

III. Eigene Untersuchungen

1. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, bestehende Unterschiede ausgewählter Parameter der spezifischen Abwehr zu erfassen, die durch die Supplementierung der probiotischen Kulturen *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin[®]) oder *Bacillus cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 (Toyocerin[®]) an tragenden und laktierenden Sauen und deren Würfe herbeigeführt wurden.

In zwei Versuchsdurchgängen sollten durch Sandwich-ELISA`s untersucht werden, inwieweit die vorgenannten probiotischen Kulturen Einfluss ausüben

1. auf das systemische Immunsystem bei klinisch gesunden, tragenden und laktierenden Sauen – durch quantitative Erfassung der IgG-Konzentrationen bei der Probiotikagruppe und der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, gemessen an den Gesamt-Serum-IgG-Mengen,
2. auf das lokale Immunsystem bei ebendiesen Gruppen durch quantitative Erfassung der sIgA-Konzentrationen in den Faeces und in der Molke,
3. auf die Ferkel der in 1. und 2. erfassten Sauen zu einem Zeitpunkt der erst beginnenden Eigensynthese der Immunglobuline und insbesondere während der Zeit der „immunologischen Lücke“, die für die Tiere verbunden ist mit dem Absetzen von der Mutter und zahlreichen Stressoren, gemessen an den Gesamt-Serum-IgG- und sIgA-Mengen in Serum bzw. Faeces.

Des Weiteren wurde in einem spezifischen ELISA Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e (Stx2e) bei *E. coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac im Serum ausgewählter Tiere aus dem ersten Versuchsdurchgang durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Immunologische Methodik

Um Antikörper, funktionelle Teile von Antikörpern bzw. Antigene nachzuweisen, können verschiedene Techniken genutzt werden. Dabei ist die diagnostische Aussagekraft eines immunologischen Verfahrens entscheidend von seiner Sensitivität und Spezifität abhängig. Der Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ist ein Testverfahren, das Antigene oder Antikörper durch einen Enzym-markierten Antikörper (Konjugat) und einer dadurch katalysierten Farbreaktion nachweisen kann. Je nach zu untersuchender Probe kommen verschiedene ELISA-Testformate zum Einsatz.

Im *kompetitiven* ELISA konkurrieren eine fixierte Menge von markiertem Antigen und eine unbekannte Menge der unmarkierten Antigenprobe um einen Antikörper. Es wird ein Unterschuss an Antikörpern eingesetzt, und das Verhältnis des markierten Antigens und des Analyten (Probenantigen) wird anschließend photometrisch gemessen. Die Intensität des Signals ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundenem Enzym, also umgekehrt proportional zur Menge an Analyt in der Probenlösung. Der Assay kann auch umgekehrt angewendet werden, um Antikörper zu messen. Dieses Prinzip lässt sich als direkter oder indirekter ELISA anwenden.

Bei *nicht-kompetitiven* Tests ist nur die Probe in einer limitierenden Konzentration vorhanden. Hier wird das Antigen von zwei Antikörpern gebunden, die beide im Überschuss vorhanden sind. Da der Analyt hier von zwei „Antikörperschichten“ umgeben ist, heißt dieser ELISA auch Sandwich-Immunoassay (CHAVEZ-OLORTEGUI *et al.*, 2001). Voraussetzung ist, dass der Analyt dabei mindestens zwei Bindungsstellen für Antikörper (Epitope) trägt. Er ist daher nicht für Haptene einsetzbar, da diese nur eine antigene Determinate aufweisen. Im ersten Schritt wird spezifischer Antikörper unspezifisch an die Mikrotiterplatte (MTP) gebunden. Durch Inkubation erfolgt eine Proteinabsättigung. Nach Waschschritten wird die zu testende antigenhaltige Lösung in den Verdünnungsstufen auf die Unterlage pipettiert. Nach Inkubation und weiteren Waschschritten wird der enzym-markierte Antikörper zugegeben, der wie der erste Antikörper spezifisch für das gesuchte Antigen sein muss. Im letzten Schritt wird ein Testsubstrat zugegeben, z.B. Meerrettichperoxidase, dessen Spaltung durch das Enzym einen Farbumschlag auslöst. Das photometrisch gemessene Signal ist hier direkt proportional mit der Menge an Analyt in der Proben-

lösung. Da dieses Format (Sandwich-ELISA) im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, soll er im Folgenden genauer erläutert werden.

2.1.1. Sandwich-ELISA

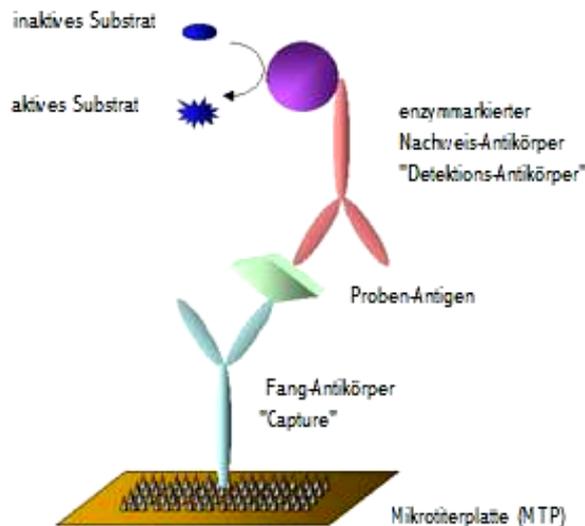


Abbildung 10: Aufbau des Sandwich-Modells

Zunächst wird der Fang-Antikörper, auch Capture-Antikörper, in die Kavitäten oder Wells einer MTP (meist spezielle 96-Well-MTP) aufgebracht und immobilisiert. Dazu verwendet man in der Regel Beschichtungspuffer, die gut auf Oberflächen absorbieren (Coating). Zur Absättigung und Blockierung noch freier Bindungsstellen der MTP wird anschließend mit einem geeigneten Reagenz inkubiert. Anschließend wird überschüssiges Material durch (zumeist mehrere) Waschschriffe entfernt. Im nächsten Arbeitsschritt wird die Probenlösung und der oder die Standards in den verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen und inkubiert, woran sich weitere Waschschriffe anschließen. Im Anschluss daran wird der enzymmarkierte Sekundär-Antikörper (auch Nachweis-, Detektor- oder Detektions-Antikörper) inkubiert. Häufig wird Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP) verwendet, da dieser äußerst empfindlich als Marker reagiert (PORSTMANN und KIES-SIG, 1992). Durch erneutes Waschen wird überschüssiger zweiter Antikörper entfernt und dann ein Farbsubstrat zugegeben. Das Enzym bildet einen Komplex mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und ist daher in der Lage, organische Substrate zu oxidieren. Durch das Enzym wird das zunächst farblose Substrat umgewandelt. Vor der photometrischen Messung wird oft ein Reagenz zugefügt, um die Substratumwandlung abzustoppen. Die anschlie-

ßend gemessene Intensität mittels ELISA-Reader ist proportional zur Antigen-Menge in der Probe.

2.2. Geräte und Materialien

2.2.1. Geräte

Folgende Geräte wurden zur Durchführung verwendet:

Gerät - Typ	Hersteller / Firma
Brutschrank - Certomat S	B. Braun Biotech
Gefrierschrank	Liebherr
Kühlschrank - electronic	Siemens
Kühlzentrifuge – Vacuum-Concentrator BA-VC-300 H	Helmut Saur, Reutlingen
Kühlzentrifuge – 5417 R	Eppendorf
Kurzzeitmesser	C. Roth, Karlsruhe
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	C. Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten-Autowasher – ELX 50	BIO-TEK Instruments
Mikrotiterplatten-Schüttler – Titermax 100	Fa. Heidolph
Pipettiergeräte (verschiedene Größen) – eppendorf research	Eppendorf
Plattenphotometer – Multiscan Ascent (Versuch 3)	Fa. Labsystems
Plattenphotometer - Tecan-Spectra	Fa. Tecan
Tischzentrifuge - Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Vortexer - Typ Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohe-mia

Tabelle 9: Geräte zur Versuchsdurchführung

2.2.2. Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller / Firma
Pipettenspitzen 0,5-10; 10-100; 30-300; 100-1000; 500-5000 μ l	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	C. Roth, Karlsruhe
Rührspatel	Merck, Darmstadt
Kanülen, 1,2 x 40 mm	Heiland, Hamburg
Mikrotiterplatten (MTP) – high binding mit Abdeckung, 96 Vertiefungen (Versuche 1 und 2)	Greiner, Frickenhausen
MTP – U96 Polysorp Nunc Immuno (Versuch 3)	Nunc, Wiesbaden
Latex- Einmalhandschuhe	C. Roth, Karlsruhe
Mundschutz	C. Roth, Karlsruhe
Becher, Kolben und Flaschen verschiedener Größen	Instituts-Inventar

Tabelle 10: Laborbedarf

2.3. Reagenzien / Chemikalien

Bezeichnung - Name	Hersteller
Na ₂ CO ₃ – Natriumcarbonat	C. Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃ – Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
NaCl – Natriumchlorid	C. Roth, Karlsruhe
KCl – Kaliumchlorid	C. Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O - di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	C. Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄ – Kaliumdihydrogenphosphat	C. Roth, Karlsruhe
BSA – bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Corp.
Tween 80	C. Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	C. Roth, Karlsruhe
BSA – bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Corp.
H ₂ SO ₄ – Schwefelsäure 1 M	C. Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich Corp.
Leupeptin Hemisulfat	Sigma-Aldrich Corp.
4-(2-Aminoethyl)-Benzenesulfonyl Fluoride	Sigma-Aldrich Corp.
AEBSF-Hydrochlorid – 4-(2-Aminoethyl) Benzene Sulfonyl Fluoride-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corp.
ABTS-2,2-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin- 6-sulfonsäure) Diammoniumsalz	Sigma-Aldrich Corp.
OPDA – o-Phenylendiamin-Dichlorid	C. Roth, Karlsruhe
Dextran-Sulfat – Dextran Sulfate Sodium Salt from <i>Leuconostoc ssp.</i>	Sigma-Aldrich Corp.
H ₂ O _{dest}	C. Roth, Karlsruhe

Tabelle 11: Reagenzien und Chemikalien

2.3.1. Puffer und Lösungen

- Beschichtungspuffer:

Carbonatpuffer, pH 9,6 (Coating buffer 1):

Na ₂ CO ₃	3,1 g
NaHCO ₃	5,9 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Citrat-Puffer, pH 5 (Coating-buffer II):

Citronensäure-Monohydrat	10,3 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	18,2 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

*- Waschpuffer*Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS 1M), pH 7,42:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,26 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

bzw. PBS-Tween:

zuzüglich Tween 80 0,05 % (v/v) in PBS

*- Blockierungspuffer*PBS 1% BSA:

BSA	1 g
PBS	ad 100ml

*- Farbreagenz*OPDA, gelöst in Citratpuffer:

OPDA	4 mg
Citratpuffer pH 5,2	10 ml
H ₂ O ₂ (30 %)	20 µl (v/v)

*- Stoppreagenz*H₂SO₃ (Schwefelsäure) 1 M

Folgende Lösungen wurden für die Herstellung des Extraktionspuffers zur Gewinnung von sIgA aus den Faeces verwendet:

PIC (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail) - (nach HANEBERG *et al.*, 1994):

Aprotinin	0,1 mg/ml H ₂ O
Leupeptin-Hemisulfat	0,5 mg/ml H ₂ O
AEBSF-Hydrochlorid	4,8 mg/ml H ₂ O

Bestatin-Stammlösung:

Bestatin-Hydrochlorid	1 mg/ml PBS
-----------------------	-------------

Zur Extraktion von sIgA aus den Faecesproben wurde folgender Puffer verwendet:

Extraktionspuffer

Magermilchpulver	2,5g
PBS	ad 50 ml
- 30 – 60 min bei Raumtemperatur rühren	
- dann weiter auf Eis:	
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (PIC), s.o.	500 µl
Bestatin-Stammlösung, s.o.	100µl

2.3.2. Antikörper und Nachweisantikörper

Als Primärantikörper (Capture-Antikörper) kamen bei der Beschichtung der MTP folgende polyklonale Antikörper zum Einsatz:

zum Nachweis von IgG im Serum:

Ziege-anti-Schwein IgG

Immunglobulinfraktion aus Ziegenserum

Verdünnung: 1/100 -1/1000

Spezifität: AA/41

Hersteller: Serotec, Kidlington, Oxford

zum Nachweis von sIgA im Faeces und in der Molke:

Ziege-anti-Schwein IgA

Immunglobulinfraktion aus Ziegenserum

Verdünnung: 1/100 -1/1000

Spezifität: AA/40

Hersteller: Serotec, Kidlington, Oxford

zum Nachweis von rHis-StxB2e im Serum (im spezifischen ELISA):

Antigen rHis-StxB2e (eigene Herstellung des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und der Klinik für Wiederkäuer und Schweine, Justus-Liebig-Universität Gießen)

Folgende Detektionsantikörper wurden eingesetzt, verdünnt mit PBS-Tween + 1% BSA:

zum Nachweis von IgG im Serum:

Ziege-anti-Schwein IgG, konjugiert mit HRP (Horseradish Peroxidase)

Immunglobulinfraktion aus Ziegenserum

Spezifität: AA/41P

Verdünnung: 1/10.000 – 1/100.000

Hersteller: Serotec, Kidlington, Oxford

zum Nachweis von sIgA in den Faeces und in der Molke:

Ziege-anti-Schwein IgA, konjugiert mit HRP (Horseradish Peroxidase)

Immunglobulinfraktion aus Ziegenserum

Spezifität: AA/40P

Verdünnung: 1/10.000 – 1/100.000

Hersteller: Serotec, Kidlington, Oxford

zum Nachweis von rHis-StxB2e im Serum (spezifischer ELISA):

Ziege-anti-Schwein-IgG, konjugiert mit HRP (Horseradish Peroxidase)

Immunglobulinfraktion aus Ziegenserum

Nr. 114-035-003

Hersteller: Fa. Dianova, Hamburg

2.3.3. Probenmaterial

Als Probenmaterial diente in allen 3 Versuchen:

- Serum
- Faecesextrakt
- Molke

2.4. Software

Für die statistische Darstellung und Auswertung wurden die Programme Tecan Spectra, Excel 2000 sowie SPSS 12.0 genutzt.

3. Versuch 1

Untersuchungen zum Einfluss von *E. faecium* NCIMB 10415 (Cylactin[®]) auf den Immunstatus von tragenden und laktierenden Sauen und deren Ferkeln

3.1. Tiere und Fütterung

Der Versuch wurde durchgeführt an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Tierernährung, Standort Berlin-Düppel. An tragenden Sauen und ihren Würfen wurde in einem interdisziplinären Forschungsprojekt die Wirkung des probiotischen Futterzusatzes *E. faecium* NCIMB 10415 (Cylactin[®]) untersucht.

26 tragende Sauen der Rasse Landrasse und Duroc wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe Sauen wurde für 17 Wochen (90 Tage vor dem errechneten Geburtstermin bis zum 28. Tag nach der Geburt) mit dem oben beschriebenen Probiotikum supplementiert (= Probiotikagruppe), die andere Gruppe fungierte als Kontrollgruppe und bekam das gleiche Futter ohne Probiotikum. Die Sauen wurden bis zum 10. Tag vor dem errechneten Abferkeltermin in Gruppen von 3 - 4 Tieren, anschließend in Einzelboxen mit Einstreu bis zum Absetzen ihrer Ferkel gehalten. Die Ferkel der Probiotikagruppe wurden mit Beginn der Futteraufnahme ab dem 15. Lebenstag (LT) bis einschließlich des 56. LTes mit dem gleichen Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 supplementiert. Alle Ferkel wurden am 28. LT abgesetzt und zu zweit oder dritt in Flat-Deck-Batterien mit 2 m² Grundfläche gehalten. Beide Gruppen wurden strikt räumlich getrennt bei ansonsten identischen Haltungsbedin-

gungen. Jede Gruppe wurde von eigenen Tierpflegern versorgt, sämtliche Gebrauchsmittel wie z. B. Desinfektionsspray wurden separat angewendet. Ebenso wurde der Kontakt zwischen den Tierpflegern auf ein notwendiges Minimum reduziert, um die mikrobiellen Bedingungen der Untersuchungsgruppen nicht zu vermischen. Der Kot der Kontrollgruppe wurde regelmäßig auf „Abwesenheit“ des Probiotikums untersucht und bestätigt (MACHA *et al.*, 2004). Die Beleuchtung war täglich 16 Stunden eingeschaltet, die Raumtemperatur lag in etwa um 21,5 °C und die Luftfeuchtigkeit um 65 %. Das Grundfutter für die Sauen beider Gruppen bestand aus Gerste und Weizen in pelletierter Form, die Ferkel wurden mit Weizen und Sojaextraktionsschrot als Masch gefüttert. Die Ferkel erhielten ein Vorstarter-Futter vom 15. bis 28. und ein Ferkelaufzuchtfutter vom 29. bis 56. LT, beides wurde inklusive Wasser *ad libitum* angeboten. Die Rationskalkulationen erfolgten gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GFE).

Das Probiotikum ist deklariert als NCIMB 10415, ebenso beschrieben als *E. faecium* SF 68 (MÄNNER und SPIELER, 1997; BENYACOUB *et al.*, 2003). *E. faecium* NCIMB 10415 wurde unter der Warenbezeichnung *Cylactin*[®] von Cerbios-Pharma (batch no. AG0551, Barbengo, Switzerland) als Futter-Additiv bezogen und in Kapselform (Mikrokapseln) den Futterpellets bei 50 °C beigemischt. Die Konzentration des supplementierten *E. faecium* im Futter wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und betrug bei den tragenden Sauen $1,6 (\pm 0,5) \times 10^6$, bei den laktierenden Sauen $1,2 (\pm 0,3) \times 10^6$, den Saugferkeln $1,7 (\pm 0,8) \times 10^5$ und den abgesetzten Ferkeln $2,0 (\pm 0,4) \times 10^5$ verfügbare Zellen / g Futter (MACHA *et al.*, 2004). Nur diejenigen Würfe wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt, welche auch nach 24 Stunden *post partum* (*p. p.*) wenigstens 9, aber nicht mehr als 15 Ferkel zählten. Von beiden Gruppen wurde je ein zufällig ausgewähltes Ferkel pro Wurf am 14., 28., 35. und 56. LT mit Pentobarbital euthanasiert und nach mikrobiologischen, immunologischen, physiologischen und histologischen Kriterien an verschiedenen Instituten untersucht.

Die eigenen Untersuchungen bezogen sich auf die quantitative Messung der Gesamt-Immunglobulin-Titer in Serum (IgG), Faeces und Molke (sIgA) bei den Sauen sowie in Serum (IgG) und Faeces (sIgA) bei den Ferkeln. Um die Versuchsergebnisse nicht falsch zu interpretieren, wurden die Ferkel weder geimpft noch anderweitig behandelt. Krank gewordene Tiere wurden aus dem Versuch entfernt. Die Sauen erhielten außerhalb des Untersuchungszeitraumes und zeitlich ohne Auswirkungen auf eigene Messergebnisse eine PRRS (porcine reproductiv and respiratory syndrom) -Impfung.

3.2. Bestimmung des Gesamt-IgG im Serum

3.2.1. Gewinnung und Umfang der Proben

Zunächst wurde allen Tieren Vollblut aus der *Vena jugularis* mittels Kanüle und Zitratröhrchen entnommen. Anschließend wurde das Blut eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) zur Optimierung der Blutgerinnung inkubiert. Danach wurde die Probe zentrifugiert mit 10.000 x g für 15 min und 4 °C. Das überstehende Serum wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die erste Blutentnahme erfolgte bei den Sauen vor Beginn der Supplementierung mit *E. faecium* (91. d a. p.) zur Erstellung von Basiswerten. Der zeitliche Ablauf der Blutentnahme bei den Sauen ist in Abbildung 11 dargestellt. Insgesamt wurden 165 Blutproben gewonnen (94 Probiotika / 71 Kontrolle) zu 7 verschiedenen Zeitpunkten der Gestation bzw. Laktation.

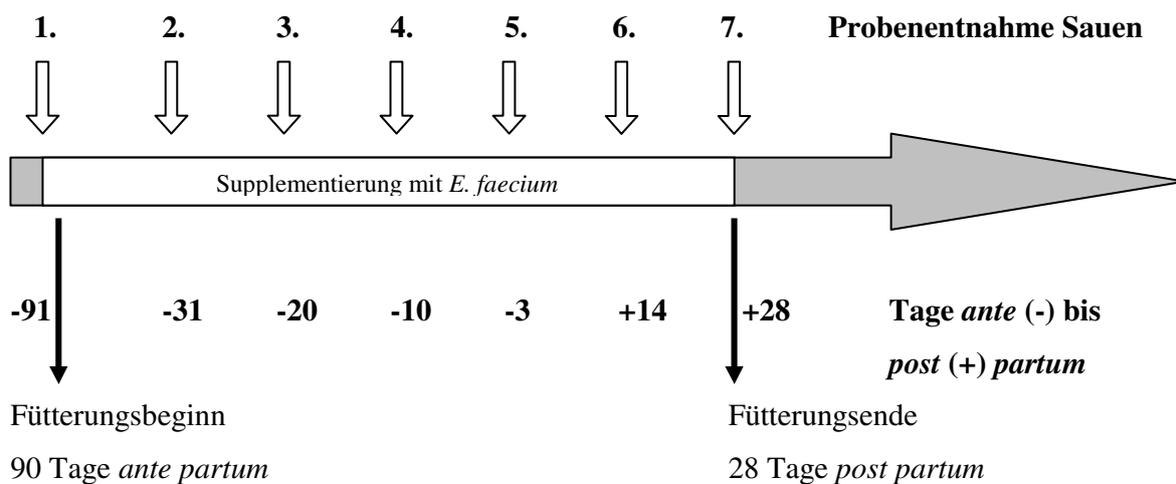


Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der Blutprobenentnahme Sauen, Versuch 1

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Gestations- bzw. Laktationstag. Zudem ist der Fütterungszeitraum mit *E. faecium* NCIMB 10415 (weiß im Pfeil) hervorgehoben.

Bei den Ferkeln wurden in 8 Ziehungen im wöchentlichen Abstand Blutproben entnommen, beginnend am 7. LT und endend am 56. LT, siehe Abbildung 12. Insgesamt wurden 148 Serumproben (78 Probiotika / 70 Kontrolle) untersucht.

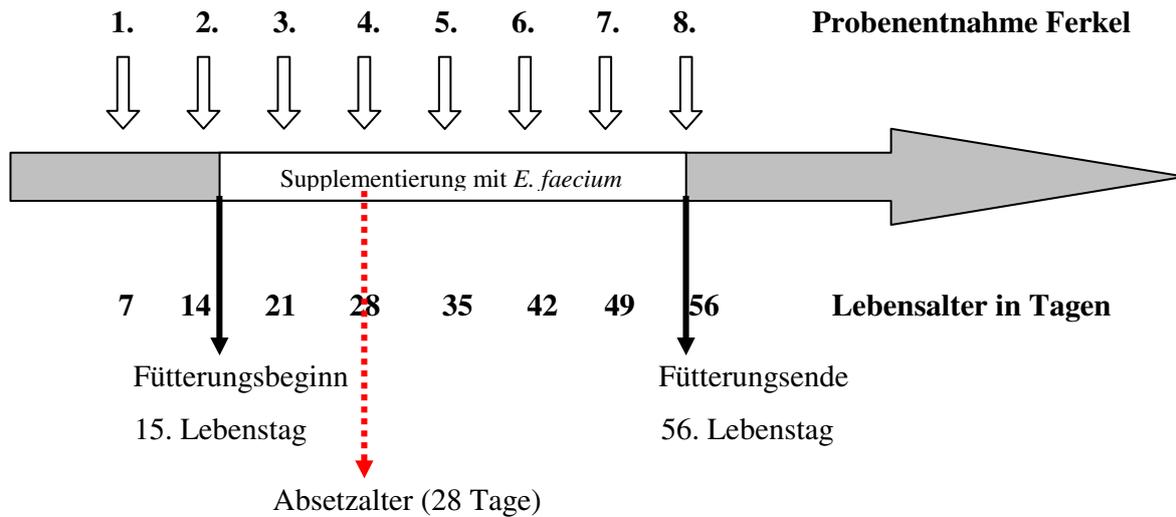


Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Blutprobenentnahme Ferkel, Versuch 1

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Lebensalter in Tagen. Zudem sind der Absetz-Zeitpunkt und der Fütterungszeitraum mit *E. faecium* NCIMB 10415 hervorgehoben.

3.2.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Der Nachweis für die Bestimmung des Gesamt-IgG im Serum der Sauen bzw. der Ferkel wurde mit einem Sandwich-ELISA durchgeführt. Das Serum wurde zuvor aliquotiert 2 x a 100 µl und eingefroren bei -20 °C, die Originalprobe anschließend bei -80 °C. Da kein Referenzserum zur Verfügung stand, wurde von 30 Tierproben je 100 µl Serum entnommen, vermischt und in Aliquots zu je 50 µl abgefüllt. Diese Lösung fungierte als eigene „Kontrolle“ und wurde wie die Proben auf die MTP verbracht. Erst nach allen durchgeführten Messungen wurde diese Kontrolle rechnerisch standardisiert. Zunächst wurden auf jede MTP 4 Proben und die Kontrolle als Doppelbestimmung und in den Verdünnungsstufen 2^{18} bis 2^{24} aufgetragen wie in Abbildung 13 ersichtlich:

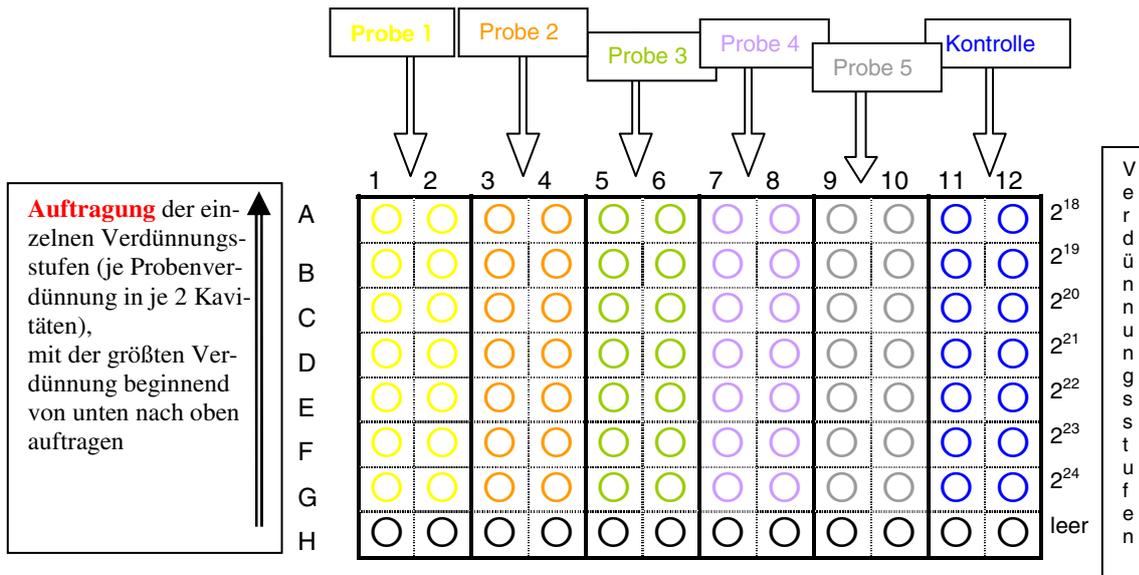


Abbildung 13: Beschichtung der MTP zur Versuchsoptimierung

Ersichtlich sind die Anzahl der Proben und die Anzahl der Verdünnungsstufen (2^{18} bis 2^{24}). Um das Anhaften der Probe an der Pipettenspitze und damit verbundene falsch hohe Werte zu minimieren, wurden die Proben von unten nach oben (z.B. beginnend ab G1 und G2 (=höchste Verdünnungsstufe) - bis A1 und A2 (=niedrigste Verdünnungsstufe) aufgetragen.

Ein Beispiel eines typischen Messwertverlaufes zeigt die folgende Abbildung:

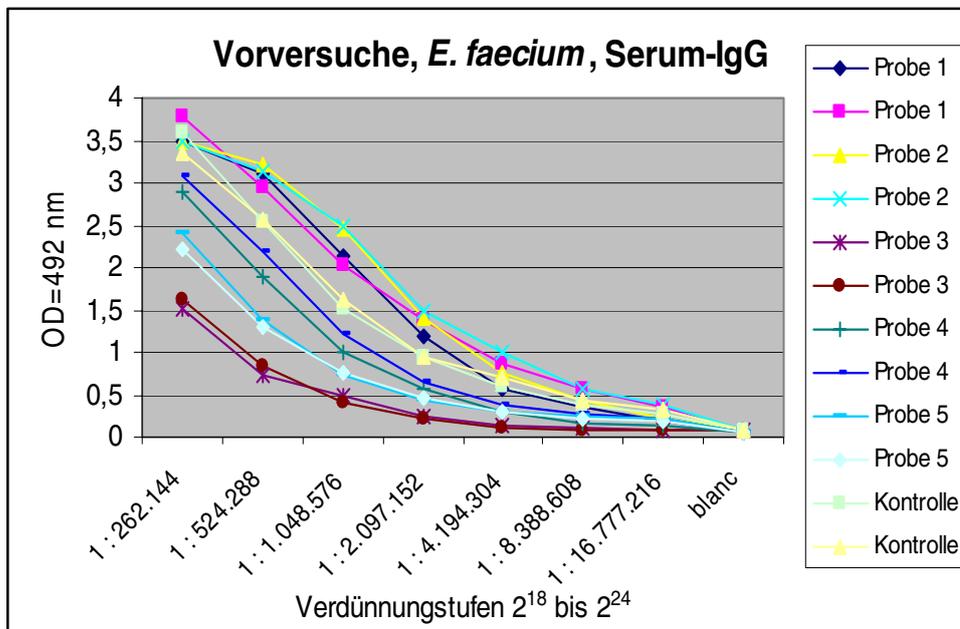


Abbildung 14: grafische Darstellung des Messwertverlaufes, Vorversuch zu Versuch 1

Ersichtlich sind die Verdünnungsstufen $1 : 2^{18}$ bis $1 : 2^{24}$, die im Zweifachansatz aufgetragenen Proben, die Kontrolle und die Leerwerte (= blanc). Gemessen wurde bei einer Optischen Dichte (= OD) von 492 nm.

Durch die Menge der Proben bedingt, wurden die Verdünnungsstufen nach Auswertung des sigmoidalen Kurvenverlaufes (Messung im steilsten Bereich der Kurve) mit den größten Extinktionsunterschieden von 7 auf 4 reduziert, gleichzeitig wurden die Verdünnungen als 3fach-Ansatz auf die MTP aufgetragen und mehrere Kavitäten zur Bestimmung des Leerwertes freigelassen, womit nun jeweils 6 Proben und die Kontrolle auf die MTP verbraucht werden konnten. Die Beschichtung der MTP während der Versuchsdurchführung veranschaulicht Abbildung 15.

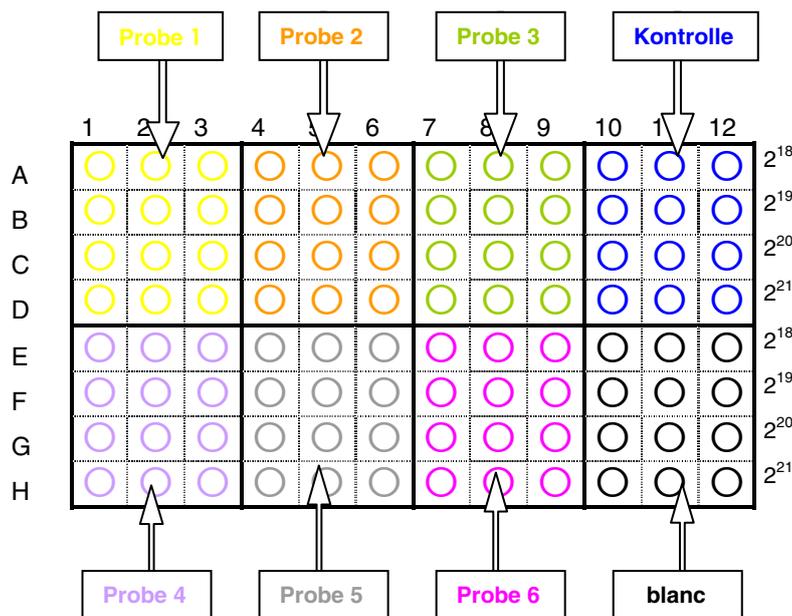


Abbildung 15: Beschichtung der MTP nach Versuchsoptimierung

Ersichtlich sind die Anzahl der Proben, die Anzahl der Verdünnungsstufen (2^{18} bis 2^{21}) und die Anzahl der leeren Kavitäten (= blanc).

3.2.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

Das Protokoll des Sandwich-ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgG im Serum zeigt Tabelle 12:

	Arbeitsschritt	$\mu\text{l}/\text{Well}$	Inkubation / Bemerkung
1	Beschichtung der Mikrotiterplatte (MTP) mit dem Fang-Antikörper (=Capture-IgG) 1 : 250 in Carbonatpuffer pH 9,5	50	2 h bei 37 °C, über Nacht bei 4 °C / Coating
2	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
3	Blockierung mit PBS + 1% BSA	200	2 h bei 37 °C / Absättigung
4	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
5	Verdünnung der Serumproben incl. Kontrolle und Auftrag als Dreifachansatz: 1 : 2 ¹⁸ bis 1 : 2 ²¹ mit PBS + 1 % BSA	50	3 h bei 37 °C / Inkubation der Proben
6	Waschen mit PBS + Tween 0,05 %, pH 7,42; 5x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
7	Zugabe des Nachweis-Antikörpers: (NAK-IgG) 1 : 800 in PBS-Tween 0,05 % + 1 % BSA	50	2 h bei 37°C / Konjugation
8	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
9	Färben mit OPDA-Lösung OPDA + Citratpuffer + H ₂ O ₂	100	20 min bei RT im Dunkeln / Substratauftrag
10	Abstoppen der Umsetzungsreaktion mit Schwefelsäure 1M durch Absenkung des pH	50	RT / Abstoppen
11	Photometrische Messung bei einer Optischen Dichte (OD) von 492 nm		Messung innerhalb von 5 Minuten nach Abstoppen

Tabelle 12: Protokoll der einzelnen Arbeitsschritte des Sandwich-ELISA zum Nachweis des Gesamt- IgG im Serum

Neben den durchgeführten Arbeitsschritten sind die aufgetragenen Mengen pro Kavität in $\mu\text{l}/\text{Well}$ und die Temperatur- und Zeitangaben ersichtlich. Fettgedruckt (rechte Spalte) wurde die Kurzbezeichnung des jeweiligen Arbeitsschrittes.

Die Inkubation erfolgte bei gleichzeitigem Schütteln mit 140 rpm. Nach jedem Waschen mit insgesamt 5 Waschrissen wurden die MTPn mit der Oberseite nach unten gekehrt auf ein sauberes Tuch gut ausgeklopft. Die verwendeten Proben wurden nach Herstellung der

Verdünnungsschritte sofort wieder bei -20 °C eingefroren, um evtl. für zusätzliche Untersuchungen genutzt werden zu können. Neben dem Auftragen der Proben und der Kontrolle auf die MTP wurden mehrere Kavitäten (siehe Abb. 15) als Leerwerte bzw. blanc genutzt. Während der einzelnen Inkubationsschritte wurden die Platten jeweils durch einen speziellen Deckel für ELISA-Platten abgedeckt.

3.3. Bestimmung des Gesamt-IgA in den Faeces

3.3.1. Gewinnung und Umfang der Proben

Faeces wurde den Sauen mit Hilfe eines Handschuhes aus dem Rektum entnommen, bei den Ferkeln entweder unmittelbar nach der Defäkation aufgefangen oder ebenso aus dem Rektum entnommen. Die Proben wurden mit ihren zugehörigen Codes beschriftet und sofort bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung / Untersuchung eingefroren.

Sauenproben wurden gewonnen zu 7 verschiedenen Zeitpunkten. Diese entsprechen den dargestellten Zeitpunkten aus Abbildung 11 (siehe Punkt 3.2.1.).

Insgesamt wurden 171 Proben (94 Probiotika / 77 Kontrolle) untersucht zu 7 verschiedenen Messzeitpunkten.

Im Versuch 1 wurden 256 Ferkel-Faecesproben (123 Probiotika / 130 Kontrolle) zu 8 verschiedenen Zeitpunkten untersucht, diese entsprechen Abbildung 12 (siehe 3.2.1.).

3.3.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Zur Bestimmung des Gesamt-IgA in den Faeces der Sauen und Ferkel wurde ebenfalls ein Sandwich-ELISA durchgeführt.

Nach dem Gewinnen der Faecesproben wurde eine etwa erbsengroße Menge je Originalprobe in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß durch einen Spatel überführt und mit Parafilm verschlossen. Dieser wurde mit einer Kanüle perforiert und die Probe dann 4 h ohne Wärmezufuhr in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Extraktion der Antikörper aus den getrockneten Faeces wurde ein Extraktionspuffer verwendet (nach HANEBERG *et al.*, 1994, siehe Punkt 2.3.1.). Für die Extraktion wurden die getrockneten Faecesproben gewogen,

ca. 2 mg in ein Reaktionsgefäß überführt und nach nochmaligem Wiegen mit der 15-fachen Menge des Extraktionspuffers rehydratisiert. Anschließend wurde mehrfach invertiert, bis eine homogene Lösung entstand. Nach 60 min wurde die Suspension zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C). Der erhaltene Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde das Sediment ein zweites Mal, diesmal mit der 10-fachen Menge des Extraktionspuffers, rehydratisiert. Der erhaltene zweite Überstand wurde zusammen mit dem ersten Überstand invertiert und danach 5 min zentrifugiert (4 °C, 3000 x g). Der klare Überstand wurde je Probe in 3 Reaktionsgefäßen a 100 µl aliquotiert. Während der gesamten Extraktion wurde darauf geachtet, dass alle Proben und verwendete Lösungen auf Eis lagerten. Außer den verwendeten Proben wurden die originalen Faecesproben, die getrockneten Faecesproben und die Faecesextrakte für eventuelle weitere Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt.

Ebenso wie bei der Gesamt-IgG-Bestimmung im Serum stand auch hier keine Referenzlösung zur Verfügung. Es wurde daher ebenso verfahren wie in Punkt 3.2.2. beschrieben.

Die MTP wurde zunächst wie in den Vorversuchen entsprechend 3.2.2 beschichtet, beginnend mit der Verdünnung 1 : 2⁷. Auch hier wurden später nur noch 4 Verdünnungsstufen (6 Proben und die Kontrolle) nach Ermittlung der größten Extinktionsunterschiede als 3-fach-Bestimmung auf die MTP aufgetragen.

Das mitgeführte Protokoll zeigt Tabelle 13.

3.3.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

	Arbeitsschritt	µl/Well	Inkubation / Bemerkung
1	Beschichtung der MTP mit Capture-IgA 1:250 in Carbonatpuffer pH 9,5	50	2 h bei 37°C, dann über Nacht bei 4 °C / Coating
2	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
3	Blockierung mit PBS + 1 % BSA	200	2 h bei 37 °C / Absättigung
4	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
5	Verdünnung der Faecesextrakt-Proben inklusive der Kontrolle als Dreifachansatz: 1 : 2 ⁷ bis 1: 2 ¹⁰ mit PBS + 1 % BSA	50	3 h bei 37 °C / Probenauftrag
6	Waschen mit PBS + Tween 0,05 %, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
7	Zugabe des Nachweis-Antikörpers: NAK-IgA 1: 800 in PBS-Tween 0,05 % + 1 % BSA	50	2 h bei 37 °C / Konjugation
8	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
9	Färben mit OPDA-Lösung OPDA + Citratpuffer + H ₂ O ₂	100	20 min bei RT, Im Dunkeln / Substratauftrag
10	Abstoppen der Umsetzungsreaktion mit Schwefelsäure 1M	50	RT / Abstoppen
11	Photometrische Messung bei einer OD von 492 nm		Messung innerhalb von 5 Minuten nach Abstoppen

Tabelle 13: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Sandwich-ELISA zum Nachweis des Gesamt- IgA in den Faeces

Neben den durchgeführten Arbeitsschritten sind die aufgetragenen Mengen pro Kavität in µl/Well und die Temperatur- und Zeitangaben ersichtlich.

Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei gleichzeitigem Schütteln mit 140 rpm. Auch hier wurden die MTPn nach den 5 Waschsritten gut ausgeklopft. Die Nutzung neuer Pipettenspitzen für jede Probe war obligatorisch.

3.4. Bestimmung des Gesamt-IgA in der Molke

3.4.1. Gewinnung und Umfang der Proben

Von 25 Sauen (16 Probiotika / 9 Kontrolle) wurden zu 4 verschiedenen Zeitpunkten Kolostrum- bzw. Milchproben entnommen, siehe Abbildung 16.

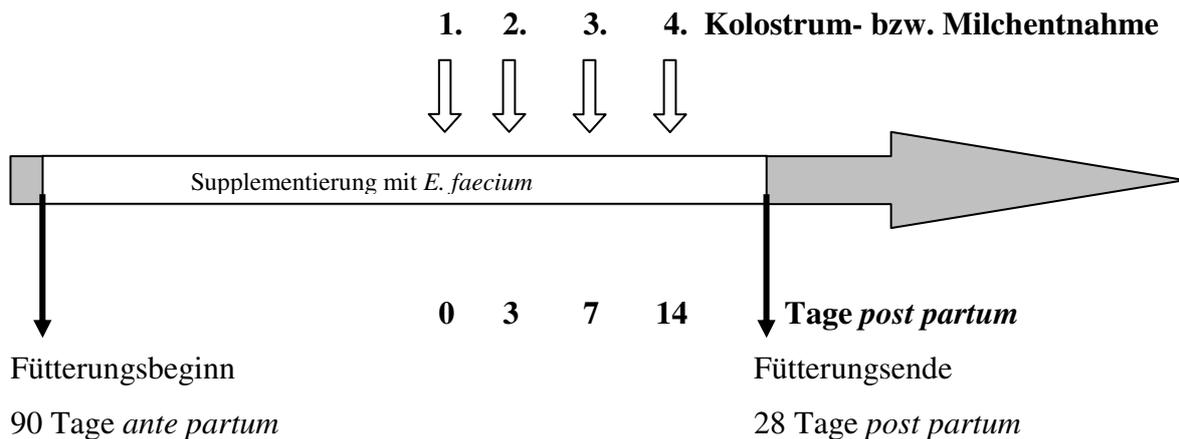


Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der Kolostrum- bzw. Milchprobenentnahme, Sauen, Versuch 1

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Laktationstag. Zudem ist der Fütterungszeitraum mit *E. faecium* NCIMB 10415 hervorgehoben.

3.4.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Um Molke zu gewinnen, mussten die Kolostrum- bzw. Milchproben zuvor aufbereitet werden. Zunächst wurden die Proben zentrifugiert (3 h, 10.000 x g, 4 °C). Anschließend wurde mit einer Kanüle die Fett- und Caseinschicht perforiert, die flüssige Phase entnommen und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die gewonnene Flüssigkeit wurde erneut zentrifugiert (3 h, 10.000 x g, 4 °C). Die gewonnene Lösung wurde in ein weiteres Gefäß verbracht, um anschließend die Lipoproteine zu fällen. Hierzu wurde die Flüssigkeitsmenge gewogen und pro 1 g Molke 20 µl Dextransulfat und 100 µl Calciumchlorid zugegeben. Die nun mit gefälltem Material durchsetzte Probe wurde abermals zentrifugiert (10 min, 1500 x g, 4 °C). Der klare Überstand wurde dann in je 2 Aliquots je Probe a 100 µl pipetiert und bei -20 °C tiefgefroren. Durch die teilweise sehr geringen Milchmengen und die starke Verklumpung nach Zugabe von Dextransulfat und Calciumchlorid konnte von einigen Proben kein klarer Überstand gewonnen werden. Diese Proben wurden verworfen.

Zur Durchführung des ELISA's wurden zunächst 7 Verdünnungsstufen hergestellt, ausgehend von 1 : 2¹⁴ bis 1 : 2²⁰. Nach Auswertung der Extinktionsunterschiede wurden auch hier zur eigentlichen Versuchsdurchführung nur noch 4 Verdünnungsstufen (1 : 2¹⁶ bis 1 : 2¹⁹) als Dreifachansatz auf die MTP aufgetragen, siehe Tabelle 14.

3.4.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

	Arbeitsschritt	µl/Well	Inkubation / Bemerkung
1	Beschichtung der MTP mit Capture-IgA 1:250 in Carbonatpuffer pH 9,5	50	2 h bei 37 °C, dann über Nacht bei 4 °C / Coating
2	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
3	Blockierung mit PBS + 1 % BSA	200	2 h bei 37 °C / Absättigung
4	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
5	Verdünnung der Molke-Proben 1: 2 ¹⁶ bis 1 : 2 ¹⁹ mit PBS + 1 % BSA	50	3 h bei 37 °C / Probenauftrag
6	Waschen mit PBS + Tween 0,05 %, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
7	Zugabe des Nachweis-Antikörpers: NAK-IgA 1: 800 in PBS-Tween 0,05 % + 1 % BSA	50	2 h bei 37 °C / Konjugation
8	Waschen mit PBS, pH 7,42; 5 x mittels ELISA-Washer	200	Waschen
9	Färben mit OPDA-Lösung OPDA + Citratpuffer + H ₂ O ₂	100	20 min bei RT; Im Dunkeln / Substratauftrag
10	Abstoppen der Umsetzungsreaktion mit Schwefelsäure 1M	50	RT / Abstoppen
11	Photometrische Messung bei 492 nm		Messung innerhalb von 5 Minuten nach Abstoppen

Tabelle 14: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Sandwich-ELISA zum Nachweis des Gesamt-IgA in der Molke

Neben den durchgeführten Arbeitsschritten sind die aufgetragenen Mengen pro Kavität in µl/Well und die Temperatur- und Zeitangaben ersichtlich.

4. Versuch 2

Untersuchungen zum Einfluss von *Bacillus cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 (Toyocerin[®]) auf den Immunstatus von tragenden und laktierenden Sauen und deren Ferkeln

4.1. Tiere und Fütterung

Der Versuch 2 wurde ebenso wie der Versuch 1 an der Freien Universität Berlin im Rahmen eines interdisziplinären Forschungsprojektes durchgeführt.

Jeweils 10 Sauen der Rasse Landrasse und Duroc wurden in eine Probiotika-Gruppe und eine Kontroll-Gruppe eingeteilt. Die Supplementierung der Probiotikatiere erfolgte mit *Bacillus cereus* var. Toyoi (Toyocerin[®]) ab dem 25. Trächtigkeitstag. Die Ferkel der probiotisch gefütterten Sauen erhielten ab dem 14. LT einen Pre-Starter und ab dem 28. LT ein Ferkelaufzuchtfutter mit freiem Zugang und demselben probiotischen Futteradditiv bis zum 56. LT. Am 28. LT wurden die Ferkel abgesetzt. Die unbehandelte Gruppe (Kontrolle) wurde bei ansonsten adäquaten Haltungs- und Fütterungsbedingungen getrennt von der Probiotikagruppe gehalten. Als Basismischung für die Sauen beider Gruppen diente Weizen und Gerste, die Ferkel erhielten Weizen und Sojaextraktionsschrot. Die Sauen der Probiotikagruppe erhielten Toyocerin[®] in der Futtermischung (in Zellzahlen angegeben) 3×10^8 je kg ursprüngliche Substanz (uS) und die Ferkel $1,2 \times 10^9$ /kg uS. Mitarbeiter des Bereiches Tierernährung ermittelten die durchschnittliche Konzentration des Gehaltes an Bazillussporen im *Jejunum*. Diese lag bei den tragenden Sauen bei $2,6 (\pm 1,0) \times 10^5$; bei den laktierenden Sauen bei $4,0 (\pm 1,2) \times 10^5$; bei den Saugferkeln bei $1,3 (\pm 0,5) \times 10^6$ und bei den Absetzern bei $1,4 (\pm 0,4) \times 10^6$ KBE/g Trockenmasse.

Ein zufällig gewähltes Ferkel jeder Gruppe wurde am 14., 21., 35. und 56. Tag mit Ketamin narkotisiert und nach der Blutentnahme aus der *Vena jugularis* mit Pentobarbital euthanasiert. Diese Tierproben wurden insbesondere in den anderen Forschungsgruppen eingehender untersucht.

Die Darmproben aller Ferkel wurden im Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) auf das Vorhandensein auf Rota-, Corona-, und TGE-Viren untersucht. Es wurde kein Hinweis für diese Erkrankungen gefunden.

Es wurden 124 Ferkelproben zur Untersuchung des Gesamt-IgG im Serum untersucht (60 Probiotika, 64 Kontrolle) zu 8 Zeitpunkten von 7. bis 56. LT, siehe Abbildung 18:

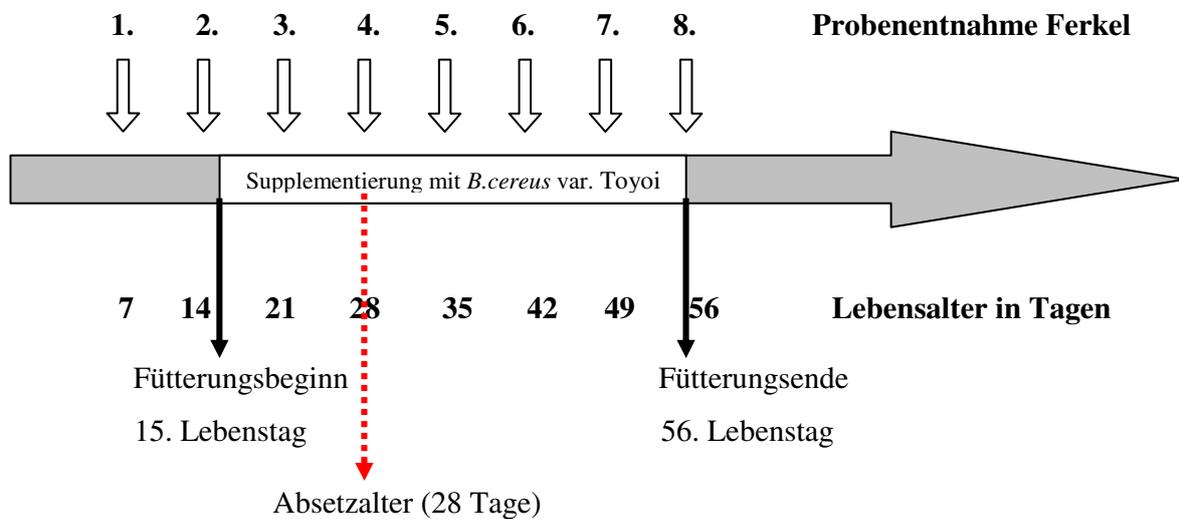


Abbildung 18: Zeitlicher Ablauf der Blutprobenentnahme Ferkel, Versuch 2

Angegeben sind die Anzahl der Blutentnahme mit dem dazugehörigen Lebensalter in Tagen. Zudem sind der Absetz-Zeitpunkt und der Fütterungszeitraum mit *B. cereus* var. Toyoi (Toyocerin®) hervorgehoben.

4.2.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Der Versuchsaufbau entsprach dem Versuch 3.2.2.. Auch hier wurden zunächst nach der Durchführung mehrerer ELISA`s mit 7 Verdünnungsstufen und Auswertung des steilsten Verlaufes der sigmoidalen Kurve die 4 Verdünnungsstufen mit den größten Extinktionsunterschieden gewählt, beginnend mit 1: 2¹⁸. Da auch hier ein Goldstandard fehlte, wurde aus dem Invertieren von je 100 µl aus 30 verschiedenen Proben ein Standard gebildet, welcher bei allen MTP als Kontrolle mit aufgetragen wurde. Die Beschichtung der MTP entsprach Abbildung 15.

4.2.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

Das Protokoll des Sandwich- ELISA entsprach dem dargestellten Protokoll, siehe Punkt 3.2.3.; Tabelle 12.

4.3. Bestimmung des Gesamt-IgA in den Faeces

4.3.1. Gewinnung und Umfang der Proben

Die Probengewinnung wurde entsprechend Punkt 3.3.1. durchgeführt.

Es wurden 100 Proben (56 Probiotika / 44 Kontrolle) zu 5 verschiedenen Zeitpunkten untersucht, siehe Abbildung 19:

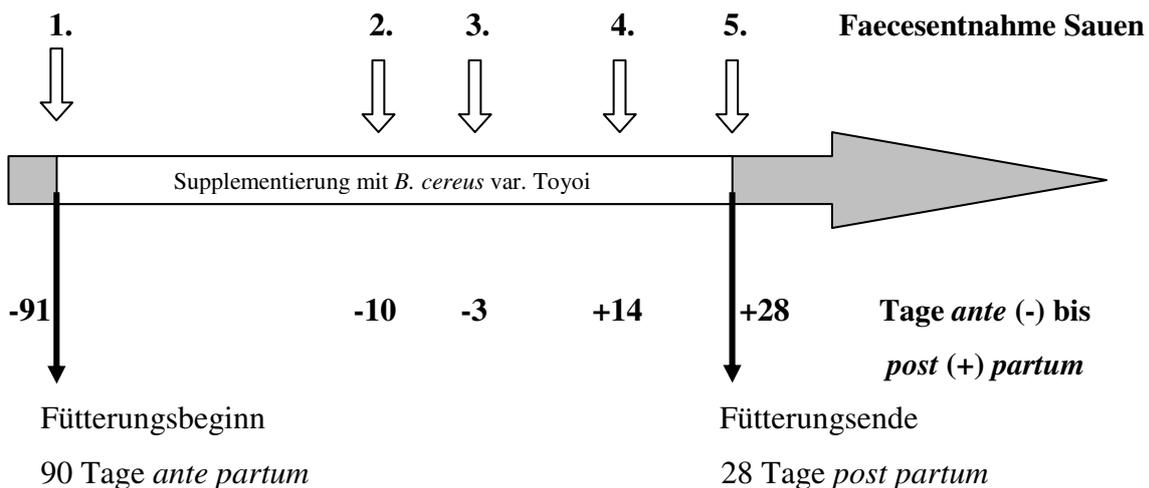


Abbildung 19: Zeitlicher Ablauf der Faecesentnahme Sauen, Versuch 2

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Gestations- bzw. Laktationszeitpunkt. Zudem ist der Fütterungszeitraum mit *B. cereus* var. Toyoi (Toyocerin®) hervorgehoben.

Im gleichen Versuch wurden 265 Faecesproben der Ferkel (132 Probiotika, 122 Kontrolle) untersucht, siehe Abbildung 20.

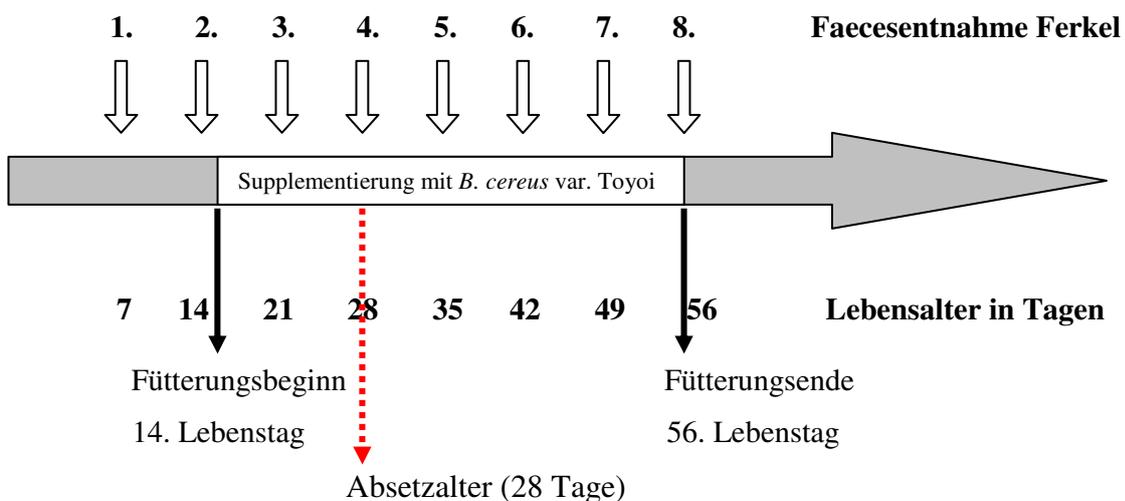


Abbildung 20: Zeitlicher Ablauf der Faecesentnahme Ferkel, Versuch 2

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Lebensalter in Tagen. Zudem sind der Absetz-Zeitpunkt und der Fütterungszeitraum mit *B. cereus* var. Toyoi (Toyocerin®) hervorgehoben.

4.3.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Der Versuchsaufbau wurde auch hier entsprechend Punkt 3.3.2. geplant und durchgeführt. Die 4 Verdünnungsstufen mit dem steilsten Kurvenverlauf in der sigmoidalen Kurve wurden für die Plattenbeschichtung verwendet. Begonnen wurde mit der Verdünnung $1 : 2^7$. Als Referenzlösung diente wiederum eine Mixtur aus 30 verschiedenen Proben.

4.3.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA entsprach Tabelle 13, siehe Punkt 2.3.3.

4.4. Bestimmung des Gesamt-IgA in der Molke

4.4.1. Gewinnung und Umfang der Proben

Um eine größere Anzahl von Milchproben und ein größeres Gemelk-Volumen zu gewinnen, wurden den Sauen 2 ml Oxytocin *i.m.* 10 min vor dem Entnehmen der Milch injiziert. Es konnten 64 Molkeproben (32 Probiotika / 32 Kontrolle) für die Durchführung des ELISA's gewonnen werden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten. Abbildung 21 veranschaulicht die Zeitpunkte der Milchentnahme. Die Aufbereitung der Milchproben entsprach Punkt 3.4.2..

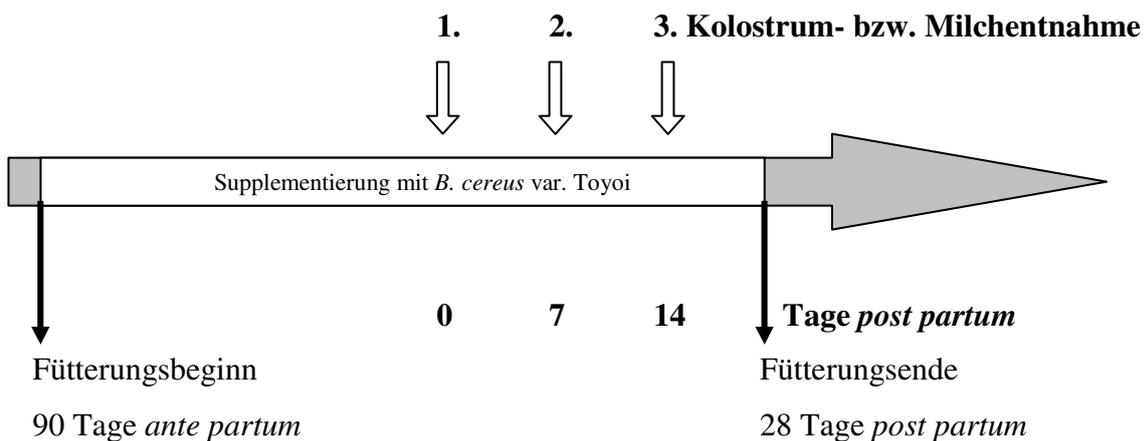


Abbildung 21: Zeitlicher Ablauf der Kolostrum- bzw. Milchprobenentnahme, Sauen, Versuch 2

Angegeben sind die Anzahl der Probenentnahmen mit dem dazugehörigen Laktationstag. Zudem ist der Fütterungszeitraum mit *B. cereus* var. Toyoi (Toyocerin®) hervorgehoben.

4.4.2. Versuchsaufbau und –optimierung

Der Versuch wurde wie in Punkt 3.4.2. beschrieben, durchgeführt.

4.4.3. Durchführung des Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA entsprach dem in Punkt 3.4.3. beschriebenen Protokoll, siehe Tabelle 14.

5. Versuch 3

Untersuchungen zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Shiga-Toxin-Variante 2e (Stx2e) bei *E.coli* (STEC) der Serogruppen O138:K81 und O141:K85ac im Serum ausgewählter Tiere aus Versuch 1

5.1. Tiermaterial und Umfang der Proben

Die für diesen Versuch ausgewählten Proben entstammen Serumproben aus Versuch 1 (*E. faecium*). Bei diesen Tieren wurden parallel in anderen Forschungsgruppen Virulenzmerkmale untersucht und die für die Klinik der Ödemkrankheit verantwortliche Shigatoxin-Variante 2e (Stx2e) von *E. coli* der Serogruppen O138:K81, O139:K82 und O141:K85ac gefunden. Die Tiere zeigten dabei keine klinischen Symptome.

Nur solche Tiere wurden ausgewählt, bei denen o.g. Virulenzfaktoren nachgewiesen wurden. Insgesamt wurden 83 Proben untersucht in der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Serumproben entstammten einer Sau der Probiotikagruppe (6 Proben zu 6 verschiedenen Zeitpunkten) und 77 Ferkelpuben von 4 Probiotikatieren und 10 Kontrolltieren. Die Proben wurden im tiefgefrorenen Zustand nach Gießen verbracht und dort erst zum Zweck der Untersuchung aufgetaut.

5.2. Versuchsaufbau und Durchführung des ELISA

Seren von Schweinen aus einem Betrieb, der mehr als 3 Jahre nachweislich frei von Ödemkrankheit war, wurden im Versuch als Kontrolle mitgeführt. Als Antigen diente eine rekombinant hergestellte und affinitätschromatographisch gereinigte B-Untereinheit des Stx2e. Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 15 dargestellt:

	Arbeitsschritt	$\mu\text{l}/\text{Well}$	Inkubation / Bemerkung
1	Beschichtung der MTP mit rHis-StB2e (400ng Antigen/well)	100	60 min bei 37°C in der feuchten Kammer / Coating
2	Waschen mit PBS-Tween 20 pH 7,2 3 x mittels ELISA-Washer	200	Schüttler bei 1.200 rpm / Waschen
3	Blockierung mit PBS-Tween	200	60 min bei 37°C in der feuchten Kammer / Absättigung
4	Waschen mit PBS-Tween 20 pH 7,2 3 x mittels ELISA-Washer	200	Schüttler bei 1.200 rpm / Waschen
5	Verdünnung der Serum-Proben: Kontroll- und Testserumproben mit PBS-Tween 1 : 100 (je ELISA-Platte 1 positive und 2 negative Serumproben), Auftrag im Dreifachansatz	100	90 min bei 37 °C in der feuchten Kammer / Probenauftrag
6	Waschen mit PBS + Tween 0,05 %, pH 7,42; 5x mittels ELISA-Washer	200	Schüttler bei 1.200 rpm / Waschen
7	Zugabe des Nachweis-AK: NAK-Ziege-anti-Schwein-IgG 1 : 6.000 in PBS-Tween	100	60 min bei 37 °C in der feuchten Kammer / Konjugation
8	Waschen mit PBS-Tween 20 pH 7,2 3 x mittels ELISA-Washer	200	Schüttler bei 1.200 rpm / Waschen
9	Färben mit ABTS-Gebrauchslösung: auftauen lassen und kurz vor Auftrag mit 0,5 μl H_2O_2 / ml mischen	100	20 min bei RT; Im Dunkeln / Substratauftrag
10	Bestimmung der OD mit dem Photometer bei einer Meßwellenlänge von 405 nm		Messung innerhalb von 20 bis 40 min nach Substratauftrag

Tabelle 15: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte des Sandwich-ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen Stx2e beim Schwein

Neben den durchgeführten Arbeitsschritten sind die aufgetragenen Mengen pro Kavität in $\mu\text{l}/\text{Well}$ und die Temperatur- und Zeitrahmen ersichtlich.

6.0 Statistische Darstellung und Auswertung

Um eine Übersicht über die Messwerte im Serum, in den Faeces und in der Molke zu erhalten, wurden Verlaufskurven von den probiotisch supplementierten Tieren und den Kontrolltieren je Messzeitpunkt erstellt. In diesen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen erfasst. Darunter (siehe Abb. 22 (A) bis 31 (A)) sind die Anzahl der Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten und die Anzahl („N“) der Tierproben angegeben. In den nachfolgend dargestellten Box-and-Whisker-plots wurden die ersten und dritten Quartile (25. bzw. 75. Perzentil) als Begrenzungen des jeweiligen Kastens wiedergegeben, während der Median als innere hervorgehobene Linie dargestellt ist. Mit dem Symbol „Kreis“ (°) wurden die laufenden Nummern der Ausreißer markiert, die mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb der Box lagen und mit dem Symbol „Stern“ (*) Extremwerte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box lagen.

Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen wurde zunächst der nichtparametrische (synonym: ohne Verteilungsannahme) Rangsummentest nach Mann-Whitney (U-Test) bzw. bei Vorliegen von normal-verteilten Daten der ungepaarte *t*-Test angewendet.

Bei allen Tests wurde die Nullhypothese: „die beiden Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit, d.h. der Mittelwertunterschied ist rein zufällig zustande gekommen“, überprüft. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese: „die beiden Mittelwerte entstammen verschiedenen Grundgesamtheiten; d.h. die Versuchsgruppen unterscheiden sich signifikant“ angenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant oder * und $p \leq 0,01$ als sehr signifikant oder ** angegeben.

Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde die univariate Varianzanalyse (ANOVA, F-Test) angewendet. Mittels des F-Testes kann überprüft werden, ob ein Faktor einen signifikanten Beitrag zur Erklärung der abhängigen Variable leistet. Bei einem Faktor mit mehr als zwei Faktorstufen wurde ein nachgelagerter Post-hoc-Test angewandt, um zu überprüfen, welche Faktorstufen sich paarweise unterscheiden. (HARTUNG, 1991, INGERSOLL, 1995). Die Ergebnisse wurden unter Anwendung der Programme Excel 2000[®] (Fa- Microsoft Corporation) und SPSS 12.0[®] (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) dargestellt und ausgewertet.