

Rohstoffe	%	Inhaltsstoffe (berechnet)	%
Gerste	54,3	Rohprotein	12,00
Weizenkleie	30,6	Lysin	0,60
Melasseschnitzel	10,6	Rohfett	3,00
Melasse/Rohr	1,5	Rohfaser	8,60
Futterkalk	1,04	Rohasche	6,00
Sojaextraktionsschrot	0,77	Calcium	0,70
Monocalciumphosphat	0,29	Phosphor	0,65
L-Lysin	0,15	Natrium	0,20
Vitaminvormischung	0,75	MJ ME	10,60
Probiotikum	0,005		

**Tabelle 11-4 Alleinfutter für laktierende Sauen (0-28 Tage p.p)**

Rohstoffe	%	Inhaltsstoffe (berechnet)	%
Gerste	40,00	Rohprotein	17,50
Weizenkleie	10,67	Lysin	0,95
Triticale	14,95	Rohfett	4,20
Weizen	8,00	Rohfaser	5,00
Erbsen	5,00	Rohasche	6,50
Pflanzenfett	1,20	Calcium	0,90
Sojaöl	0,53	Phosphat	0,70
Natriumchlorid	0,13	Natrium	0,28
Calciumcarbonat	1,47	MJ ME	13,00
Sojaextraktionsschrot	16,00		
Monocalciumphosphat	0,93		
L-Lysin	0,08		
DL-Methionin	0,04		
Vitaminvormischung	1,00		
Probiotikum	0,005		

### 9.2 Übersichten der verwendeten Tiere und deren Tötungstermine in den jeweiligen Fütterungsgruppen

**Tabelle 11-5 Tötungszeitpunkt 3 Stunden nach der Infektion**

<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe				Kontrollgruppe			
Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Gewicht (Kg)
62/X	63/VI	63/VI	63/VI	63/VI	28 Tage	♂	7,16
62/XI	63/X	63/X	63/X	63/X	28 Tage	♀	7,33
91/V	97/XII	97/XII	97/XII	97/XII	28 Tage	♀	6,76
91/I	97/X	97/X	97/X	97/X	28 Tage	♂	7,77
87/XV	51/V	51/V	51/V	51/V	28 Tage	♂	5,9
87/VIII	51/X	51/X	51/X	51/X	28 Tage	♀	6,72
74/III	68/IX	68/IX	68/IX	68/IX	28 Tage	♀	7,78
74/VII	68/VIII	68/VIII	68/VIII	68/VIII	28 Tage	♀	7,71
83/XI	72/XIII	72/XIII	72/XIII	72/XIII	28 Tage	♀	11,29
83/VI	72/V	72/V	72/V	72/V	28 Tage	♂	7,86

**Tabelle 11-5 Tötungszeitpunkt 24 Stunden nach der Infektion**

<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe				Kontrollgruppe			
Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Gewicht (Kg)
62/V	62/V	62/V	62/V	63/XII	29 Tage	♀	8,1
62/XIV	62/XIV	62/XIV	62/XIV	63/I	29 Tage	♂	8,4
91/III	91/III	91/III	91/III	97/III	29 Tage	♂	6,3
91/VII	91/VII	91/VII	91/VII	97/VII	29 Tage	♂	9,0
87/XIII	87/XIII	87/XIII	87/XIII	51/IV	29 Tage	♂	5,6
87/XVII	87/XVII	87/XVII	87/XVII	51/III	29 Tage	♂	8,4
74/I	74/I	74/I	74/I	68/V	29 Tage	♀	11,25
74/V	74/V	74/V	74/V	68/III	29 Tage	♂	9,56
83/XV	83/XV	83/XV	83/XV	72/III	29 Tage	♂	7,94
83/V	83/V	83/V	83/V	72/IV	29 Tage	♂	8,21

**Tabelle 11-6 Tötungszeitpunkt 71 Stunden nach der Infektion**

<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe				Kontrollgruppe			
Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Gewicht (Kg)
62/III	63/XI	63/XI	63/XI	63/XI	31 Tage	♀	10,3
62/IX	63/XIII	63/XIII	63/XIII	63/XIII	31 Tage	♀	11,1
91/XII	97/XVII	97/XVII	97/XVII	97/XVII	31 Tage	♀	9,14
91/VI	97/XVIII	97/XVIII	97/XVIII	97/XVIII	31 Tage	♀	8,54
87/IV	51/IX	51/IX	51/IX	51/IX	31 Tage	♀	8,38
87/VI	51/II	51/II	51/II	51/II	31 Tage	♂	7,34
74/VII	68/VI	68/VI	68/VI	68/VI	31 Tage	♀	10,26
74/VIII	68/II	68/II	68/II	68/II	31 Tage	♂	10,2
83/IV	72/II	72/II	72/II	72/II	31 Tage	♂	11,42
83/I	72/I	72/I	72/I	72/I	31 Tage	♂	7,1

**Tabelle 11-7 Tötungszeitpunkt 28 Tage nach der Infektion**

<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe				Kontrollgruppe			
Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Gewicht	Tier-Nr.	Alter	Geschlecht	Gewicht (Kg)
62/IV	56 Tage	♂	22,1	63/VII	56 Tage	♂	25,3
62/VI	56 Tage	♂	23,06	63/II	56 Tage	♀	22,1
91/VIII	56 Tage	♀	11,04	97/XV	56 Tage	♀	17,5
91/II	56 Tage	♂	19,0	97/II	56 Tage	♂	18,0
87/X	56 Tage	♀	21,4	51/VIII	56 Tage	♀	19,32
87/IX	56 Tage	♂	16,17	51/VII	56 Tage	♀	21,48
74/IX	56 Tage	♀	26,82	68/XII	56 Tage	♂	21,08
74/II	56 Tage	♂	15,28	68/XI	56 Tage	♂	23,26
				72/XII	56 Tage	♀	21,88
				72/X	56 Tage	♀	15,62

**Tabelle 11-9 Übersicht über die verwendeten Ferkel für die Entnahme von Blutproben (vor der *Salmonella*-Infektion)**

<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe		Kontrollgruppe	
Tier-Nr.	Alter	Tier-Nr.	Alter
54/IX	21 Tage	96/V	21 Tage
52/II	21 Tage	96/VI	21 Tage
77/V	21 Tage	95/VIII	21 Tage
58/IX	21 Tage	90/XIII	21 Tage
44/X	21 Tage	40/III	21 Tage
91/IV	21 Tage	63/XII	21 Tage
92/XIII	21 Tage	89/I	21 Tage
93/VIII	21 Tage	46/I	21 Tage
94/VI	21 Tage	69/I	21 Tage
41/II	21 Tage	72/II	21 Tage
58/II	21 Tage	96/IX	21 Tage
62/III	21 Tage	97/IV	21 Tage
76/II	21 Tage	63/XI	21 Tage
		89/VII	21 Tage

**Tabelle 11-10 Übersicht über die Infektionsdosis an *Salmonella typhimurium* DT 104**

Fütterungsgruppe	Nr.	Sau Nr.	Ferkelnummer ( infizierte und getötete Tiere)	Infektionsdosis
<i>Enterococcus faecium</i> -Gruppe	P1	62	X, XI, V, XIV, III, IX, IV, V	5,35E+09 CFU/Tier
	P2	91	V, I, III, VII, XII, VI, VIII, II	8,46E+09 CFU/Tier
	P3	87	XV, VIII, XIII, IV, VI, X, IX	6,80E+09 CFU/Tier
	P4	74	III, VII, I, V, VIII, VII, IX, II	7,70E+09 CFU/Tier
	P5	83	XI, VI, XV, V, IV, I	7,40E+09 CFU/Tier
Kontrollgruppe	K1	63	VI, X, XII, I, XI, XIII, VIII, II	6,21E+09 CFU/Tier
	K2	97	XII, X, III, VII, XVII, XVIII, XV, II	6,80E+09 CFU/Tier
	K3	51	V, X, IV, III, IX, II, VIII, VII	7,80E+09 CFU/Tier
	K4	68	IX, VIII, V, III, VI, II, XII, XI	8,80E+09 CFU/Tier
	K5	72	XIII, V, III, IV, II, I, XII, X	9,90E+09 CFU/Tier

**Tabelle 11-11 Konzentration des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 im Futter (Mittelwerte, vorläufige Zahlen, Auswertung nicht vollständig)**

<b>Futter für</b>	<b>Konzentration des Probiotikums <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 (Mittelwert)</b>
<b>Saugferkel</b>	7,5.10 <sup>6</sup> (3,1 SD)
<b>Absetzferkel</b>	4,7.10 <sup>6</sup> (2,7 SD)
<b>Tragende Sauen</b>	2,2 10 <sup>6</sup> (0,92 SD)
<b>Laktierende Sauen</b>	1,4.10 <sup>6</sup> (0,57 SD)

## **10. Danksagung**

Herrn Prof. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und für die stets vorhandene Bereitschaft, mich in wissenschaftlichen und administrativen Angelegenheiten zu beraten.

Frau Dr. Lydia Tedin gilt mein herzlicher Dank für die Betreuung aller Stadien meiner wissenschaftlichen Arbeit, für ihren gewährten Rat, unermüdliche Geduld und Rückhalt. Danke für Freundschaft, Vertrauen und außergewöhnliches Arbeitsklima.

Vielen Dank auch allen Mitarbeiter des Institutes für Immunologie und Molekularbiologie, insbesondere Muhammad Farooq Rai, Dr. Veit und Dr. Krishna Rachakonda für die Kritik, Rat und Freundschaft.

Dr. Katharina Schmidt-Bleek und Christopher Schwartz danke ich ganz besonders für die gründliche Korrektur des Manuskripts.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Forschergruppe (For 438) insbesondere Dr. Karsten Tedin, Dr. David Taras und Istvan Szabo für ihr besonderes Engagement innerhalb der Forschergruppe und bei der Durchführung des Tierversuchs.

Für die uneigennützig Beratung in biometrischen Fragestellungen bedanke ich mich bei Frau. Dr. Arndt, Matthias Filter und Frau Lüdecke.

Ebenso möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Selbständigkeitserklärung**

### **11. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 18.08.08

Hassan Mafamane