

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Histologische und immunhistochemische Untersuchungen
tertiärer lymphatischer Gewebe in der Lunge des Schweines**

von Almuth Falkenau

aus Hansestadt Stendal

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und
Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

(Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines)

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Für meine Familie und Martin

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Lymphatische Organe und Gewebe.....	3
1.1.	Zellen und Aufgaben lymphatischer Organe und Gewebe	3
1.2.	Einteilung lymphatischer Organe und Gewebe.....	4
2.	Das Immunsystem der Schleimhäute	5
2.1.	Induktions-Kompartiment und Effektor-Kompartiment	5
2.1.1.	Aufbau des Induktions- und Effektor-Kompartimentes.....	5
2.1.2.	Vorkommen von Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT) .7	
2.1.2.1.	Konstitutives und induzierbares MALT	8
2.1.2.1.1.	Spezies-spezifische Anbildung und Struktur des BALT.....	8
3.	Die Lunge des Schweines	10
3.1.	Anatomie der Bronchialsysteme, Lappung und Gefäße.....	10
3.1.1.	Histologie der Bronchien und Bronchiolen.....	11
3.2.	Spezifische Abwehr im Bronchialsystem des Schweines	12
3.2.1.	Anbildung des BALT beim Schwein	12
3.2.1.1.	Enzootische Pneumonie (EP).....	13
3.2.1.1.1.	Klinik infizierter Tiere	13
3.2.1.1.2.	Pathologisch-anatomische Befunde der Lunge	14
3.2.1.1.3.	Pathohistologische Befunde der Lunge.....	14
3.2.1.1.4.	Pathogenese der hochgradigen Anbildung des BALT bei Enzootischer Pneumonie.....	15
3.2.2.	Allgemeine Beschreibungen des BALT des Schweines	16
3.2.2.1.	Follikel	17
3.2.2.2.	BALT-bedeckendes Epithel	17
3.2.2.3.	BALT-assoziierte Gefäße.....	18
3.2.3.	Untersuchte Zellpopulationen im BALT des Schweines	18
3.2.3.1.	Lymphatische Zellen im BALT	18
3.2.3.1.1.	T-Lymphozyten und ihre Untergruppen	18
3.2.3.1.2.	B-Lymphozyten und Plasmazellen.....	19
3.2.3.2.	Antigen-präsentierende Zellen (APC).....	20
3.2.3.2.1.	Follikuläre dendritische Zellen (FDC)	20

3.2.3.2.2.	Dendritische Zellen (DC).....	20
3.2.3.2.3.	Makrophagen	21
III.	MATERIAL UND METHODEN	23
1.	Untersuchungsmaterial	23
1.1.	Material für die Untersuchung tertiärer lymphatischer Gewebe	23
1.1.1.	Lokalisationen der Probennahme am Schlachthof.....	24
1.2.	Material für immunhistochemische Voruntersuchungen.....	24
1.3.	Material für Voruntersuchungen an Lungen.....	24
2.	Methoden	25
2.1.	Vorbereitung und Fixation der Gewebe für die Lichtmikroskopie.....	25
2.1.1.	Gewebe vom Schlachthof	25
2.2.	Gewebe für immunhistochemische Voruntersuchungen	25
2.3.	Gewebe von Lungen für Voruntersuchungen	25
2.4.	Paraffineinbettung und Anfertigung der Schnitte	26
2.5.	Übersichtsfärbungen an Paraffinschnitten	26
2.5.1.	Protokoll für die Hämalaun-Eosin-Färbung	27
2.5.2.	Protokoll für die Färbung nach Giemsa	27
2.6.	Kunststoffeinbettung und Anfertigung der Schnitte	28
2.7.	Färbungen an Kunststoffschnitten	29
2.7.1.	Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung	29
2.7.2.	Protokoll für die Färbung nach Giemsa	29
2.7.3.	Protokoll für die PAS-Reaktion.....	30
2.7.4.	Protokoll für die Versilberung nach AVALLONE.....	30
2.8.	Immunhistochemie.....	31
2.8.1.	Antikörper.....	31
2.8.2.	Voruntersuchungen an Testgewebe	32
2.8.3.	Protokoll für die Immunhistochemie	32
2.9.	Durchführung der Untersuchungen	36
2.9.1.	Untersuchung von Anbildungsgraden des BALT.....	36
2.9.2.	Untersuchungen zur Morphologie tertiärer lymphatischer Gewebe.....	36
IV.	ERGEBNISSE	37
1.	Makroskopische und histologische Voruntersuchungen.....	37
1.1.	Ergebnisse der Voruntersuchungen	37

2.	Untersuchung von Ausbildungsgraden des BALT	41
2.1.	Definition von BALT-Ausbildungsgraden	41
2.2.	Häufigkeit der Ausbildungsgrade	42
2.3.	Vergleich der BALT-Ausbildungsgrade in den Lokalisationen 1 bis 4	43
2.4.	Lokalisationen höhergradiger BALT-Anbildung.....	44
3.	Histologie lymphatischer Gewebe in Lungen mit Enzootischer Pneumonie.....	46
3.1.	Histologie des Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT)	46
3.1.1.	Lymphoepithel	48
3.1.1.1.	Epitheliale Komponente des Lymphoepithels.....	48
3.1.1.2.	Lymphozytäre Komponente des Lymphoepithels.....	54
3.1.2.	Follikel-assoziierte Lamina propria	58
3.1.3.	Follikel	63
3.1.4.	T-Zellareal.....	71
3.1.5.	Ausprägung der Komponenten des BALT des Schweines in den verschiedenen BALT-Ausbildungsgraden.....	76
3.2.	Histologie des Ektopischen lymphatischen Gewebes (ELG).....	78
V.	DISKUSSION	85
1.	Versuch der makroskopischen Identifikation von BALT	85
2.	Untersuchung von Ausbildungsgraden des BALT des Schweines	87
2.1.	Interpretation der bakteriologischen Ergebnisse	87
2.2.	Zur Definition von BALT-Ausbildungsgraden	89
2.2.1.	Interpretation der Ergebnisse der BALT-Ausbildungsgrade	90
3.	Untersuchungen zur Morphologie tertiärer lymphatischer Gewebe in Lungen von Schweinen	91
3.1.	Interpretation der Ergebnisse der Morphologie des BALT.....	92
3.2.	Interpretation der Ergebnisse der Morphologie und Verteilung des ELG	96
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	99
VII.	SUMMARY.....	101
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	103

IX.	ANHANG.....	115
1.	Befunddokumentation	115
2.	Geräte.....	120
3.	Fixationsmedien	122
3.1.	Formaldehyd, 4%ig, neutral gepuffert nach Lillie.....	122
3.2.	Paraformaldehyd, 4%ig	122
4.	Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte	122
4.1.	70%iges Ethanol	122
4.2.	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	123
4.2.1.	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	123
4.2.2.	0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung	123
4.2.3.	1%ige Eosin-Lösung.....	123
4.3.	Färbung nach Giemsa	123
4.3.1.	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung.....	123
4.3.2.	0,5%ige Essigsäure	123
5.	Lösungen für die Kunststoffeinbettung	124
5.1.	Spüllösung	124
5.2.	Einbettungsmedien.....	124
6.	Lösungen für die Färbung der Kunststoffschritte	124
6.1.	Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung	124
6.1.1.	1%ige HCl-Ethanol-Lösung	124
6.1.2.	Stammlösung Eosin	125
6.1.3.	Stammlösung Phloxin.....	125
6.1.4.	Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung	125
6.2.	Färbung nach Giemsa	125
6.2.1.	7%ige Giemsa-Gebrauchslösung.....	125
6.2.2.	0,5%ige Essigsäure	125
6.3.	PAS-Reaktion	126
6.3.1.	1%ige Perjodsäure	126
6.4.	Modifizierte Versilberung nach AVALLONE	126
6.4.1.	1%ige Perjodsäure	126
6.4.2.	5%ige Silbernitrat-Stammlösung.....	126
6.4.3.	3%ige Methenamin-Lösung.....	126

6.4.4.	0.05M Borax-Lösung	126
6.4.5.	Silbermethenamin-Gebrauchslösung	127
6.4.6.	1%ige Goldchlorid-Stammlösung	127
6.4.7.	0,1%ige Goldchlorid-Gebrauchslösung	127
6.4.8.	2 %iges Natriumthiosulfat.....	127
7.	Lösungen für die Immunhistochemie	127
7.1.	1%ige Wasserstoffperoxidlösung.....	127
7.2.	0,05 M Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7,6	127
7.3.	Tris/EDTA-Puffer pH 9,0	128
7.4.	10 mM Citratpuffer pH 6,0	128
7.5.	H ₂ O ₂ -DAB-Gebrauchslösung.....	128
X.	TABELLENVERZEICHNIS	129
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	131
XII.	DANKSAGUNG	139

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BALT	Bronchiolus-assoziiertes lymphatisches Gewebe
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELG	Ektopisches lymphatisches Gewebe
EP	Enzootische Pneumonie
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
ggf.	gegebenenfalls
GMA	Methacrylsäure-2-hydroxyethylester
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämalaun-Eosin Färbung
HEV	hochendothelisierte Venole
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Mh	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
MMA	Methacrylsäuremethylester
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pSp-D	porcine-surfactant-protein-D
SIgA	sekretorisches Immunglobulin A
SPF	spezifisch-pathogenfrei
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline)

I. EINLEITUNG

Die weltweit verbreitete Enzootische Pneumonie des Schweines stellt nach wie vor ein bedeutendes Problem in der Schweinemast dar, nicht zuletzt aufgrund erheblicher ökonomischer Verluste. Der Primärerreger der Enzootischen Pneumonie ist schon seit 1965 bekannt: *Mycoplasma hyopneumoniae*. Hauptcharakteristika einer Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae* sind die immunpathologischen Lungenveränderungen, die sowohl bei experimentellen als auch natürlichen Infektionen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* zumeist mit einer hochgradigen Anbildung des sogenannten Bronchus- und Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) verbunden sind (KWON et al., 2002; SARRADELL et al., 2003; THACKER, 2006; SIBILA et al., 2009). Seit der Erstbeschreibung des BALT wird dessen Funktion und Einordnung im Immunsystem der Schleimhäute bei vielen Spezies diskutiert, vor allem weil das BALT häufig erst im Rahmen von Lungenerkrankungen angebildet wird und dann ein tertiäres lymphatisches Gewebe darstellt. Das BALT kann im Gegensatz zu anderen Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben in seiner histologischen Struktur sehr variabel sein. Interessant ist die Frage nach der Funktion des BALT auch in Bezug auf einen potentiellen Einsatz von Inhalationsvakzinen (BIENENSTOCK et al., 1973a, 1973b; PABST & TSCHERNIG, 2010). Voraussetzung für eine lokale oder auch weiterführende Funktion des BALT im Abwehrsystem der Schleimhäute des Schweines ist das Vorkommen typischer Komponenten wie sie schon für anderes Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe wie z.B. die PEYERschen Platten des Darmes beschrieben worden sind. Bisher ist zur Morphologie des BALT oder allgemein des tertiären lymphatischen Gewebes in der Lunge des Schweines nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das tertiäre lymphatische Gewebe in der Lunge des Schweines in seinem Aufbau zu charakterisieren, weiterhin aber auch hinsichtlich seines Verteilungsmusters innerhalb der Lunge zu untersuchen. Für ein möglichst breites Anbildungsspektrum werden Lungen von konventionell gehaltenen Mastschweinen unterschiedlicher Herkunft mit mikroskopischen Läsionen, wie sie für eine Enzootische Pneumonie typisch sind, herangezogen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Lymphatische Organe und Gewebe

Lymphatische Organe sind ein wesentlicher Bestandteil in der Errungenschaft des adaptiven Immunsystems von Vertebraten (BOEHM et al., 2012).

Ansammlungen von Lymphozyten finden sich im Gesamtorganismus in morphologisch und funktionell unterschiedlich strukturierten Gewebeverbänden. Zu den lymphatischen Organen gehören Thymus, Knochenmark, Tonsillen, Milz, Lymphknoten und die PEYERschen Platten. Zusätzlich bestehen lymphatische Gewebe aus lockeren, nicht eingekapselten, allerdings follikelartigen, begrenzten Ansammlungen von Lymphozyten unter anderem im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) (GRÖNE et al., 2007).

1.1. Zellen und Aufgaben lymphatischer Organe und Gewebe

Sowohl das angeborene (unspezifische) als auch das adaptive (spezifische) Abwehrsystem ist abhängig von Leukozyten, die von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle abstammen. Diese Zelle kommt postnatal überwiegend im Knochenmark vor. Die meisten Leukozyten, die sich an der angeborenen Abwehr beteiligen, entstammen der myeloischen Reihe der Hämatopoese, hierzu gehören Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen. Natürliche Killerzellen entstammen zwar der lymphatischen Reihe, werden jedoch auch der adaptiven Abwehr (Immunantwort) zugerechnet. Den Schlüssel zur adaptiven Abwehr stellt dagegen die lymphatische Reihe der Hämatopoese im Knochenmark mit Bildung von lymphatischen Vorläuferzellen dar. Die Vorläuferzellen werden im Rahmen einer antigenunabhängigen Reifung und Prägung in dafür speziell zuständigen lymphatischen Organen mit Oberflächenrezeptoren ausgestattet, die sie später, wenn auch nicht ohne das Zusammenspiel mit Zellen des angeborenen Abwehrsystems, zur adaptiven Immunantwort befähigen. Nach einer Prüfung auf Autoimmunität durch negative Selektion wandern die noch naiven B- und T-Lymphozyten in die Peripherie des Organismus aus, wo sie sich zum Teil zu organisierten Aggregaten in einem Netzwerk nichtlymphatischer stromaler Zellen zu lymphatischen Geweben und Organen formieren. Durch Schaffung einer solchen Mikroumwelt, ob im hoch

strukturierten lymphatischen Organ oder weniger strukturierten lymphatischen Gewebe, kann Antigen, das von Orten einer Infektion stammt, gesammelt werden. Anschließend wird es gezielt einer großen Zahl von naiven Lymphozyten präsentiert, welche permanent im Körper rezirkulieren. Die ständige Bereithaltung naiver Lymphozyten wird dadurch gewährleistet, dass sie kontinuierlich aus der Peripherie in die lymphatischen Organe rezirkulieren. Die Antigenpräsentation erfolgt mithilfe von ebenfalls im Organ oder Gewebe ansässigen dendritischen Zellen oder Makrophagen. Die adaptive Immunantwort ist folgend durch Proliferation und Differenzierung naiver Lymphozyten zu Effektorzellen in den peripheren lymphatischen Organen und Geweben induziert (MURPHY, 2012).

1.2. Einteilung lymphatischer Organe und Gewebe

Auf Basis ihrer Funktion in der Bereitstellung von B- und T-Lymphozyten bishin zur eigentlichen Initiierung der adaptiven Immunantwort werden lymphatische Organe und Gewebe in zentrale und in periphere lymphatische Organe und Gewebe unterteilt. In den zentralen oder auch sogenannten primären lymphatischen Organen erfahren die B- und T- Lymphozytenvorläuferzellen ihre antigenunabhängige Prägung. B-Lymphozyten werden im Knochenmark oder im bursaäquivalenten Organ (Säugetier) sowie in der Bursa fabricii (Vogel) geprägt, T-Lymphozyten im Thymus. Die peripheren lymphatischen Organe und Gewebe sind dagegen an der Induktion der adaptiven Immunantwort beteiligt (MURPHY, 2012). Die peripheren lymphatischen Organe und Gewebe können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die einen sind bei der Geburt schon vorhanden, das sind die sekundären lymphatischen Organe. Dazu gehören Milz, Lymphknoten und das konstitutive Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT). Letztere werden durch die Tonsillen und die PEYERsche Platte des Darmes repräsentiert (RANDALL et al., 2008). In jüngster Zeit erfahren die sogenannten tertiären lymphatischen Organe vermehrt Aufmerksamkeit. Sie bilden sich erst nach der Geburt an. Sie unterliegen einer sogenannten lymphatischen Neogenese ohne vorprogrammierte Entwicklung. Diese Neogenese findet erst im Rahmen von z.B. persistierender Infektion, chronischer Entzündung oder autoimmuner Reaktion statt. In die Gruppe der tertiären lymphatischen Gewebe wird das induzierte Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT), im Speziellen das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALM) einiger Spezies gezählt. Weiterhin aber auch sogenannte ektopische lymphatische Gewebe (CARRAGHER et al., 2008;

PABST & TSCHERNIG, 2010).

Da lymphatische Organe speziesabhängig unterschiedlich ausgeprägt sein können und andererseits im Rahmen einer adaptiven Immunantwort eine enorme funktionelle Plastizität und Dynamik zeigen, ist ihre strikte Eingruppierung in primäre, sekundäre und tertiäre lymphatische Organe und Gewebe nicht prinzipiell durchführbar oder einheitlich auf alle Spezies anwendbar (PABST, 2007).

2. Das Immunsystem der Schleimhäute

Die Schleimhautepithelien im gesamten Organismus, vor allem die des Verdauungstraktes, Atmungstraktes und Genitaltraktes bieten eine große Angriffsfläche für die Kolonisation und Invasion vieler verschiedener Mikroorganismen. Es ist daher kaum verwunderlich, dass die Schleimhautgewebe unter dem Schleimhautepithel mit Zellen des Immunsystems infiltriert sind und sich in bestimmten Schleimhautlokalisationen zu organisierten lymphatischen Geweben zusammen finden. Ob organisierte lymphatische Aggregation oder einfache Ansammlung von Immunzellen in einer Schleimhaut: beide sind essentielle Bestandteile des Schleimhaut- oder Mukosa-assoziierten Immunsystems (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 1992).

2.1. Induktions-Kompartiment und Effektor-Kompartiment

Das Mukosa-assoziierte Immunsystem kann prinzipiell in ein Induktions-Kompartiment und ein Effektor-Kompartiment unterteilt werden (Abb. 1). Im Induktions-Kompartiment, dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (engl. mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) wird Antigen über die Schleimhaut aufgenommen und naiven T- und B-Lymphozyten präsentiert. Während im Effektor-Kompartiment Effektorzellen z.B. durch die Bildung von sekretorischem Immunglobulin A (SIgA) mitwirken (BIENENSTOCK & BEFUS, 1984; BRANDTZAEG & PABST, 2004).

2.1.1. Aufbau des Induktions- und Effektor-Kompartimentes

Das Induktions-Kompartiment, das aus dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) besteht, ist prinzipiell aus organisierten Funktionseinheiten zusammengesetzt, die denen der Lymphknoten ähneln: es finden sich T-Zellareale in der Nachbarschaft follikulärer B-Zellareale und Antigen-präsentierende Zellen

(APC) wie die Dendritischen Zellen (DC) und Follikuläre dendritische Zellen (FDC). Im deutlichen Gegensatz zu einem Lymphknoten jedoch, erfolgt die Antigenzufuhr im MALT nicht über afferente Lymphgefäße, sondern über die Schleimhautoberfläche (BRANDTZAEG & PABST, 2004). Für die Beschreibung des Aufbaus eines klassischen MALT wird häufig die in der Darmwand gelegene PEYERsche Platte (PP) aufgrund ihres gut definierten Aufbaus verwendet: Die PP besteht aus lymphatischen Follikeln, die unter der *Lamina muscularis mucosae* liegen. Zentral in den Follikeln kann eine aktive Lymphozytopoese beobachtet werden als typisches Anzeichen von Sekundärfollikeln. Im Randbereich der Follikel finden sich vorwiegend kleine reife B-Lymphozyten, welche die sogenannte Corona formen. Die Follikel formen die oberhalb von ihnen liegenden Strukturen der Schleimhaut zu einer kuppelförmigen Gestalt, die sogenannte Dome-Region. Die Dome-Region setzt sich überwiegend aus T- und B-Lymphozyten zusammen, aber auch Plasmazellen und Makrophagen können hier vorkommen. Interfollikulär kommen vorwiegend T-Lymphozyten vor und bilden ein unregelmäßig geformtes T-Zellareal (PABST, 1987). Das interfollikuläre Areal oder T-Zellareal enthält spezielle postkapilläre Venolen. Diese Venolen weisen charakteristische, ins Gefäßlumen ragende Endothelzellen auf. Lymphozyten können durch diese Endothelzellen hindurchtreten oder sie interzellulär passieren und gelangen so in die PP (YAMAGUCHI & SCHOEFL, 1983). Das Schleimhautepithel des MALT stellt ein spezialisiertes Epithel dar, das sogenannte Follikel-assoziierte Epithel (FAE) (BOCKMAN & COOPER, 1973). Das FAE ist durch epitheliale Modifikation und hochgradige Lymphozyteninfiltration gekennzeichnet und wird deshalb auch als Lymphoepithel bezeichnet (BIENENSTOCK et al., 1973a; BIENENSTOCK & JOHNSTON, 1976; RACZ et al., 1977). Das FAE der PP enthält spezielle Epithelzellen, die sogenannten Membran- oder M-Zellen (engl. microfold-cells), die aktiv lösliche Bestandteile oder Partikel aus dem Lumen durch das Epithel transportieren können (OWEN, 1977). Inwieweit jedoch M-Zellen im FAE der anderen, vor allem nicht den Darm betreffenden MALT-Lokalisationen des Schleimhaut-Immunsystems vorkommen, ist nicht vollständig geklärt (GEBERT & PABST, 1999).

Das Effektor-Kompartiment des Schleimhaut-Immunsystems besteht aus völlig anderen histologischen Komponenten als das MALT. Es setzt sich zusammen aus der *Lamina propria* (LP) der verschiedenen Schleimhäute, dem Stroma exokriner

Drüsen und dem Schleimhautepithel selbst. Darin finden sich eine Vielzahl der Effektorzellen sowie auch lokal vorkommende Zellen des Immunsystems (Abb. 1).

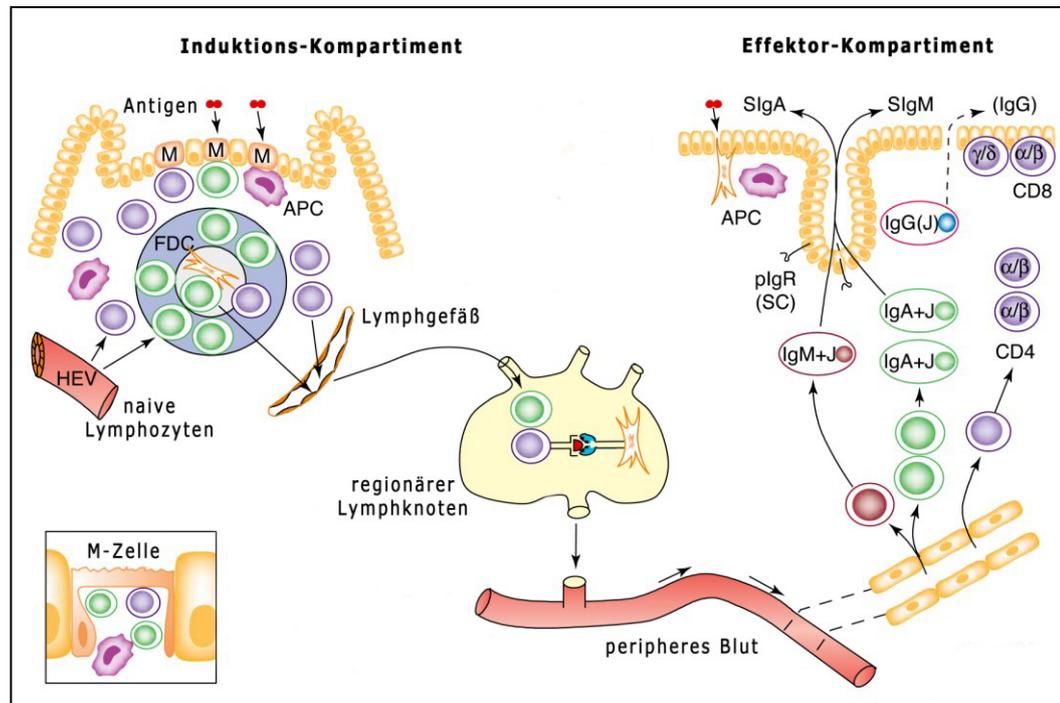


Abb. 1: Schematische Darstellung eines humanen Schleimhaut-Immunsystems: Das Induktions-Kompartiment für T- und B-Lymphozyten wird durch das MALT verschiedener Schleimhautlokalisationen präsentiert (links in der Abb.). Über die M-Zellen (M) im Follikel-assoziierten Epithel erfolgt ein aktiver Transport von exogenen Antigenen zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC): den Dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, B-Zellen und Follikulären dendritischen Zellen (FDC). Naive T- und B-Lymphozyten gelangen über hochendothelisierte Venolen (HEV) in das MALT. Nachdem sie im Rahmen der Antigenpräsentation zu T- und B-Gedächtniszellen geprägt wurden, wandern sie aus dem MALT über das Lymphgefäßsystem ins periphere Blut. Die Gedächtniszellen gelangen mittels Extravasation, die durch spezielle Endothelzelloberflächenprofile gesteuert wird, in das Effektor-Kompartiment des Schleimhaut-Immunsystems (hier am Beispiel der Darmschleimhaut rechts in der Abb.). Als sogenannte Effektorzellen agieren aus der Gruppe der T-Gedächtniszellen die T-Helfer-Zellen (CD4) und zytotoxischen T-Zellen (CD8) und aus der Gruppe der B-Gedächtniszellen die Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen (IgM, IgA und IgG). Außerdem werden SIgA und SIgM produziert, die selektiv über den sogenannten Polymer-Ig-Rezeptor (sekretorische Komponente) (pIgR/SC) durch das Epithel auf die Lumenseite transportiert werden können. Modifiziert nach BRANDTZAEG & PABST (2004).

2.1.2. Vorkommen von Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT)

Die Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) sind strategisch dort lokalisiert, wo sie effizient mit Antigenen in Kontakt treten können. Nach ihrer

anatomischen Lokalisation tragen sie unterschiedliche Namen: Am besten ist das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. gut-associated lymphoid tissue, GALT) bekannt, welches sich hauptsächlich aus den PEYERschen Platten (PP) und den dort ebenfalls vorkommenden isolierten lymphatischen Follikeln (ILF) zusammensetzt. Im Gastrointestinaltrakt ist daneben ein Magen-assoziiertes lymphatisches Gewebe bekannt (gastrisches MALT). Im Respirationstrakt ist das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALM) lokalisiert, im oberen Teil des Traktes auch das Larynx-assoziierte lymphatische Gewebe (LALM). Der Kopfbereich ist durch vielfältige Schleimhautvorkommen mit zahlreichen MALT-Strukturen ausgestattet: Im Bereich der Augen findet sich das Tränenabfluss-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. lacrimal drainage-associated lymphoid tissue, LDALM) und das Konjunktiva-assoziierte lymphatische Gewebe (CALM). In der Ohrtrumpete liegt das Eustachische Röhre-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. eustachian tube-associated lymphoid tissue, TALM). Die Speicheldrüsen und die Ausführungsgänge können ebenfalls ein Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe beherbergen (engl. salivary gland- or duct-associated lymphoid tissue, SALM/DALM). In der Nasenschleimhaut ist das NALM lokalisiert, das teils paarig in der Nase, teils als isolierte lymphatische Follikel (ILF) vorkommen kann. Die Tonsille als Teil des WALDEYERschen Rachenring ist ebenfalls den MALT-Geweben zugehörig und wird aufgrund ihrer Lage im Nasenrachenraum häufig zum NALM gerechnet (BRANDTZAEG & PABST, 2004; LIEBLER-TENORIO & PABST, 2006; BRANDTZAEG et al., 2008).

2.1.2.1. Konstitutives und induzierbares MALT

Die verschiedenen MALT-Gewebe werden wie schon in Kapitel II.1.2. erwähnt, teils den sekundären, teils auch den tertiären lymphatischen Organen bzw. Geweben zugeordnet. Einerseits entsteht ein MALT wie die PEYERsche Platte und die Tonsille pränatal, ist also bei der Geburt bereits vorhanden (konstitutives MALT), andererseits wird es erst unter bestimmten pathologischen Prozessen erworben (induzierbares MALT) wie das BALM einiger Spezies (PABST & GEHRKE, 1990; BRANDTZAEG & PABST, 2004).

2.1.2.1.1. Spezies-spezifische Anbildung und Struktur des BALM

Die Existenz von organisierten lymphatischen Geweben im Atmungstrakt ist seit

geraumer Zeit bekannt. Erste Beschreibungen führen zurück ins 19. Jahrhundert. KLEIN (1873) beschrieb beim Meerschwein im Zusammenhang mit Tuberkulose das Auftreten von sehr markanten, teils sphärischen Zell-Akkumulationen in der Wand von peribronchial verlaufenden Lymphgefäßen, die zwischen dem Zweig der Pulmonalarterie und dem Bronchus liegen. Die klassische Beschreibung und Bezeichnung des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) kann jedoch auf BIENENSTOCK UND MITARBEITER (1973a, 1973b) zurückgeführt werden. Als BALT bezeichnen sie lymphatische Follikel in der Bronchialmukosa. Die Follikel sind einerseits mit einem Lymphoepithel bedeckt und andererseits grenzen sie an ein pulmonalarteriell Blutgefäß. BIENENSTOCK UND MITARBEITER (1973a, 1973b) sahen in den in der Bronchialmukosa gelegenen lymphatischen Aggregaten eine Ähnlichkeit zu den PEYERschen Platten (PP) des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) und sprachen ihnen deshalb eine Rolle in der immunologischen Abwehr zu. Ebenfalls betonten sie, dass das BALT nicht nur bei einer chronischen Entzündung zu beobachten ist.

Die Präsenz oder Abwesenheit, Größe und histologische Struktur des BALT weisen unter den Spezies einschließlich dem Menschen wesentliche Differenzen auf (PABST & GEHRKE, 1990). Bei Untersuchungen des BALT von Labornagern fällt auf, dass sich das BALT von Kaninchen und Ratten im Gegensatz zum BALT anderer Spezies unabhängig von einer mikrobiellen Stimulation entwickeln kann (SMINIA et al., 1989; PABST & GEHRKE, 1990). Das BALT des Kaninchens zeigt dabei histologisch eine deutliche Ausbildung eines T- und B-Zellareals im Gegensatz zu anderen Spezies mit gesunden Lungen (Ratte, Maus und Meerschwein) (BIENENSTOCK et al., 1973a, 1973b; BIENENSTOCK & JOHNSTON, 1976; RACZ et al., 1977). Das BALT von größeren Hausäugetieren wie Rind, Ziege und Schwein ist sowohl in der Anbildung als auch in der Organisation seiner Struktur von mikrobieller Stimulation abhängig: So ist das BALT von Rind, Ziege und Schwein zumeist hochgradig angebildet im Rahmen von Lungenerkrankungen unter Beteiligung von Mykoplasmen (RODRIGUEZ et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2001; SARRADELL et al., 2003; HERMEYER et al., 2012).

3. Die Lunge des Schweines

3.1. Anatomie der Bronchialsysteme, Lappung und Gefäße

In den paarigen Lungen des Schweines liegen beiderseits im Lungenparenchym die luftleitenden Atemwege, die ein weit verzweigtes, sogenanntes Bronchialsystem bilden. Es geht jeweils eines vom linken und rechten Hauptbronchus ab, und ein zusätzliches vom Tracheobronchus, welcher kranial des rechten Hauptbronchus aus der Trachea hervorgeht (TALANTI, 1959; NEURAND et al., 1970; NAKAKUKI, 1994). Die arterielle nutritive Gefäßversorgung der Lunge erfolgt durch ein bis vier Bronchialarterien (LORENTZIADIS et al., 2005). Die Verzweigungen der Pulmonalarterie des funktionellen Lungenkreislaufsystems entsprechen intrapulmonal den Verzweigungen der Bronchialsysteme, wobei die Gefäße dorsal oder lateral jedes Bronchialzweigs verlaufen. Die Pulmonalvenen verlaufen ventral und medial entlang der Bronchialzweige (NAKAKUKI, 1994; MAINA & VAN GILS, 2001).

Die verschiedenen Parenchymklappen der Lunge, welche sich aus der Verzweigung des Bronchialsystems ergeben, sind in den verschiedenen Studien des Bronchialbaumes des Schweines (siehe oben) uneinheitlich benannt worden. In der vorliegenden Arbeit entsprechen die Termini der Lappen der Schweinelunge der NOMINA ANATOMICA VETERINARIA (2012): Die linke Lunge besteht aus dem vorderen *Lobus cranialis*, der sich in eine *Pars cranialis* und *Pars caudalis* gliedert, und dem hinteren *Lobus caudalis*. Die rechte Lunge besteht aus dem vorderen *Lobus cranialis*, dem mittleren *Lobus medius*, dem hinteren *Lobus caudalis* und einem zum Herz gerichteten ventralen *Lobus accessorius* (NICKEL, 1999).

Die Lymphgefäße der Lungen verlaufen in den Bindegewebszügen, die die Lappen und Läppchen des Lungenparenchyms voneinander trennen und verlaufen oberflächlich (subpleural) und in der Tiefe. Die tiefen Lymphgefäße begleiten die großen Bronchien und die entsprechenden Äste der *Arteria pulmonalis*. Die Lymphgefäße verbinden sich zu serösen und subserösen Netzen und stehen in sehr großer Ausdehnung, fast über einen ganzen Lappen hinweg, miteinander in Verbindung. Sowohl oberflächliche als auch tiefe Lymphgefäße beider Lungen verlaufen hauptsächlich zu den Lungenlymphknoten und die oberflächlichen teilweise auch zu den Mediastinallymphknoten. Der durch die Brusthöhle

ziehende *Ductus thoracicus* stellt für die Mehrzahl der Brusthöhlenlymphknoten den Sammelstamm dar (BAUM, 1938).

3.1.1. Histologie der Bronchien und Bronchiolen

Das gesamte Bronchialsystem zeigt histologisch den gleichen Grundaufbau von innen nach außen: die den Atemweg auskleidende Schleimhaut, eine Muskelschicht und die außen angrenzende Bindegewebsschicht. Es lassen sich im Verlauf des Bronchialbaumes jedoch die größeren knorpeltragenden Bronchien von den darauffolgenden kleineren knorpelfreien Bronchioli unterscheiden (MÜLLER, 1906). Die Bronchien weisen außer dem Knorpel als deutliches Unterscheidungskriterium zum Bronchiolus auch submukosal gelegene Bronchialdrüsen auf (MÜLLER, 1906; BASKERVILLE et al., 1978).

Neben einer Abnahme der Wandschichtdicke der luftleitenden Wege Richtung Bronchioli ist auch eine Veränderung des Schleimhautepithels zu beobachten. Während es sich beim Bronchus noch um ein mehrschichtiges Flimmerepithel handelt, wandelt es sich im Bronchiolus in ein einschichtiges Epithel um, das mit Abnahme des Lumendurchmessers schließlich in ein unbeflimmertes, einschichtiges Epithel übergeht (MÜLLER, 1906).

Die auf die Bronchien folgenden Bronchiolustypen *Bronchiolus*, *Bronchiolus terminalis* und *Bronchiolus respiratorius* zeigen lichtmikroskopisch alle den gleichen Aufbau, von innen nach außen bestehend aus Epithel, glatter Muskulatur und Bindegewebe. Der proximaler gelegene *Bronchiolus* hat ein einschichtiges hochprismatisches Flimmerepithel, das Longitudinalfalten bildet. Seine Muskelschicht hat eine Dicke von etwa 4 Zelllagen und eine moderate Menge an Bindegewebe. Der weiter distal gelegene *Bronchiolus* ist dagegen nur leicht in Falten gelegt. Er hat nur noch eine Muskelschicht von zwei Zelllagen und sehr wenig Bindegewebe. Der *Bronchiolus terminalis* weist ein einschichtiges, weniger hochals isoprismatisches Epithel auf, das nur noch anfänglich Zilien (Flimmerepithel) aufweist. Die Muskelschicht besteht nur noch aus einer Zelllage. Der *Bronchiolus respiratorius* hat ein einschichtiges isoprismatisches unbeflimmertes Epithel, das schließlich flach in den *Ductus alveolaris* übergeht, an den sich die Pneumozyten Typ I und II des Alveolarepithels anschließen. Das Epithel der Bronchioli setzt sich aus zwei Hauptzelltypen zusammen. Der eine trägt die Zilien, der andere, der den Clara-Zellen entspricht, nicht. Die Clara-Zellen sind ab dem *Bronchiolus*

terminalis zahlreich vertreten. Daneben sind im Epithel auch die seltener auftretenden Becherzellen und Bürstenzellen im *Bronchiolus* zu beobachten (BASKERVILLE, 1970).

3.2. Spezifische Abwehr im Bronchialsystem des Schweines

Die spezifische Abwehr (Immunantwort) (siehe Kapitel II.1.1.) findet nicht nur in den sogenannten lymphatischen Organen, wie z.B. Lymphknoten und Milz, sondern auch in nicht-lymphatischen Organen wie der Lunge statt. In der Lunge lassen sich bei Betrachtung der Verteilung der Lymphozyten hauptsächlich ein intravaskulärer, ein interstitieller und ein die Bronchialschleimhaut betreffender Pool unterscheiden (PABST, 1996). In der Schleimhaut sind von einfachen Ansammlungen von Lymphozyten organisierte Aggregate von Lymphozyten, das (Bronchus-/) Bronchiolus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT), abzugrenzen (PABST & BINNS, 1994).

3.2.1. Anbildung des BALT beim Schwein

In Untersuchungen von 5 Tage alten, konventionell aufgezogenen Tieren und 2 Monate alten spezifisch-pathogenfreien Schweinen konnte kein BALT gefunden werden. Bei Tieren, die 2 Monate und älter waren, jedoch konventioneller Herkunft, ließ sich BALT bei einem Drittel aller Schweine nachweisen. Das BALT des Schweines ist wie auch bei anderen Spezies nicht grundsätzlich vorhanden, sondern ist induzierbar oder fakultativ (PABST & GEHRKE, 1990) und entwickelt sich erst bei mikrobieller Stimulation im Respirationstrakt (JERICHO, 1970; PABST & GEHRKE, 1990). Das BALT ist nach DELVENTHAL UND MITARBEITERN (1992) in seiner Ausprägung durch mehrfache mikrobielle Stimulation manipulierbar. Eine mikrobielle Induktion des Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes ist in verschiedenen Studien experimentell mit den Erregern *Actinobacillus pleuropneumoniae*, hämolytischen Streptokokken der Serogruppe L und dem porzinen Adenovirus erreicht worden (JERICHO et al., 1971; DELVENTHAL et al., 1992; PABST, 1996).

Nach experimentellen und natürlichen Infektionen mit *Mycoplasma hyopneumoniae* werden in histopathologischen Untersuchungen der Lunge zumeist hochgradige Anbildungen des BALT beobachtet (LIVINGSTON et al., 1972; MAES et al., 1996; KWON et al., 2002; SARRADELL et al., 2003). Dazu ist die hochgradige BALT-Anbildung mehr ausgeprägt in den Lungen, in denen

ein hoher Gehalt an *Mycoplasma hyopneumoniae* an den Atemwegsoberflächen nachgewiesen werden konnte (LORENZO et al., 2006).

BLANCHARD UND MITARBEITER (1992), MAES UND MITARBEITER (1996) sowie CASWELL UND MITARBEITER (2007) bezeichnen die hochgradige Anbildung des BALT als eine typische Veränderung der Infektion mit *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3.2.1.1. Enzootische Pneumonie (EP)

Mycoplasma hyopneumoniae (Mh) ist der Primärerreger der Enzootischen Pneumonie des Schweines, welche eine der wichtigsten chronischen Erkrankungen in industriellen Schweinehaltungen darstellt (KOBISCH et al., 1993) und weltweit verbreitet ist (THACKER, 2006).

Mh gehört der Gattung *Mycoplasma* aus der Familie der *Mycoplasmataceae* und der Ordnung der *Mycoplasmatales* an, die wiederum der Klasse *Mollicutes* (lat. mollis: weich, cutis: Haut) zugeordnet ist (RAZIN et al., 1998). Diese Zuordnung ist auf das Fehlen einer Zellwand zurückzuführen. Mykoplasmen sind bei Mensch, Säugetier, Reptilien, Fischen, Arthropoden und Pflanzen weit verbreitet und zeigen eine obligat parasitäre oder saprophytäre Lebensweise mit hoher Wirts- und Gewebespezifität (RAZIN, 1992).

Mh führt beim Schwein nach Eintritt in den Respirationstrakt und Anhaftung an das respiratorische Epithel zu einem progressiven Verlust der Zilien, Exfoliation der Epithelzellen und Ansammlung von Entzündungszellen in und um die Atemwegslumina herum (BLANCHARD et al., 1992). Ziliostase und Zilienverlust haben den Verlust der mukoziliären Clearance zur Folge (DEBEY & ROSS, 1994).

Es kommt anschließend meist zu einer Besiedlung tieferer Anteile des Atmungstraktes mit weiteren Bakterien wie *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* oder *Actinobacillus pleuropneumoniae* und damit zur Komplikation der Pneumonie (THACKER, 2006).

3.2.1.1.1. Klinik infizierter Tiere

Es lassen sich in der Empfänglichkeit für eine Infektion mit Mh keine Altersunterschiede feststellen (PIFFER & ROSS, 1984).

In experimentellen Monoinfektionen von spezifisch-pathogenfreien (SPF) Tieren oder natürlichen Infektionen mit Mh ist die Symptomatik durch einen subklinischen Verlauf oder mit geringgradigen Symptomen mit meist trockenem unproduktiven Husten, geringgradigem Fieber und milder Anorexie charakterisiert (KOBISCH et al., 1993; MAES et al., 1996). Bei Komplikation infolge von Sekundärinfektionen ist die Symptomatik charakterisiert durch produktiven Husten, hohes Fieber, Anorexie, abdominale, erschwerte Atmung und Schwäche. Die Enzootische Pneumonie ist durch Chronizität bei hoher Morbidität und geringer Mortalität gekennzeichnet (MAES et al., 1996). Ebenso sind mit der EP verminderte Gewichtszunahmen und daraus resultierende verminderte Schlachtgewichte verbunden (MORRIS et al., 1995).

3.2.1.1.2. Pathologisch-anatomische Befunde der Lunge

Frühe Läsionen werden bei experimentellen Infektionen folgendermaßen beschrieben: Sie zeigen sich als wenige, kleine, dunkelrote Areale in den ventralen Anteilen der Lunge, im akzessorischen Lappen sowie vorderen Anteilen der Hauptlappen. Allmählich konsolidieren und konfluieren die Läsionen in den kranioventralen Anteilen der Lunge bis zur vollständigen Konsolidierung eines oder mehrerer Lappen (BASKERVILLE, 1972). Die Läsionen sind vor allem in den Spitzen-, dem Mittel- sowie akzessorischem Lappen lokalisiert und weniger in den kranioventralen Anteilen der Hauptlappen (LIVINGSTON et al., 1972). Oft ist in den Atemwegen ein katarrhalisches Exsudat zu finden (THACKER, 2006). Die bronchialen und mediastinalen Lymphknoten sind vergrößert (BASKERVILLE, 1972).

3.2.1.1.3. Pathohistologische Befunde der Lunge

In der Literatur ist nicht immer eine deutliche Trennung der primär durch *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) verursachten Läsion und der bakteriellen Sekundärinfektion zu erkennen. BASKERVILLE (1972) beschreibt den anfänglichen Verlauf der Lungenläsionen in der pathohistologischen Untersuchung folgendermaßen: in den kleinen Atemwegen und Alveolen sind zunächst Gruppen von polymorphkernigen Zellen zu erkennen, die bald gemeinsam mit großen mononukleären Zellen zusammen vorkommen. Es bilden sich daraufhin um Atemwege und Blutgefäße lymphatische Gewebe an. Im weiteren Verlauf werden die Alveolarsepten von Lymphozyten, Plasmazellen und

Makrophagen infiltriert. Des Weiteren zeigen sich eine Hyperplasie der Pneumozyten vom Typ II und die Ansammlung von Ödemflüssigkeit in den Alveolen. In jüngerer Literatur wird im pathohistologischen Bild besonders die hochgradige Anbildung des BALT hervorgehoben (KWON et al., 2002; SARRADELL et al., 2003).

3.2.1.1.4. Pathogenese der hochgradigen Anbildung des BALT bei Enzootischer Pneumonie

Mycoplasma hyopneumoniae (Mh) haftet sich laut experimenteller Studien nach Eintritt in den Respirationstrakt an das respiratorische Epithel der Trachea, Bronchien und Bronchioli. Mh sitzt zunächst auf den Zilien (BLANCHARD et al., 1992), später auch im interziliären Raum oder hat Kontakt mit den Mikrovilli (JACQUES et al., 1992). Antigene oder RNA/DNA von Mh konnten im BALT mittels immunhistochemischer Methoden nicht detektiert werden (SARRADELL et al., 2003), ebenfalls nicht mittels in situ-Hybridisierung (KWON et al., 2002).

Bei experimenteller Infektion mit einem hoch- oder weniger virulenten Mh-Stamm zeigt sich im Vergleich der Versuchsgruppen, dass die höchste Zelldichte von immunhistochemisch dargestellten Makrophagen, B- und T-Lymphozyten im BALT stets bei Infektion mit dem hochvirulenten Mh-Stamm zu beobachten ist. Unabhängig des Mh-Stammes sind höhergradige Lungenveränderungen mit höheren Zahlen an Mh-Organismen in der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) und einer höheren Dichte von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten im BALT assoziiert (VRANCKX et al., 2012). Mittels immunhistochemischer Darstellung ist ebenfalls mehr Mh-Antigen an den Atemwegsoberflächen zu beobachten, deren BALT höhergradiger angebildet ist (4 bis 5 Wochen post infectionem, experimentell, intranasal) (LORENZO et al., 2006).

Wahrscheinlich stimuliert der Erreger bei Besiedelung des respiratorischen Epithels durch seine antigenen Oberflächenproteine eine Immunantwort (CHAMBAUD et al., 1999). Die Oberflächenproteine gehören durch das Fehlen einer Zellwand zu den ersten Zielen der immunologischen Abwehr des Wirtes (SCHMIDT et al., 2004). Mh induziert in den Lungen bzw. in den dort vorkommenden Immunzellen die Produktion einer Vielzahl an immunregulatorischen Eiweißen, sogenannten proinflammatorischen Zytokinen. Dabei

werden vor allem Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) produziert, die eine essentielle Rolle als Mediatoren in der Entwicklung der Lungenläsionen zu spielen scheinen (ASAI et al., 1993; ASAI et al., 1994). RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004) fanden mittels immunhistochemischer Untersuchungen im hochgradig angebildeten BALT natürlich infizierter Tiere gegenüber Kontrolltieren eine signifikant höhere Expression von IL-1 (α und β), IL-2, IL-4, IL-6 und TNF- α . Sie sehen diese Zytokine, mit der spezifischen Rolle von IL-2, IL-4, IL-6 in der Aktivierung von lymphatischen Zellen (MURTAUGH & FOSS, 2002), als wichtige Mitverursacher der hochgradigen BALT-Anbildung bei Enzootischer Pneumonie. Gleiche immunhistochemische Zytokin-Expressionsstudien mit Erweiterung um IL-12 und Interferon γ (IFN- γ) führten LORENZO UND MITARBEITER (2006), RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2007) sowie REDONDO UND MITARBEITER (2009) in Lungen experimentell infizierter Tiere durch. Sie beobachteten mit der Expression der proinflammatorischen und immunmodulierenden Zytokine ebenso eine Zunahme des BALT.

CHOI UND MITARBEITER (2006) nehmen an, dass die Pathogenese der EP-typischen Läsionen mit hochgradiger BALT-Anbildung letztlich nicht allein auf die direkte Wirkung von Mh zurückzuführen ist, sondern ebenso auf eine lokale Überproduktion von Zytokinen der Zellen der Wirtsabwehr.

3.2.2. Allgemeine Beschreibungen des BALT des Schweines

LIU & CHU (1984) beschreiben, dass das BALT des Schweines in makroskopisch unveränderten Lungen von 8–10 Wochen alten Tieren morphologische Ähnlichkeiten mit dem von Kaninchen, Ratten, Hühnern sowie dem GALT aufweist. Das BALT wird von ihnen als eine in das Bronchiallumen vorgewölbte Dome-Struktur eines lymphatischen Follikel charakterisiert. Die Dome-Strukturen ließen sich vor allem in den jüngeren Tieren (Alter: 8 Wochen) schwerlich finden, weshalb LIU & CHU (1984) sich äußern, dass die Anbildung des BALT womöglich mit einer Immunreaktion zusammenhängt.

HUANG UND MITARBEITER (1990) beschreiben, dass das BALT konventionell aufgezogener Tiere im Alter von 11 bis 13 Wochen in der Regel aus einem Follikel innerhalb der Mukosa besteht und als knotige oder kuppelförmige Erscheinung in die Luftwege ragt. Der lymphatische Follikel ist das

Hauptelement des BALT und reicht von der Submukosa bis zur Basalmembran des Schleimhautepithels, mit der das BALT direkten Kontakt hat. Oft zeigt sich eine nahe gelegene Arteriole.

In 5% von zunächst mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* immunisierten und anschließend reinfizierten Tieren zeigt sich das BALT auch in einer Zusammensetzung aus zwei bis drei follikelähnlichen Strukturen. Die 4 Monate alten Tiere stammten von einer spezifisch pathogenfreien Schweinehaltung (DELVENTHAL et al., 1992).

SARRADELL UND MITARBEITER (2003), RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004), LORENZO UND MITARBEITER (2006) sowie REDONDO UND MITARBEITER (2009) beschreiben das BALT in ihren sowohl experimentellen als auch natürlichen Mh-Infektionsstudien als Anbildung mit überwiegend mehr als einem Follikel.

3.2.2.1. Follikel

LIU & CHU (1984) beschreiben, dass in dem Follikel mit Dome-Struktur Lymphozyten vorherrschen. Daneben sind auch wenige Makrophagen, Retikulumzellen und gelegentlich pyknotische und mitotische Zellen zu beobachten. Die von ihnen untersuchten Follikel des BALT enthielten kein Keimzentrum. Es waren kaum Plasmazellen im BALT zu erkennen.

HUANG UND MITARBEITER (1990) beobachten, dass die einzeln auftretenden lymphatischen Follikel hauptsächlich aus Lymphozyten und wenigen retikulohistiozytären Zellen (Makrophagen) zusammengesetzt sind. Letztere weisen gewöhnlich phagozytiertes, nekrotisches Material im Zytoplasma auf.

SARRADELL UND MITARBEITER (2003) beschreiben in den Follikeln Keimzentren, in denen Makrophagen und B-Lymphozyten die Hauptzellen darstellen.

3.2.2.2. BALT-bedeckendes Epithel

LIU & CHU (1984), HUANG UND MITARBEITER (1990) sowie SOERENSEN UND MITARBEITER (2005) charakterisieren das über dem BALT liegende Epithel als ein spezialisiertes Epithel. Es ist gekennzeichnet durch fehlende Becherzellen und Zilien. Weiterhin weist es intraepithelial vorkommende Lymphozyten auf. LIU & CHU (1984) verwenden für dieses spezialisierte Epithel die Bezeichnung Lymphoepithel.

SOERENSEN UND MITARBEITER (2005) vermuten im Epithel über dem BALZellen, die möglicherweise mit M-Zellen der intestinal gelegenen PEYERschen Platte verwandt sind: es sind im Epithel Panzytokeratin-negative Zellbereiche zu erkennen, in denen sich zahlreiche Lymphozyten aufhalten.

HUANG UND MITARBEITER (1990) können diese Beobachtung bei den von ihnen untersuchten Schweinen nicht machen, räumen aber ein, dass die flachen Epithelzellen über den Follikeln in ihrer Studie Vorläuferzellen der M-Zellen sein könnten.

3.2.2.3. BALZ-assoziierte Gefäße

DELVENTHAL UND MITARBEITER (1992) beschreiben in ihrer experimentellen *Actinobacillus pleuropneumoniae*-Studie einen dem BALZ benachbarten endothelausgekleideten Spaltraum, der Lymphozyten enthält und vermutlich ein efferentes Lymphgefäß darstellt. Sie beobachten außerdem ein häufiges Auftreten von hochendothelisierten Venolen in den lymphatischen Aggregaten.

3.2.3. Untersuchte Zellpopulationen im BALZ des Schweines

3.2.3.1. Lymphatische Zellen im BALZ

In Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der BALZ-Anbildung durch experimentelle Infektion mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* können immunhistochemisch keine definitiven Formationen von T- und B-Zellarealen festgestellt werden (DELVENTHAL et al., 1992). Das BALZ von natürlich mit *Mycoplasma hyopneumoniae*-infizierten Schweinen weist dagegen eine hohe morphologische und zelluläre Organisation auf (SARRADELL et al., 2003).

3.2.3.1.1. T-Lymphozyten und ihre Untergruppen

Nach experimenteller Stimulation mit *Actinobacillus pleuropneumoniae* untersuchten DELVENTHAL UND MITARBEITER (1992) in 43 BALZ-Querschnitten immunhistochemisch verschiedene Verteilungsmuster der T-Lymphozyten. In 60% der Fälle zeigte sich eine diffuse Verteilung der T-Lymphozyten im BALZ. In 30% der Fälle wiesen sie mehr T-Lymphozyten in der Peripherie des BALZ nach und in 10% waren die T-Lymphozyten mehr basal als nahe der Bronchialmukosa lokalisierbar. Die untersuchten BALZ-Gewebe wiesen dabei zu 95% nur einen Follikel auf.

Mithilfe immunhistochemischer Differenzierung von CD3-, CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten beschreiben SARRADELL UND MITARBEITER (2003) und RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004) in Mh-Infektionsstudien die vorherrschenden Lokalisationen von Subpopulationen der T-Lymphozyten. Im hochgradig angebildeten BALT mit mehreren Follikeln um die Bronchioli können SARRADELL UND MITARBEITER (2003) bei natürlicher Infektion, die sich makroskopisch, mikroskopisch (inklusive Immunhistochemie) und bakteriologisch bestätigte, die überwiegende Zahl an CD3-positiven T-Lymphozyten in parafollikulären Bereichen, in der *Lamina propria* und im Epithel des BALT beobachten. Beim Vergleich von CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten waren die CD4-positiven T-Lymphozyten häufiger vertreten. CD4-positiv T-Lymphozyten wurden eher in parafollikulären Bereichen geortet, die CD8-positiven T-Lymphozyten verteilten sich innerhalb der Follikel und zwischen Zellen des Bronchial- und Bronchiolarepithels (SARRADELL et al., 2003).

RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004) beschreiben bei natürlicher Mh-Infektion, welche diagnostisch wie in der vorausgegangenen Studie von SARRADELL UND MITARBEITERN (2003) bestätigt wurde, die BALT-Peripherie als Hauptlokalisierung der IL-1 α -produzierenden Lymphozyten. Bei länger anhaltender Infektion zeigen die T-Lymphozyten eine Dominanz der CD4-positiven T-Lymphozyten und eine Verringerung der CD8-positiven T-Lymphozyten.

3.2.3.1.2. B-Lymphozyten und Plasmazellen

In den Keimzentren stellen neben den Makrophagen B-Lymphozyten die zellulären Hauptkomponenten dar. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen porcines Immunglobulin G (IgG) können moderate Zahlen an IgG-positiven Plasmazellen und B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Sie zeigen sich vorrangig in den Keimzentren des BALT und in der *Lamina propria* der Bronchien und Bronchiolen. Ebenso zeigt der immunhistochemische Einsatz von polyklonalen Antikörpern gegen das porcine IgA moderate Zahlen an IgA-positiven Plasmazellen und B-Lymphozyten im Keimzentrum des BALT, weiterhin in der Submukosa der Bronchien und Bronchioli (SARRADELL et al., 2003). Die Zahl der Immunglobulin-produzierenden Zellen wird gegenüber Kontrolltieren als signifikant erhöht beschrieben, weshalb in natürlich und

experimentell Mh-infizierten Schweinen die Bildung einer adäquaten humoralen Immunantwort im BALT angenommen wird (SARRADELL et al., 2003; REDONDO et al., 2009).

3.2.3.2. Antigen-präsentierende Zellen (APC)

Zu den professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) im organisierten Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) gehören die Dendritischen Zellen (DC) des T-Zellareales und die Follikulären dendritischen Zellen im B-Zellareal bzw. Follikel. Des Weiteren können nach entsprechender Aktivierung und Differenzierung auch Makrophagen und B-Lymphozyten als hoch effiziente Antigen-präsentierende Zellen (APC) wirken (MURTAUGH & FOSS, 2002; BRANDTZAEG & PABST, 2004). Neben den oben schon beschriebenen B-Lymphozyten im BALT des Schweines sollen im Folgenden noch die bisherigen Untersuchungen anderer APC im BALT des Schweines dargestellt werden.

3.2.3.2.1. Follikuläre dendritische Zellen (FDC)

Ultrastrukturelle Untersuchungen beschreiben das Vorkommen von dendritischen Zellen, deren typische zytoplasmatische Ausläufer zwischen den in Keimzentren vorkommenden Lymphozyten beobachtet werden konnten. Diese Zellen wiesen einen unregelmäßigen Kern und kondensiertes Chromatin auf, welches in einer schmalen Zone der inneren Kernmembran lag (SARRADELL et al., 2003). In einer Zytokinexpressions-Untersuchung von RODRIGUEZ UND MITARBEITERN (2004) konnten bei der immunhistochemischen Untersuchung von Interleukin 4 in den meisten follikulären Zentren positive Zellen mit langen, zytoplasmatischen Prozessen nachgewiesen werden. Ob es im BALT des Schweines letztlich wirklich Follikuläre dendritische Zellen gibt, welche wie im Lymphknoten eine Rolle in der Prägung von B-Gedächtniszellen spielen, ist ungewiss (SOERENSEN et al., 2005).

3.2.3.2.2. Dendritische Zellen (DC)

Mittels immunhistochemischer Darstellung des Proteins S-100 konnte die Expression des Proteins in zahlreichen sternförmigen Zellen mit langen zytoplasmatischen Prozessen im BALT nachgewiesen werden. In der Untersuchung von Schweine-Leukozyten-Antigen II (SLA-II) wurden ebenfalls positive Reaktionen von Zellen mit irregulärer Morphologie und langen zytoplasmatischen Ausläufern beobachtet. Sie kamen einerseits in der *Lamina propria* von

Bronchien und Bronchiolen vor. Andererseits ist die Immunreaktivität besonders in parafollikulären Bereichen des BALT zu beobachten. Diese Erkenntnisse sind mit der gleichzeitigen Beobachtung einer hohen strukturellen Organisation des BALT vereinbar, da die Dendritischen Zellen (DC) die Antigen-präsentation gegenüber CD4-positiven T-Lymphozyten gewährleisten (SARRADELL et al., 2003).

SOERENSEN UND MITARBEITER (2005) untersuchten Lungeninfektionen verschiedener Ätiologie mit Fokus auf Veränderungen der Expression des porcine-surfactant-protein-D (pSp-D) und die Lokalisation der Dendritischen Zellen (DC) im BALT. In Lungengewebe mit erhöhter Expression des pSp-D konnte dieses Protein intrazellulär in sternförmigen Zellen mit langen zytoplasmatischen Fortsätzen gefunden werden. Diese Zellen waren im BALT sowohl peripher, unter dem Epithel als auch zentral nachweisbar. pSp-D positive sternförmige Zellen wurden ausschließlich in Schleimhaut-assoziiertem Gewebe in Verbindung mit Bronchioli gefunden.

3.2.3.2.3. Makrophagen

Makrophagen stellen bei der Enzootischen Pneumonie in erster Linie die vorherrschende Komponente unter den phagozytierenden Zellen dar (SARRADELL et al., 2003).

Makrophagen sind häufig im lymphatischen Gewebe mit reichhaltig phagozytiertem Material zu sehen (DELVENTHAL et al., 1992). REDONDO UND MITARBEITER (2009) beschreiben im BALT eine intensive Immunreaktivität von Alveolarmakrophagen mit Anti-Muramidase-Antikörpern. SARRADELL UND MITARBEITER (2003) stellen mit der gleichen immunhistochemischen Untersuchung moderate Zahlen von Makrophagen dar. Vorrangig werden sie in den parafollikulären Bereichen des BALT und vereinzelt im Keimzentrum nachgewiesen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungsmaterial

1.1. Material für die Untersuchung tertiärer lymphatischer Gewebe

Das Material für die Untersuchung von tertiärem lymphatischem Gewebe in der Lunge des Schweines setzte sich aus Lungengeweben von 47 Mastschweinen zusammen. Die Lungengewebe wurden in einer Kooperation mit der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen.

Die Mastschweine stammten aus 9 konventionellen Haltungsbetrieben, welche vorberichtlich Bestandsprobleme mit *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektionen aufwiesen. Voraussetzung für die Vorauswahl der Mastschweine aus den genannten Betrieben waren klinische Anzeichen einer akuten respiratorischen Erkrankung mit Verdacht auf Enzootische Pneumonie. Die ausgewählten Mastschweine wurden im Haltungsbetrieb gekennzeichnet und verblieben dort bis zum Schlachtzeitpunkt. Am Schlachthof wurden die Tiere entsprechend ihrer Kennzeichnung identifiziert und ihre Lungen makroskopisch am Schlachtband untersucht. Im Falle des Vorliegens einer EP-verdächtigen Pneumonie wurde die Lunge für die histologische Probennahme ausgewählt.

Aufgrund der auf Klinik und Makroskopie basierenden Auswahl der Lungen durch die Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München und die anschließende histologische Bestätigung EP-typischer Läsionen im Institut für Tierpathologie war eine für das vorliegende Untersuchungsvorhaben erforderliche BALT-Anbildung in unterschiedlichem Ausmaß sichergestellt. Es ließ sich in einigen der EP-typischen Lungen auch noch ein weiteres tertiäres lymphatisches Gewebe ohne Bezug zum Bronchiolus feststellen. Es handelte sich um ein sogenanntes Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG), das in die sich anschließenden histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen mit einbezogen wurde.

Die Probengewinnung an den Mastschweinelungen erfolgte im Zeitraum September 2010 bis April 2011.

1.1.1. Lokalisationen der Probennahme am Schlachthof

Die Probennahme an den Mastschweinelungen mit Verdacht auf EP umfasste je Lunge vier festgelegte Lokalisationen. Nach Entnahme des Geschlinges am Schlachtband wurden jeweils *Lobus cranialis sinister*, *Lobus medius*, *Lobus caudalis sinister*, und *Lobus caudalis dexter* beprobt (Abb. 2).

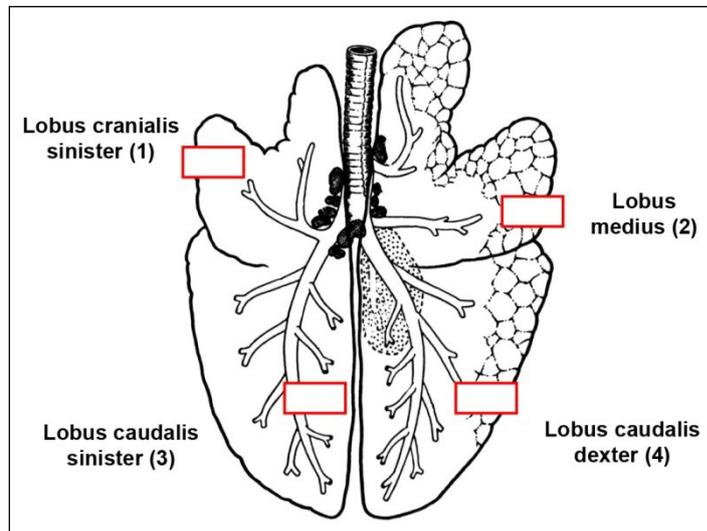


Abb. 2: Die Lokalisationen für die Entnahme von Lungengewebe am Schlachthof: *Lobus cranialis sinister* (1), *Lobus medius* (2), *Lobus caudalis sinister* (3) und *Lobus caudalis dexter* (4). Schweinelunge in Dorsalansicht, modifiziert nach NICKEL UND MITARBEITERN (1999).

Die wie oben beschrieben am Schlachthof gewonnenen Lungenproben wurden direkt in Gefäße mit 4%igem neutral gepuffertem Formaldehyd (Anhang IX.3.1.) überführt, deren Beschriftung durch Angabe von *Betrieb.Tier.Lungenlokalisierung* (z.B. *1.1.1*, *1.1.2*, *1.1.3*, *1.1.4*) den eindeutigen Rückschluss auf die Herkunft und Lokalisation des Lungengewebes zulässt.

1.2. Material für immunhistochemische Voruntersuchungen

Im Rahmen von Voruntersuchungen sollte die Differenzierung von T- und B-Lymphozyten in lymphatischen Geweben mittels Immunhistochemie zunächst an Testgeweben durchgeführt werden. Als solche wurden Milzen und Lymphknoten von Schweinen aus dem Obduktionsmaterial im Jahr 2012 des Institutes für Tierpathologie der LMU München verwendet.

1.3. Material für Voruntersuchungen an Lungen

Für makroskopische und histologische Voruntersuchungen standen Lungen von Schweinen aus dem Obduktionsmaterial im Jahr 2012 des Institutes für

Tierpathologie der LMU München zur Verfügung.

2. Methoden

Die nachfolgend aufgeführten Geräte und Lösungen finden sich entsprechend ihres Verweises (z.B. IX.2.) im Anhang ab Seite 120. Die Verbrauchsmaterialien sind direkt mit Herstellerangaben benannt.

2.1. Vorbereitung und Fixation der Gewebe für die Lichtmikroskopie

2.1.1. Gewebe vom Schlachthof

Nach der Probengewinnung an den Mastschweinelungen am Schlachthof fand die Weiterverarbeitung im Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Die Fixation wurde hier 24 Stunden auf einem Taumler¹ (Anhang IX.2.) fortgeführt. Jede der Lungenproben wurde anschließend beim Zuschnitt geteilt und in Uni-Link-Einbettkassetten (R. Langenbrinck, Emmendingen, Nr. 09-0503) eingelegt. Eine Hälfte wurde für Übersichtsfärbungen und Immunhistochemie für die Paraffineinbettung verwendet, die andere Hälfte für die Kunststoffeinbettung.

2.2. Gewebe für immunhistochemische Voruntersuchungen

Milz- und Lymphknotengewebe von Schweinen aus dem Obduktionsmaterial des Institutes für Tierpathologie LMU München im Jahr 2012 dienten als Testgewebe für die immunhistochemische Darstellung lymphatischer Zellen. Beide Gewebe wurden nach der Entnahme sofort in 4%iges Paraformaldehyd (Anhang IX.3.1.) überführt und auf einem Taumler² (Anhang IX.2.) im Kühlschrank³ (Anhang IX.2.) bei 4°C mit einer Dauer von 24 Stunden fixiert. Die Testgewebe gelangten nach Zuschnitt in die Paraffineinbettung.

2.3. Gewebe von Lungen für Voruntersuchungen

Lungen von Schweinen, die für die Übersichtsdarstellung von Bronchioli aus Obduktionsmaterial des Institutes für Tierpathologie LMU München entnommen worden sind, wurden unmittelbar nach der Sektion mittels einer Schneidemaschine⁴ (Anhang IX.2) in transversaler Schnittführung durch die Hauptlappen in 1cm dicke Scheiben geschnitten. Die Lungenscheiben wurden anschließend mit Kanülen an einer mit saugfähigem Textil bedeckten Styroporplatte fixiert. Daraufhin wurde die Styroporplatte mit dem Textil und

Gewebe nach unten auf 4%iges Paraformalaldehyd (Anhang IX.3.1.) aufgelegt. Mittels Deckelschluss des mit Paraformaldehyd gefüllten Gefäßes und damit erreichter Styroporplattenabsenkung konnte das vollständige Eintauchen der Lungenscheiben in das Fixationsmedium gewährleistet werden. Die Fixation erfolgte auf einem Taumler² (Anhang IX.2.) im Kühlschrank³ (Anhang IX.2.) bei 4°C mit einer Dauer von 24-48 Stunden. An den Scheiben wurden nach der Fixation makroskopisch Regionen mit unterschiedlichen Atemwegsdurchmessern ausgewählt, zugeschnitten und in die Kunststoffeinbettung gegeben.

2.4. Paraffineinbettung und Anfertigung der Schnitte

Die für die Paraffineinbettung bestimmten Gewebe wurden vor der Überführung in Paraffin (Sherwood Medical, St. Louis, USA) in einem Entwässerungsautomaten⁵ (Anhang IX.2.) wie folgt behandelt:

- 1) Spülung in Aqua dest., 30 Minuten
- 2) Ethanol 70%, 2 x 90 Minuten
- 3) Ethanol 96%, 2 x 90 Minuten
- 4) Ethanol 100%, 2 x 90 Minuten
- 5) Xylol, 2 x 30 Minuten
- 6) Xylol, 90 Minuten

In zwei weiteren Durchgängen von 2 und 3 Stunden Dauer wurden die Gewebe im selben Automaten paraffiniert und anschließend mithilfe eines Paraffin-Einbettungssystems⁶ (Anhang IX.2.) zu Blöcken ausgegossen.

Die Anfertigung der Schnitte erfolgte an einem Rotationsmikrotom⁷ (Anhang IX.2.). Die Schnitt dickeneinstellung betrug 4-5 µm. Die Schnitte wurden auf einem Streckbad⁸ (Anhang IX.2.) gestreckt, auf beschichtete Objektträger (Starfrost, Engelbrecht, Edermünde, Nr. 11250) aufgezogen und für 24 Stunden bei 40°C in einem Trockenschrank⁹ (Anhang IX.2.) gelagert.

2.5. Übersichtsfärbungen an Paraffinschnitten

Als Übersichtsfärbungen wurden die Hämalaun-Eosin-Färbung und Färbung nach Giemsa durchgeführt. Vor den jeweiligen Färbungen (siehe III.2.5.1 und III.2.5.2) wurden die Schnitte mit einer Dauer von 15 Minuten in Xylol (SAV-Liquid

Production, Flintsbach a. Inn) entparaffiniert. Es folgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit Ethanol 100%, 96%, 70% (Anhang IX.4.1.) und anschließendem Spülen in Aqua dest.

2.5.1. Protokoll für die Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Schnitte

- in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249) einstellen, 5 Minuten
- bläuen in warmem, fließendem Leitungswasser, 5 Minuten
- ggf. bei Überfärbung in 0,5%iger HCl-Ethanol-Lösung (Anhang IX.4.2.2.) differenzieren
- warm wässern, 5 Minuten
- 2-7fach in 1%ige Eosin-Lösung (Anhang IX.4.2.3.) eintauchen
- in Aqua dest. spülen
- in aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol 70%, 96% und 100% dehydrieren
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

2.5.2. Protokoll für die Färbung nach Giemsa

Die Schnitte

- in 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang IX.4.3.1.) einstellen, 60 Minuten im Wasserbad¹⁰ (Anhang IX.2.) bei 65°C
- in Aqua dest. spülen
- in 0,5%iger Essigsäure (Anhang IX.4.3.2.) differenzieren, bis zum Farbumschlag von blau nach rot
- in aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol 96% und 100% dehydrieren
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

2.6. Kunststoffeinbettung und Anfertigung der Schnitte

Die für die Kunststoffeinbettung bestimmten Gewebe wurden nach oben angegebener Fixationsdauer drei Stunden in Spüllösung (Anhang IX.5.1.) gewaschen und in einem Entwässerungsautomaten¹¹ (Anhang IX.2.) wie folgt behandelt:

- 1) Ethanol 30%, 2 x 60 Minuten
- 2) Ethanol 50%, 2 x 60 Minuten
- 3) Ethanol 70%, 2 x 120 Minuten
- 4) Ethanol 96%, 2 x 120 Minuten
- 5) Ethanol 96%, 2 x 180 Minuten

Im Anschluss wurden die Gewebe in Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (GMA, Fluka-Nr. 64170) und Methacrylsäuremethylester (MMA, Fluka-Nr. 64200) mit einem Verhältnis der Acrylsäureester von 1:1 gegeben. Es folgte eine 24 stündige Inkubation auf einem Taumler² (Anhang IX.2.) im Kühlschrank³ (Anhang IX.2.) bei 4°C.

Nach dem Befüllen von Polyethylen-Behältern mit einem Einbettungsmedium A (Anhang IX.5.2.) wurden die Gewebe einzeln pro Behälter hinzugegeben. Lungengewebe wurden zusätzlich mit einem Kieselstein von ca. 1 cm Durchmesser beschwert, um ihr Aufschwimmen im Einbettungsmedium A zu verhindern. Anschließend erfolgte für alle Gewebe im Einbettungsmedium A eine mindestens 4-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Polymerisation wurde in den luftdicht verschließbaren Polyethylen-Behältern durch Herstellung des endgültigen Einbettungsgemisches B (Anhang IX.5.2.) durch Zugabe von 60 µl N,N-Dimethylanilin (Merck, Darmstadt, Nr. 803060) je 40 ml Einbettungsmedium A eingeleitet. Die bei der exothermen Reaktion freiwerdende Wärme wurde zur Gewebeschonung durch ein kühles Wasserbad abgeführt.

Nach dem Auspolymerisieren der Kunststoffblöcke wurden die Schnitte an einem Hartschnitt-Rotationsmikrotom¹² (Anhang IX.2.) mit einem Spezialstahlmesser angefertigt, anschließend auf einem Streckbad¹³ (Anhang IX.2.) gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte¹⁴ (Anhang IX.2.) getrocknet.

2.7. Färbungen an Kunststoffschnitten

Als Übersichtsfärbungen wurden die Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung und die Färbung nach Giemsa verwendet. In ausgewählten Fällen wurden zusätzlich die PAS-Reaktion und die Versilberung nach AVALLONE durchgeführt.

2.7.1. Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung

Die Kunststoffschnitte

- in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249) einstellen, 5 Minuten
- bläuen in fließendem Leitungswasser, 10 Minuten
- ggf. bei Überfärbung in 1%ger HCl-Ethanol-Lösung (Anhang IX.6.1.1.) differenzieren
- wässern, 10 Minuten
- auf der Heizplatte¹⁴ (Anhang IX.2.) bei 60°C trocknen
- in die Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (Anhang IX.6.1.4.) einstellen
- in Aqua dest. spülen
- auf der Heizplatte bei 60°C trocknen
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

2.7.2. Protokoll für die Färbung nach Giemsa

Die Kunststoffschnitte

- in 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang IX.6.2.1.) einstellen, 60 Minuten im Wasserbad¹⁵ (Anhang IX.2.) bei 65°C
- in Aqua dest. spülen
- in 0,5%iger Essigsäure (Anhang IX.6.2.2.) differenzieren, bis zum Farbumschlag von blau nach rot
- in Aqua dest. spülen
- auf der Heizplatte¹⁴ (Anhang IX.2.) bei 60°C trocknen

- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

2.7.3. Protokoll für die PAS-Reaktion

Die Kunststoffschritte

- in 1%ige Perjodsäure (Anhang IX.6.3.1.) einstellen, 15 Minuten
- in Aqua dest. spülen
- in Schiffs Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. X.900.2) einstellen
- warm wässern, 30 Minuten
- auf der Heizplatte¹⁴ (Anhang IX.2.) bei 60°C trocknen
- in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249) einstellen, 20 Minuten
- bläuen in fließendem Leitungswasser, 10 Minuten
- in 1%iger HCl-Ethanol-Lösung (Anhang IX.6.1.1.) differenzieren
- wässern, 10 Minuten
- auf der Heizplatte bei 60°C trocknen
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

Mit der PAS-Reaktion werden in der Lichtmikroskopie neutrale Mukopolysaccharide, Polysaccharide, Mukoproteine, Glykoproteine, Glykolipide und Phospholipide in einem pinken Farbton dargestellt. Zellkerne stellen sich blau dar.

2.7.4. Protokoll für die Versilberung nach AVALLONE

Bei dieser Versilberung handelt es sich um AVALLONES Modifizierung von JONES Silbermethenamin-Färbung:

Die Kunststoffschritte

- in 1%ige Perjodsäure (Anhang IX.6.4.1.) einstellen, 15 Minuten

- in Aqua dest. spülen
- in Silbermethenamin-Gebrauchslösung (Anhang IX.6.4.5.) einstellen, 23 Minuten im Schüttelwasserbad¹⁵ (Anhang IX.2.) bei 65°C, wiederholte mikroskopische Kontrolle
- in Aqua dest. spülen
- in 0,1%ige Goldchlorid-Gebrauchslösung (Anhang IX.6.4.7.) einstellen, ca. 10-20 Sekunden
- in Aqua dest. spülen
- in 2%iges Natriumthiosulfat (Anhang IX.6.4.8.) einstellen, 1 Minute
- in Aqua dest. spülen
- auf der Heizplatte¹⁴ (Anhang IX.2.) trocknen bei 60°C
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 1025) eindecken.

Mit der Versilberung nach AVALLONE stellen sich in der Lichtmikroskopie Basalmembranen, retikuläre (argyrophile) Fasern (Typ III-Kollagen) und Zellkerngrenzen schwarz dar. Zytoplasma, Erythrozyten, kollagene Fasern (Typ I-Kollagen) und Bindegewebe stellen sich orange-braun dar.

2.8. Immunhistochemie

Ergänzend zu den histochemischen Untersuchungen des BALT wurde die Immunhistochemie an Paraffinschnitten herangezogen. Die Immunmarkierung bestimmter Zellpopulationen sollte genaueren Aufschluss über die Zellzusammensetzung und Verteilung freier lymphatischer Zellen (T- und B-Lymphozyten) des BALT geben. Ebenfalls sollte eine bessere Darstellung ortsständiger Zellen wie z.B. Epithelzellen ermöglicht werden.

2.8.1. Antikörper

Zur Darstellung von T- Lymphozyten, B- Lymphozyten, Zellen mesenchymaler Herkunft und Epithelzellen wurden polyklonale Antikörper gegen die Antigene CD3 und CD20 sowie monoklonale Antikörper gegen die Antigene Vimentin und

Zytokeratin AE1/AE3 eingesetzt (Tab. 1).

Tab. 1: Immunhistochemisch dargestellte Antigene bestimmter Zellpopulationen im BALT.

Antigen	Exprimiert von
CD3	T-Zellen
CD20	B-Zellen
Vimentin	Zellen mesenchymaler Herkunft
Zytokeratin AE1/AE3	Epithelzellen (mit Epitopen AE1/AE3)

2.8.2. Voruntersuchungen an Testgewebe

Vor der immunhistochemischen Untersuchung von T- und B-Lymphozyten am BALT des Schweines wurde getestet, ob die gegen humanes CD3 und CD20 gerichteten Antikörper entsprechend mit porzinen T- und B-Lymphozyten reagieren. Die Testgewebe Milz und Lymphknoten von Schweinen wiesen dabei spezifische Zellmarkierungen in den jeweiligen T- und B-Zellarealen auf.

2.8.3. Protokoll für die Immunhistochemie

Die oben genannten immunhistochemischen Antigennachweise wurden nach einem Standardprotokoll durchgeführt, die individuellen Zwischenschritte für die jeweiligen Antigennachweise sind in Tabellenform aufgeführt:

Die Paraffinschnitte

- über Nacht im Trockenschrank⁹ (Anhang IX.2.) bei 40°C trocknen
- in Xylol entparaffinieren, 20 Minuten
- in absteigender Alkoholreihe mit Ethanol 100%, 96% und 70% rehydrieren und anschließend in Aqua dest. spülen
- zur Epitopdemaskierung vorbehandeln (Tab. 2):

Tab. 2: Vorbehandlungen im IHC-Protokoll.

Antigen	Vorbehandlung	Durchführung	Zeit
CD3	Tris/EDTA Puffer pH 9,0 (Anhang IX.7.3.)	Mikrowelle ¹⁶ (Anhang IX.2.) bei 800 Watt	2 x 10 Minuten
CD20	-	-	-
Vimentin	10 mM Citratpuffer pH 6,0 (Anhang IX.7.4.)	Mikrowelle ¹⁶ (Anhang IX.2.) bei 800 Watt	2 x 10 Minuten
Zytokeratin	-	-	-

- in 1%ige Wasserstoffperoxidlösung (Anhang IX.7.1.) einstellen (Blockierung der endogenen Peroxidase), 15 Minuten
- in TBS (Anhang IX.7.2.) spülen, 10 Minuten
- mit Normalserum gegen unspezifische Bindungen absättigen (Tab. 3):

Tab. 3: Behandlung der Schnitte mit Normalserum im IHC-Protokoll.

Antigen	Normalserum	Verdünnung (TBS)	Zeit
CD3	Ziegennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149)	1:10	20 Minuten
CD20	Ziegennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092939149)	1:10	20 Minuten
Vimentin	Kaninchennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092941149)	1:10	20 Minuten
Zytokeratin	Kaninchennormalserum (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 092941149)	1:10	20 Minuten

- mit dem Primärantikörper in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubieren (Tab. 4):

Tab. 4: Verwendete Primärantikörper im IHC-Protokoll.

Antigen	Primärantikörper	Verdünnung (TBS)	Zeit
CD3	Kaninchen Anti-CD3 (DAKO, Hamburg, Nr. A0452)	1:100	60 Minuten
CD20	Kaninchen Anti-CD20 (Thermo Scientific, Waltham, USA, Nr. RB-9013-P)	1:400	60 Minuten
Vimentin	Maus Anti-Vimentin (DAKO, Hamburg, M0725)	1:300	60 Minuten
Zytokeratin	Maus Anti-Zytokeratin AE1/AE3 (DAKO, Hamburg, M3515)	1:50	60 Minuten

- in TBS spülen, 10 Minuten
- mit dem Sekundärantikörper in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubieren (Tab. 5):

Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper im IHC-Protokoll.

Antigen	Sekundärantikörper	Verdünnung (TBS)	Zeit
CD3	Ziege Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert (Vector, Burlingame, USA, BA-1000)	1:200	45 Minuten
CD20	Ziege Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert (Vector, Burlingame, USA, BA-1000)	1:200	45 Minuten
Vimentin	Kaninchen Anti-Maus Ig, Peroxidase-markiert (Dako, Hamburg, Nr. P0161)	1:100	45 Minuten
Zytokeratin	Kaninchen Anti-Maus Ig, Peroxidase-markiert (Dako, Hamburg, Nr. P0161)	1:100	45 Minuten

- in TBS spülen, 10 Minuten
- bei Verwendung eines biotinylierten Sekundärantikörpers (CD3 und CD20): mit einem Peroxidase markierten Avidin-Biotin-Komplex bei Raumtemperatur inkubieren (Tab. 6):

Tab. 6: Durchführung der ABC-Methode bei CD3 und CD20.

Antigen	ABC-Methode	Verdünnung (TBS)	Zeit
CD3	Avidin-Biotin-Komplex, Peroxidase markiert (Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100)	1:100	30 Minuten
CD20	Avidin-Biotin-Komplex, Peroxidase markiert (Vector, Burlingame, USA, Nr. PK-6100)	1:100	30 Minuten

- nach Durchführung der ABC-Methode: nochmals in TBS spülen, 10 Minuten

- bei ABC-Methode (CD3 und CD20) und indirekter Methode (Zytokeratin und Vimentin): mit H₂O₂-DAB-Gebrauchslösung (Anhang IX.7.5.) in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubieren, 5 Minuten
- in Leitungswasser wässern, 5 Minuten
- in Mayers Hämalaun einstellen (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249), 1 Minute
- in Leitungswasser wässern, 5 Minuten
- in Aqua dest. spülen und in aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol 70%, 96% und 100% dehydrieren
- in Xylol einstellen
- mit Histokitt eindecken (Hecht Assistent, Sondheim, Nr. 1025).

2.9. Durchführung der Untersuchungen

2.9.1. Untersuchung von Anbildungsgraden des BALT

Die Anbildungsgrade des BALT in den 4 Lokalisationen der 47 Mastschweinelungen wurden mit einem semiquantitativen Verfahren bestimmt. Die Beurteilung des Anbildungsgrades erfolgte in Paraffinschnitten in der Übersichtsfärbung HE unter einem Lichtmikroskop¹⁷ (Anhang IX.2.) mit der 2,5-fachen Vergrößerung.

2.9.2. Untersuchungen zur Morphologie tertiärer lymphatischer Gewebe

Die Untersuchungen zur Morphologie tertiärer lymphatischer Gewebe in der Lunge des Schweines wurden in einem deskriptiven Verfahren durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte für die HE- und Giemsa-Färbung, für die PAS-Reaktion und Versilberung nach AVALLONE sowie für die Immunhistochemie jeweils in Serie angefertigt und unter einem Lichtmikroskop¹⁷ (Anhang IX.2.) betrachtet.

IV. ERGEBNISSE

1. Makroskopische und histologische Voruntersuchungen

Die angefertigten und vorfixierten Lungenscheiben von Mastschweinen aus dem Obduktionsmaterial des Institutes für Tierpathologie der LMU München wurden makroskopisch auf unterschiedlich große Atemwege hin untersucht und diese dann gezielt für die Lichtmikroskopie beprobt, um möglichst viele verschiedene unveränderte Atemwegstypen, z.B. die von BASKERVILLE (1970) beschriebenen Bronchiolustypen des Schweines erkennen zu können. Das Studium der detaillierten histologischen Kriterien der Atemwege sollte ebenfalls die Unterscheidung ihres normalen histologischen Aufbaus von eventuellen Modifikationen bei lymphatischer Gewebeanbildung ermöglichen. Dazu wurden in den Voruntersuchungen auch die 47 Mastschweinelungen mit EP-typischen Läsionen herangezogen.

Weiterhin wurden frische Lungen von Mastschweinen mit EP-verdächtigen Lungenveränderungen aus dem Obduktionsmaterial des Institutes für Tierpathologie der LMU München makroskopisch mit einer Lupe auf BALT-Anbildung hin untersucht, um die eventuelle Möglichkeit für eine raster- und transelektronenmikroskopische Untersuchung durch eine gezielte Gewinnung von BALT in die Studie einzuschließen.

1.1. Ergebnisse der Voruntersuchungen

Die Anbildung eines BALT findet in EP-typischen Lungen überwiegend an den Bronchioli statt. Das Lumen der makroskopisch erkennbaren Bronchioli misst beim Mastschwein ca. 1 mm Durchmesser (Abb. 3). Nur vereinzelt findet die Anbildung des BALT auch an den knorpeltragenden Bronchien statt.



Abb. 3: Mit der Lupe ist ein kleinerer Bronchus (\emptyset ca. 2 mm) noch deutlich mit seinem knorpeligen Gerüst und einem weitleumigen Anschnitt erkennbar (1), die kleineren Atemweglumina (≤ 1 mm) der Bronchioli (2) sind dagegen kaum im Lungenparenchym erkennbar (oben); in der Histologie bestätigt sich der makroskopisch identifizierte Bronchus durch Spangen von hyalinem Knorpel (3), die Bronchioli sind zahlreich im Parenchym zu erkennen (4).

Die Bronchiolustypen proximaler, distaler sowie terminaler Bronchiolus können eine BALT-Anbildung aufweisen (Abb. 4), am kleinsten Bronchiolus, dem *Bronchiolus respiratorius*, ist hingegen kein BALT zu beobachten (Abb. 5).

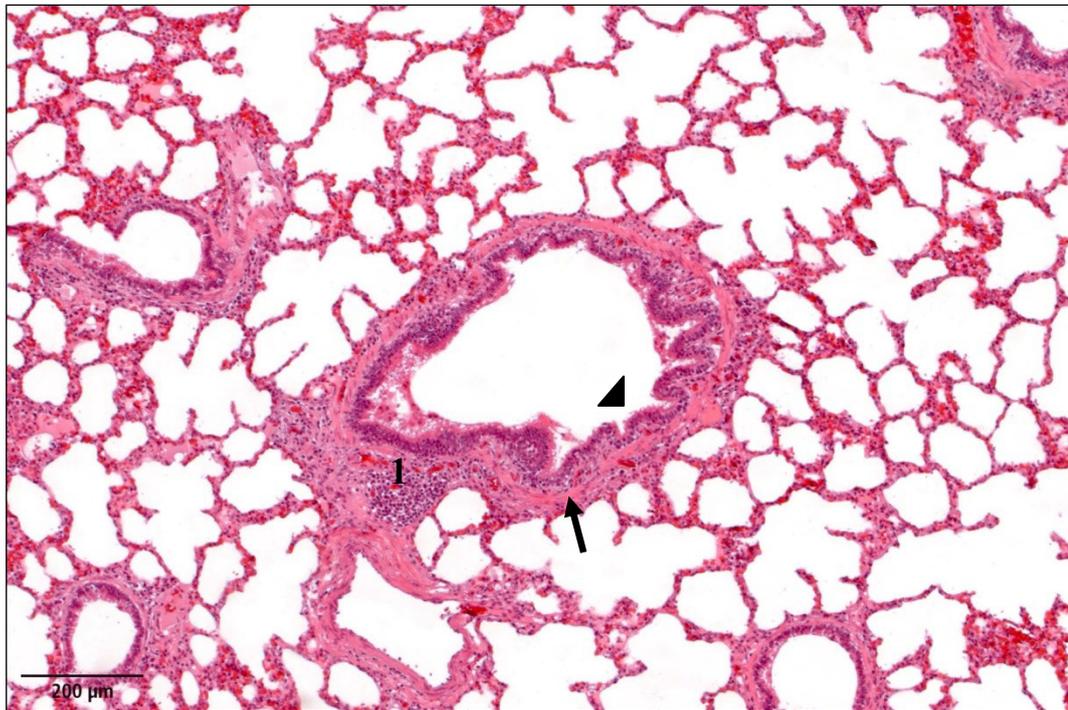


Abb. 4: BALT-Anbildung (1) an einem distalen *Bronchiolus*; die Muskelschicht besteht noch etwa aus 2 Zelllagen (Pfeil) und das Flimmerepithel (Pfeilkopf) ist einfach hochprismatisch; HE-Färbung.

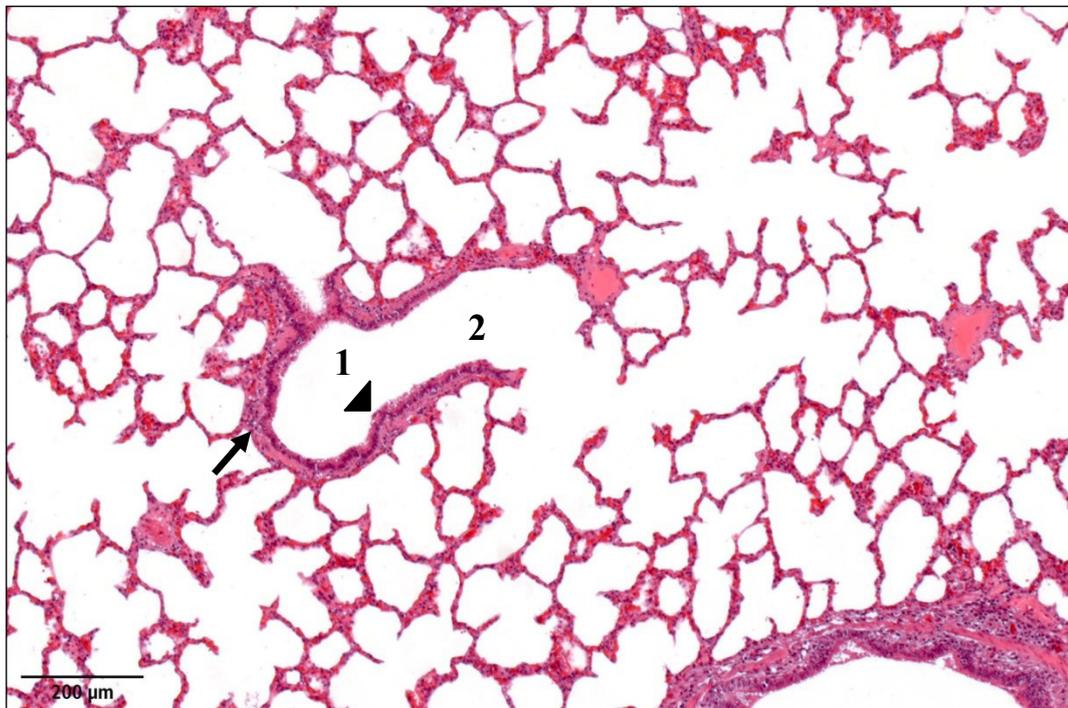


Abb. 5: Die Wand des *Bronchiolus respiratorius* (1) hat nur noch vereinzelte Muskelzellen, die keine durchgehende Muskelschicht mehr bilden (Pfeil); die epitheliale Auskleidung ohne Kinozilien ist zunächst noch isoprismatisch (Pfeilkopf) und wird in Richtung des *Ductus alveolaris* zunehmend flacher (2); BALT-Anbildung kann an diesem Bronchiolus-Typ nicht beobachtet werden; HE-Färbung.

Aufgrund des histologischen Befundes der überwiegend bronchiolären lymphatischen Gewebeanbildung und einer nicht erfolgreichen makroskopischen Identifikation des BALT basiert diese Arbeit auf histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen des BALT mittels Lichtmikroskopie.

2. Untersuchung von Anbildungsgraden des BALT

Mit der Untersuchung von Anbildungsgraden des BALT am Bronchiolus des Schweines soll die Verteilung und Ausprägung des BALT in Mastschweinelungen mit mikroskopisch EP-typischen Läsionen in zuvor 4 festgelegten Lokalisationen (siehe Kapitel III.1.1.1.) erfasst werden. Besondere Beachtung soll dabei die Frage nach einer Gleichmäßigkeit der Anbildung innerhalb der einzelnen Lunge finden, oder ob bestimmte Lokalisationen für eine höhergradige Anbildung bevorzugt sind.

Für die Untersuchung des BALT im Rahmen von EP standen von den von der Schweineklinik ausgewählten Mastschweinelungen $n = 47$ zur Verfügung, in denen die pathohistologische Diagnostik zu 100 % (47/47) in mindestens einer der vier Lokalisationen eine interstitielle Pneumonie mit BALT-Anbildung bestätigen konnte, 74 % (35/47) der Lungen wiesen zusätzlich in mindestens einer Lokalisation Läsionen einer katarrhalisch-eitrigen Bronchopneumonie auf.

Freundlicherweise wurden von CEESA (Centre Européen d'Etudes pour la Santé Animale) über die Schweineklinik Ergebnisse einer kulturellen bakteriologischen Untersuchung auf *Mycoplasma hyopneumoniae* überlassen. Es konnte in 8 von 40 kulturell untersuchten Lungengewebe das Vorkommen von *Mycoplasma hyopneumoniae* bestätigt werden.

Eine ausführliche Dokumentation der Ergebnisse ist in Tab. 9 (Anhang IX.1.) festgehalten.

2.1. Definition von BALT-Anbildungsgraden

Zunächst wurde untersucht, ob und wie Anbildungsgrade des Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) des Schweines in EP-typischen Lungen eingeteilt werden können.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung des gesamten zur Verfügung stehenden BALT-Spektrums in den insgesamt 188 Lokalisationen konnten vier Anbildungsgrade (0 bis +++) für das BALT definiert werden (Tab. 7 und Abb. 6).

Tab. 7: Definitionen der Anbildungsgrade des BALT (0 bis +++).

Grad	Menge der Bronchioli mit Anbildung *	BALT-Anbildung am einzelnen Bronchiolus
negativ (0)	-	-
geringgradig (+)	vereinzelt Bronchioli	peribronchioläre Lymphozytenansammlungen, darunter mindestens 1 Follikelformation
mittelgradig (++)	mehrheitlich bis alle Bronchioli	1 bis 2 Follikel
hochgradig (+++)	mehrheitlich bis alle Bronchioli	> 2 Follikel

* geschätzt an der Gesamtzahl vorhandener Bronchioli, Vergrößerung 2,5-fach.

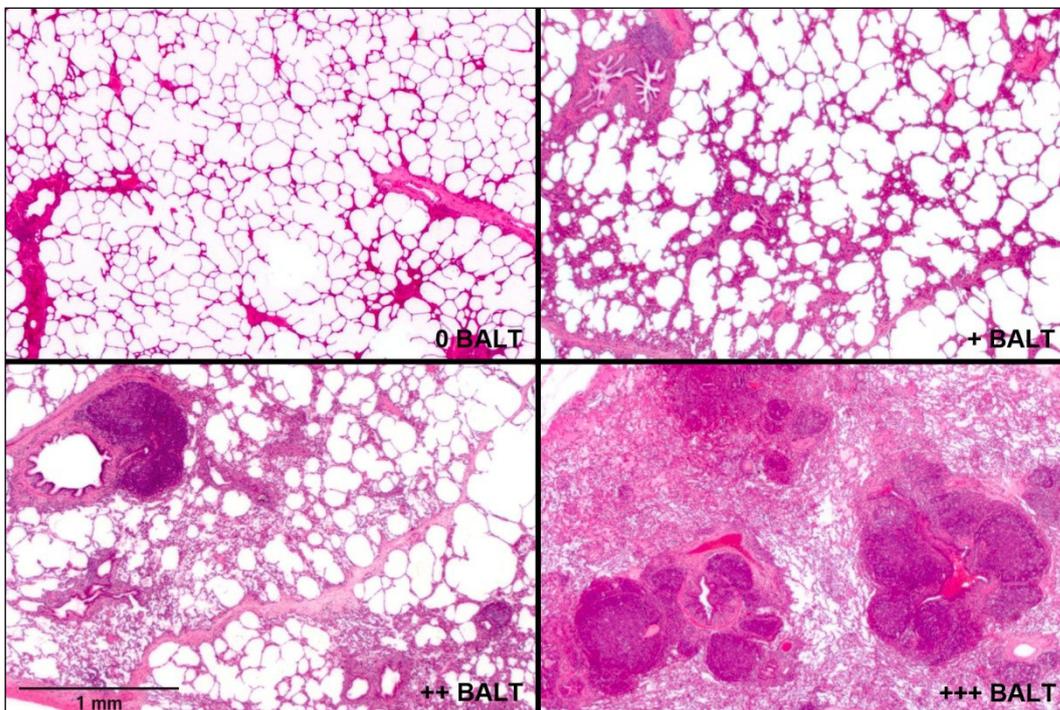


Abb. 6: Histologische Darstellung der Grade einer BALT-Anbildung 0 bis +++.

2.2. Häufigkeit der Anbildungsgrade

Für die Häufigkeit der zuvor definierten Anbildungsgrade lässt sich in den 47 Lungen mit EP-typischen Läsionen feststellen, dass der geringe Anbildungsgrad mit 55% (104/188 Lokalisationen) die häufigste Ausprägungsform in den Lungen darstellt. Bei 34% (64/188) der Lokalisationen zeigt sich eine mittelgradige Anbildung. Einen kleineren Anteil stellt das hochgradig angebildete BALT mit

8% (15/188 Lokalisationen) dar. In 3% (5/188) der Lokalisationen kann kein BALT beobachtet werden (Abb. 7).

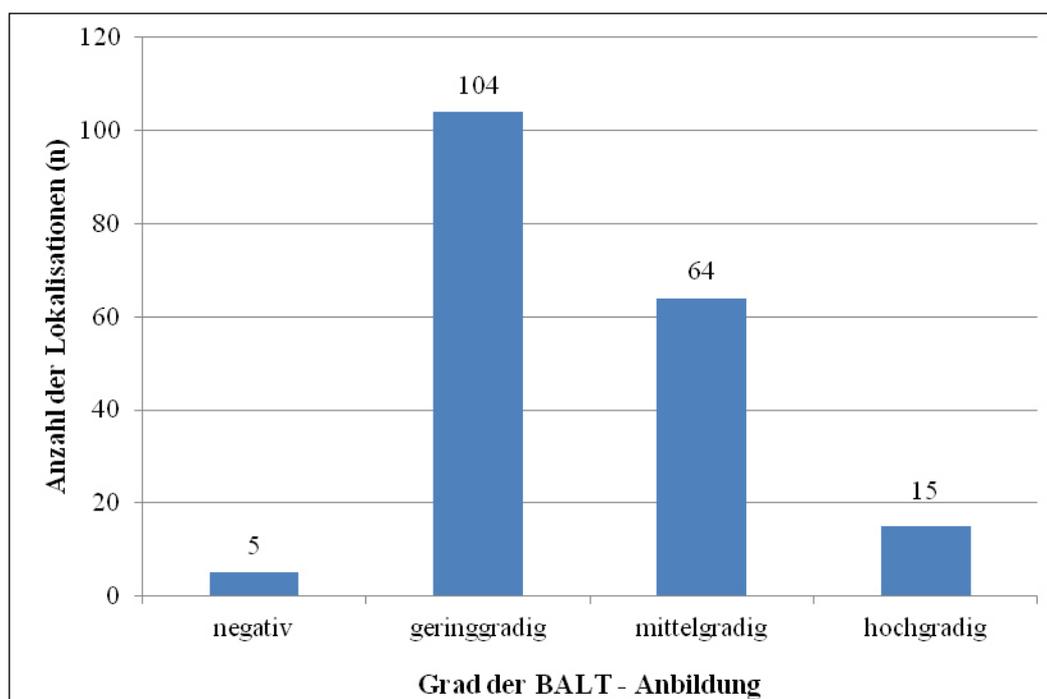


Abb. 7: Häufigkeit der BALT-Anbildungsgrade in den untersuchten Lungenlokalisationen (n=188).

2.3. Vergleich der BALT-Anbildungsgrade in den Lokalisationen 1 bis 4

Beim Vergleich der BALT-Anbildungsgrade innerhalb der einzelnen Lunge können bei 87% (41/47) der Lungen unterschiedliche Ausbildungsgrade in den 4 Lokalisationen beobachtet werden. Zur Ermittlung der Differenz zwischen den Ausbildungsgraden werden die Grade negativ bis hochgradig mit den Zahlen 0 bis 3 gleichgesetzt:

In 55% (26/47) der Lungen liegt die Differenz des höchsten und geringsten BALT-Anbildungsgrades pro Lunge bei 1. Diese Differenz zeigt sich nur in der Kombination von geringgradiger und mittelgradiger Ausbildung.

In 28% (13/47) der Lungen ergibt die Differenz der Ausbildungsgrade 2. Diese Differenz ist in den Kombinationen von negativer mit mittelgradiger Ausbildung oder geringgradiger mit hochgradiger Ausbildung zu beobachten.

In 4% (2/47) der Lungen kann eine Differenz von 3 festgestellt werden, in der Kombination negativ bis hochgradig.

Bei 13% (6/47) der Lungen liegt ein identischer Ausbildungsgrad in den 4 Lokalisationen vor. Dabei handelt es sich in allen 6 Lungen um geringgradige BALT-Anbildung (Abb. 8).

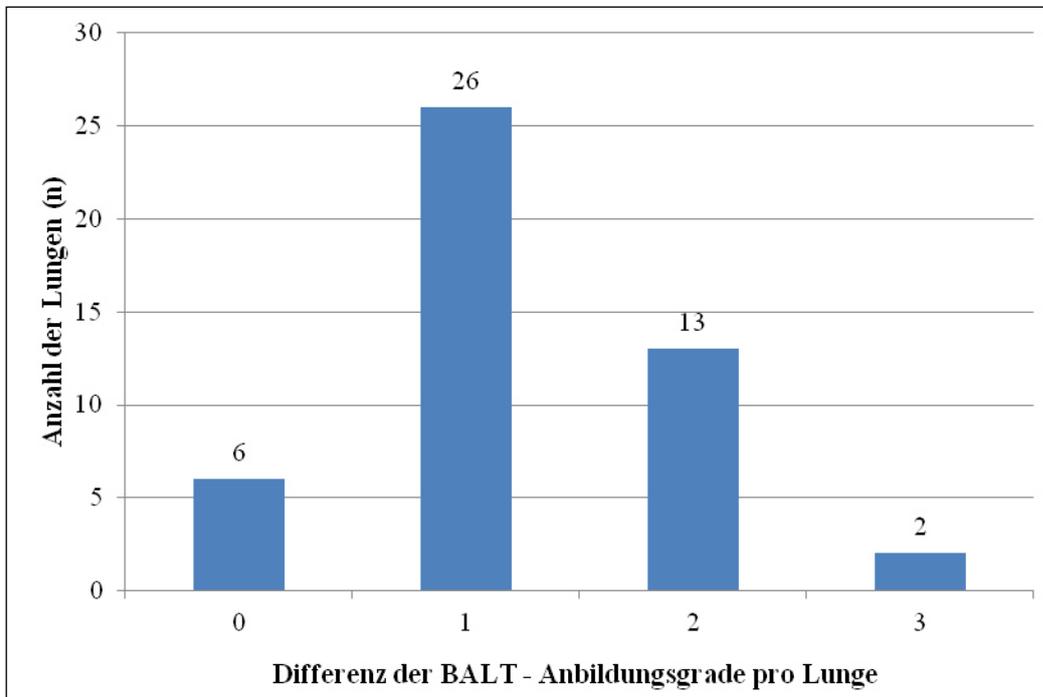


Abb. 8: Anzahl der Lungen (n=47) mit der jeweils pro Lunge ermittelten Differenz (0, 1, 2, 3) ihrer BALT-Anbildungsgrade. Die Differenz wird anhand des höchsten und niedrigsten BALT-Anbildungsgrades in 4 verschiedenen Lokalisationen innerhalb der einzelnen Lunge ermittelt.

2.4. Lokalisationen höhergradiger BALT-Anbildung

Bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der Ausbildungsgrade auf die 4 Lokalisationen zeigt sich, dass 100% der BALT-negativen Lokalisationen (n=5) auf die beiden kaudalen Lokalisationen 3 und 4 fallen. Geringgradig angebildetes BALT (n=104) wird mit 38% in Lokalisation 3 und mit 30% in Lokalisation 4 gleichfalls überwiegend in den beiden kaudalen Lokalisationen beobachtet. Mittelgradige BALT-Anbildung (n=64) kann dagegen überwiegend in den kranialer gelegenen Lungenlappen ermittelt werden, dabei fallen 33% auf Lokalisation 1 und 37 % auf Lokalisation 2. Hochgradig angebildetes BALT (n=15) kann zu 100% in den beiden kranialer gelegenen Lungenlokalisationen 1 und 2 beobachtet werden (Abb. 9).

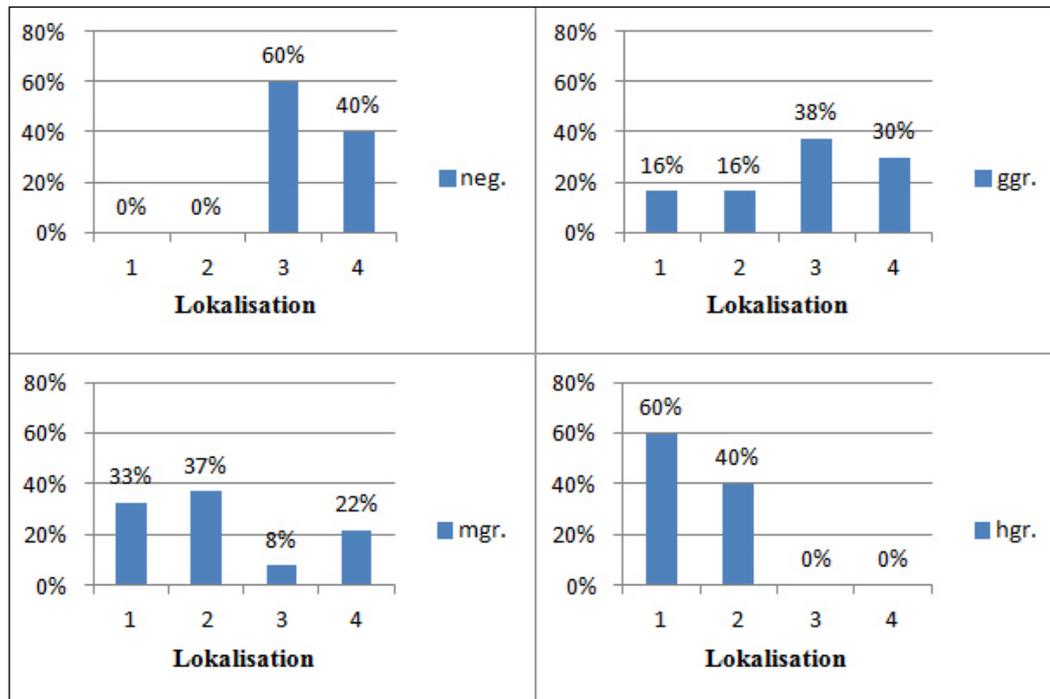


Abb. 9: Prozentuale Verteilung der BALT-Anbildungsgrade negativ (neg.) bis hochgradig (hgr.), die jeweils in den Lokalisationen 1 (kranial) bis 4 (kaudal) in 47 Lungen ermittelt wurden (neg.=negativ, ggr.=geringgradig, mgr.=mittelgradig, hgr.=hochgradig).

3. Histologie lymphatischer Gewebe in Lungen mit Enzootischer Pneumonie

In der Lunge des Schweines lassen sich bei EP-typischen Läsionen zwei Formen von organisiertem lymphatischem Gewebe unterscheiden, das Bronchiolus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) und Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG). Im Folgenden werden beide im Rahmen der lichtmikroskopisch durchgeführten Untersuchungen beschrieben.

3.1. Histologie des Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT)

Das Ausmaß der Anbildung des BALT ist sowohl bei verschiedenen Schweinen als auch innerhalb der Lunge des einzelnen Tieres unterschiedlich (siehe Kapitel IV.2).

Das vollständig angebildete BALT des Schweines weist auf der Lumenseite des Bronchiolus beginnend folgende Komponenten auf: 1) Lymphoepithel, 2) Follikel-assoziierte Lamina propria, 3) Follikel mit Keimzentrum, der in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen liegt und 4) T-Zellareal mit hochendothelisierten Venolen (HEV) (Abb. 10 und Abb. 11).

Es werden nachfolgend neben der Charakterisierung eines vollständig angebildeten BALT zugleich auch individuelle Anbildungsmerkmale jeder einzelnen oben genannten Komponente in den verschiedenen Anbildungsgraden (Tab. 7, rechte Spalte) beschrieben. Anschließend werden diese Merkmale in einer Übersicht zusammengefasst (siehe Kapitel IV.3.1.5.). Eine vollständige Anbildung aller Komponenten des BALT ist lichtmikroskopisch häufig schon bei mittelgradiger Anbildung des BALT möglich, bei hochgradiger Anbildung immer.

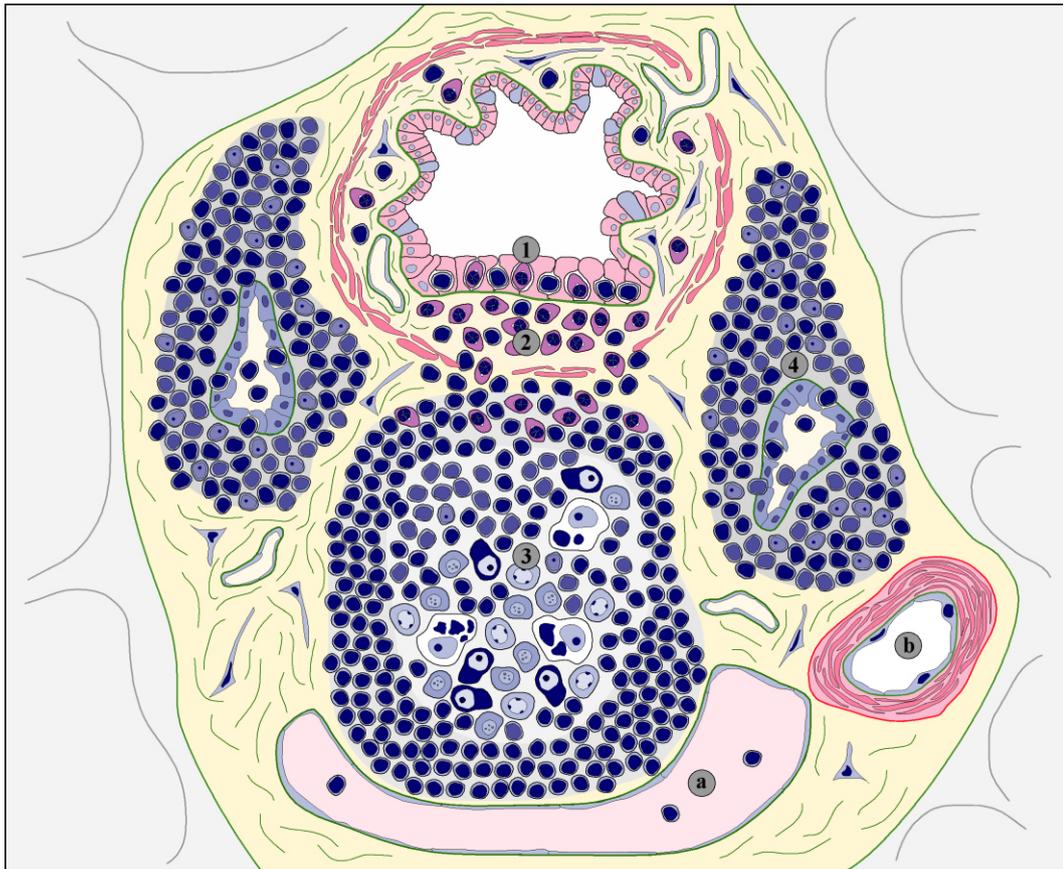


Abb. 10: Schematische Darstellung der Komponenten eines vollständig angebildeten BALT des Schweines: Lymphoepithel (1); Follikel-assoziierte Lamina propria (2); Follikel mit Keimzentrum (3), in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen (a, b); T-Zellareal mit HEV (4).

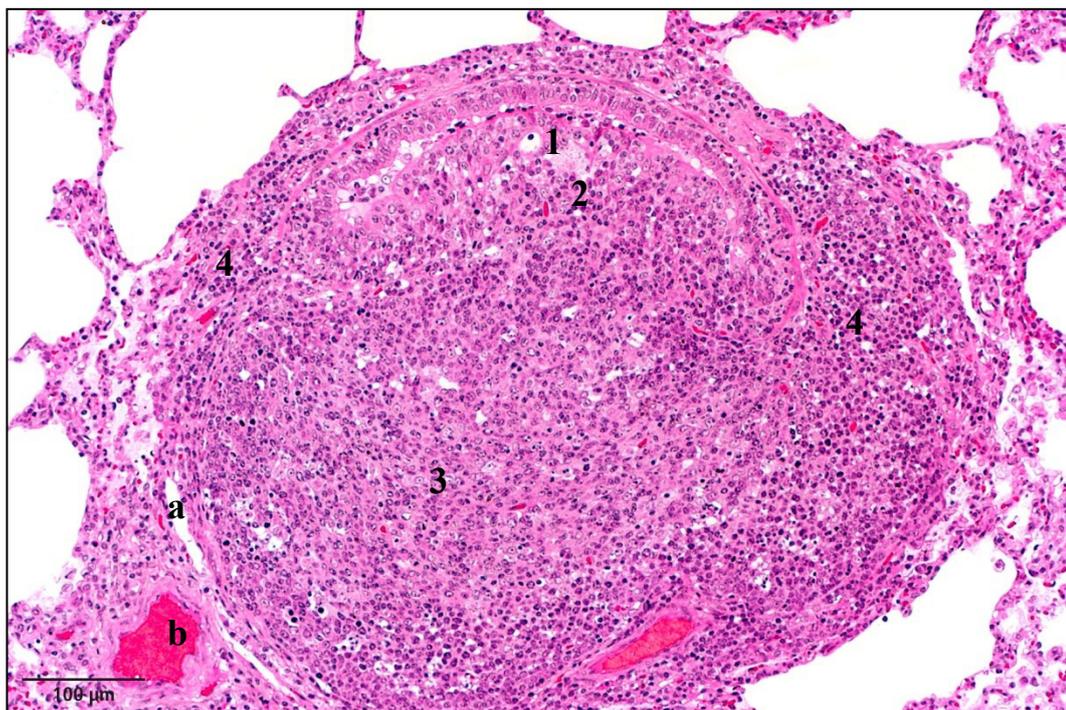


Abb. 11: Histologie des vollständig angebildeten BALT des Schweines: Lymphoepithel (1); Follikel-assoziierte Lamina propria (2); Follikel mit Keimzentrum (3), in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen (a, b); T-Zellareal mit HEV (4); HE-Färbung.

3.1.1. Lymphoepithel

Im Vergleich zum regulären Bronchiolusepithel weist der Schleimhautabschnitt, der mit einem lymphatischen Follikel assoziiert ist, einige Besonderheiten auf. In diesem Abschnitt treten modifizierte Epithelzellen gemeinsam mit lymphatischen Zellen auf, sodass nachfolgend die bereits zuvor in der Literatur anderer MALT-Beschreibungen geprägte Bezeichnung „Lymphoepithel“ verwendet wird (siehe Kapitel II.2.1.1.).

Ein Lymphoepithel tritt nur in Verbindung mit einem Lymphfollikel (siehe Kapitel IV.3.1.3.) und der dazugehörigen Follikel-assoziierten Lamina propria (siehe Kapitel IV.3.1.2) auf. Der Anteil des Lymphoepithels in einem Querschnitt eines Bronchiolus steigt mit zunehmender Anzahl an Follikeln, die den jeweiligen Bronchiolus umgeben. Bei hochgradig angebildetem BALT kann das Lymphoepithel den gesamten Querschnitt eines Bronchiolus auskleiden.

Zur besseren Unterscheidung eines normalen Bronchiolusepithels von einem Lymphoepithel wurden für die bildliche Darstellung vorrangig Bronchioli mit ein bis zwei Follikeln ausgewählt. Das bedeutet, dass eine epitheliale Modifikation schon bei geringgradiger Anbildung mit Follikelformation beobachtet wird, ab mittelgradiger BALT-Anbildung immer.

3.1.1.1. Epitheliale Komponente des Lymphoepithels

Zunächst wird der normale Aufbau eines Bronchiolus beschrieben, anschließend die Modifikation der epithelialen Komponente des Lymphoepithels im BALT des Schweines. Die normale Auskleidung eines Bronchiolus besteht bis einschließlich der *Bronchioli terminales* aus hochprismatischen respiratorischen Epithelzellen und geht dann in eine isoprismatische Zellform über. Kinozilien, die für die respiratorische Epithelzelle typisch sind, kann man bis zu den *Bronchioli terminales* beobachten. Zwischen den Epithelzellen liegen Becherzellen, die mit Annäherung an die *Bronchioli terminales* in ihrer Zahl abnehmen und zunehmend durch Clara-Zellen ersetzt werden (Abb. 12). Die Becherzellen lassen sich durch Anfärbung ihrer Muzine mittels der PAS-Reaktion selektiv darstellen (Abb. 13). Die den Bronchiolus auskleidenden Epithelzellen ruhen auf einer Basalmembran, die in der HE-Färbung nicht erkennbar ist, jedoch durch Versilberung dargestellt werden kann (Abb. 14). Intraepitheliale Lymphozyten sind in der normalen Schleimhaut des Bronchiolus nur vereinzelt zu sehen.



Abb. 12: Epitheliale Auskleidung eines normalen Bronchiolus (*Bronchiolus terminalis*), bestehend aus Flimmerepithelzellen und Becherzellen (1); weiterhin sind die *Lamina propria* (2), die zirkuläre Muskelschicht (3) und das Peribronchiolum (4) zu erkennen, an das ein Lymphgefäß (5) grenzt; HE-Färbung.

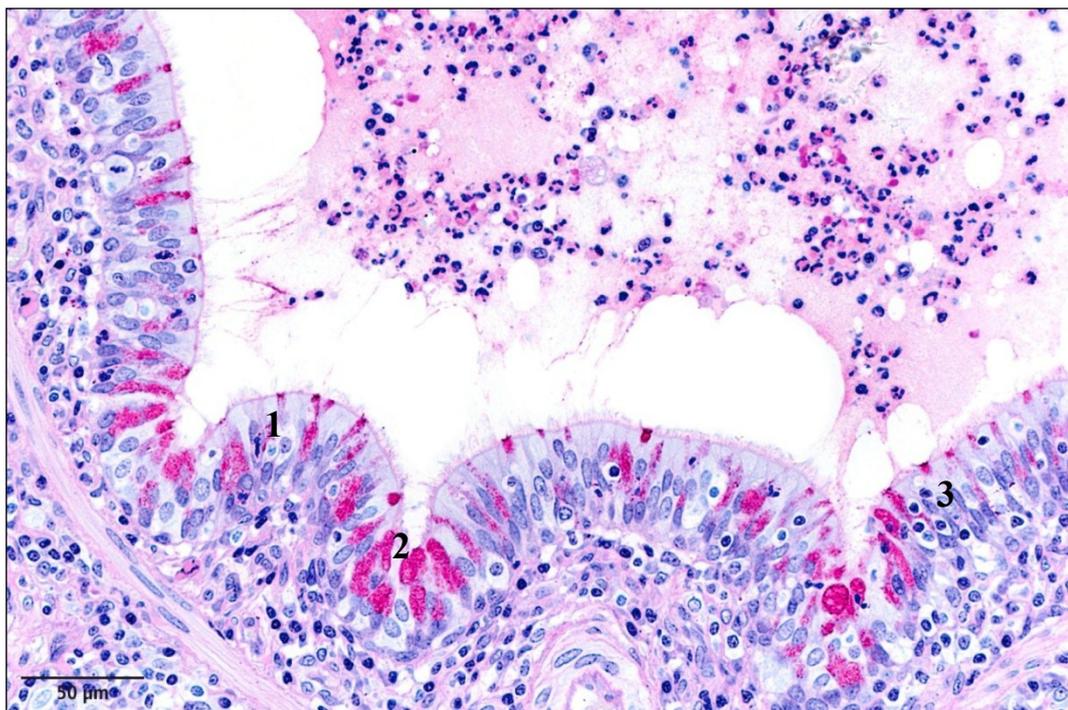


Abb. 13: Übersicht über das normale Epithel eines Bronchiolus: zwischen den Flimmerepithelzellen (1) liegen die PAS-positiven Becherzellen (2), außerdem treten vereinzelte intraepitheliale Lymphozyten (3) auf; PAS-Reaktion.

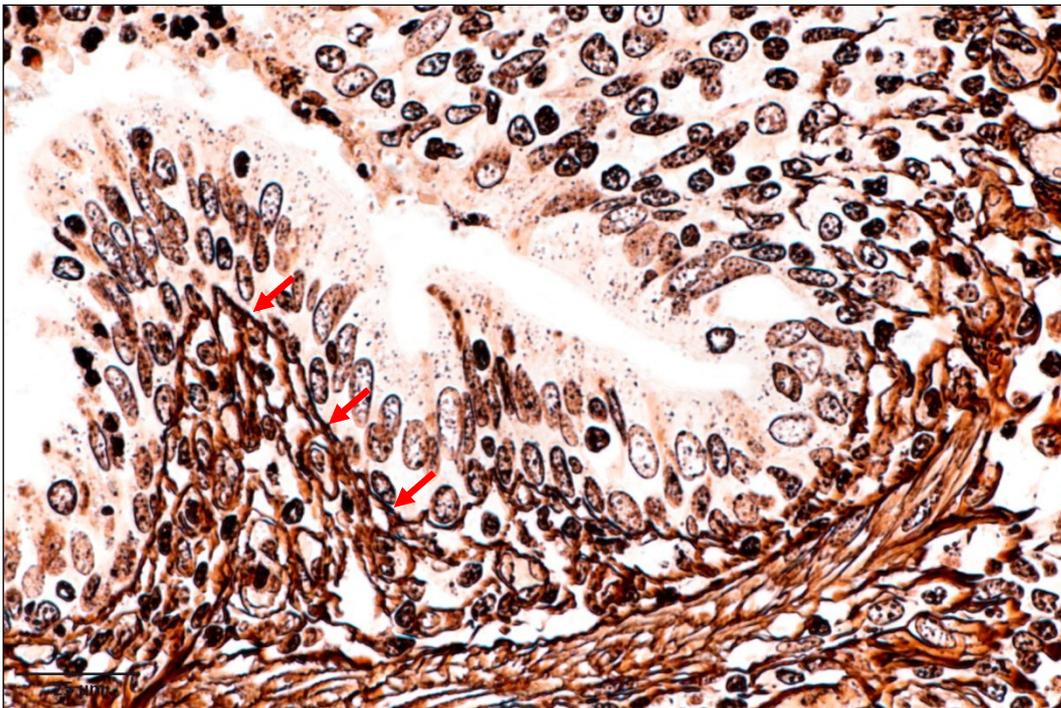


Abb. 14: Normale Epithelzellen ruhen auf einer versilberbaren Basalmembran (Pfeile); Versilberung nach AVALLONE.

Schleimhautabschnitte mit einem Lymphoepithel wirken mit zunehmender intraepithelialer lymphatischer Zellzunahme beetartig in das Lumen des Bronchiolus vorgewölbt (Abb. 15). Im Vergleich mit einem normalen respiratorischen Epithel macht das Lymphoepithel bei schwacher Vergrößerung einen unruhigen Eindruck, die Epithelzellen sind häufig gar nicht zu erkennen.

Die basale Begrenzung der Epithelzellen im Lymphoepithel ist nicht deutlich zu erkennen, ihre apikalen Anteile bilden einen schmalen, zusammenhängenden Saum. Die Zellkerne der Epithelzellen liegen entweder in einem schlanken, senkrecht zur undeutlich erkennbaren Basalmembran stehenden Zytoplasma-streifen oder im apikalen Anteil der Zelle. Zumindest einzelne Zellen weisen einen apikalen Zilienbesatz auf (Abb. 16).

Form und Ausdehnung der Epithelzellen des Lymphoepithels sind eindeutiger mittels der immunhistochemischen Darstellung von Zytokeratin zu erkennen. Dabei wird deutlich, dass die Zellen eine nur abschnittsweise erkennbare basale Begrenzung aufweisen, jedoch alle Epithelzellen nahezu die gleiche Höhe haben (Abb. 17 und Abb. 18).

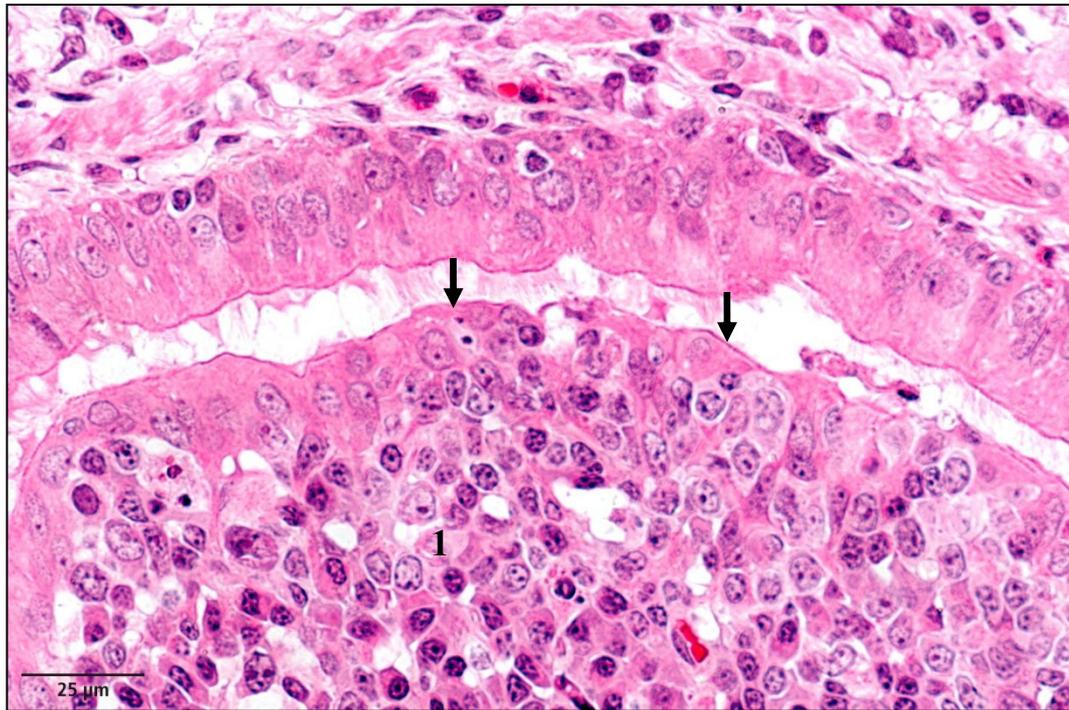


Abb. 15: Übersicht über das Lymphoepithel, von den Epithelzellen ist vor allem ein lumennaher Zytoplasmasaum (Pfeile) zu erkennen, die Abgrenzung zu der basal liegenden Follikel-assoziierten Lamina propria (1) ist nicht möglich; die gegenüberliegende Seite des Bronchiolus weist eine normale, zur Lamina propria hin gut abgrenzbare Epithelzellauskleidung mit gut erkennbaren Zilien auf; HE-Färbung.

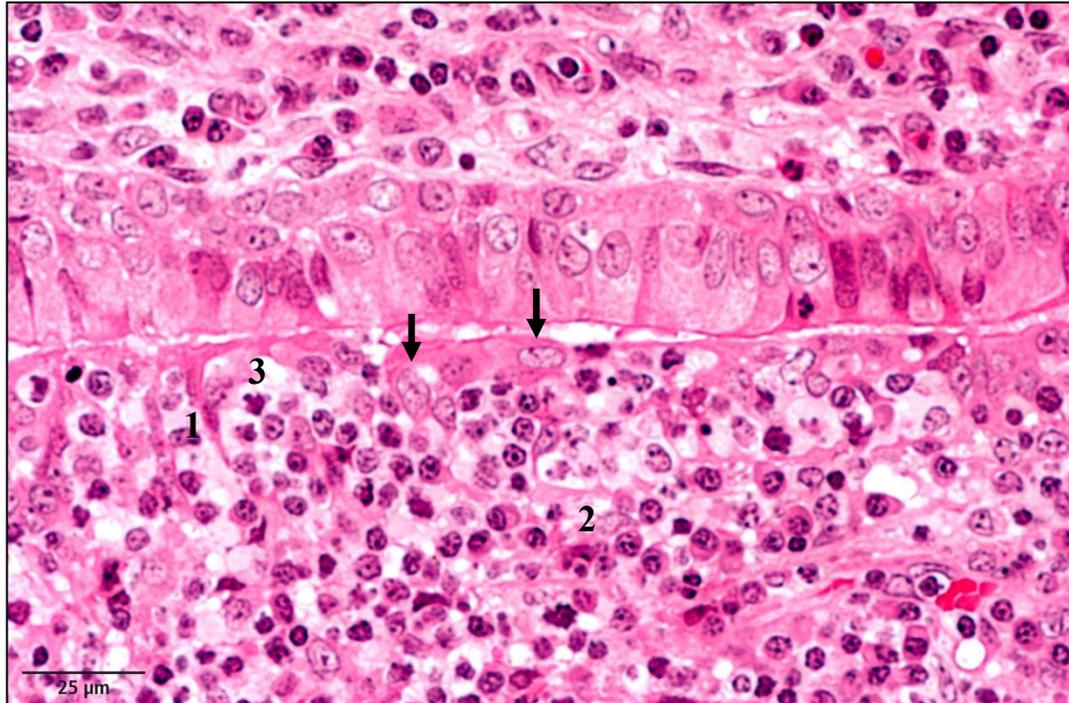


Abb. 16: Das Zytoplasma der Epithelzellen ist häufig auf einen schmalen Streifen reduziert (1), die basale Begrenzung der Zellen ist nur abschnittsweise zu erahnen (2), lediglich der apikale Anteil der Zellen verbindet sich zu einem durchgehenden Saum (3); die Zellkerne der Epithelzellen liegen teils apikal, teils in schlanken Zytoplasmastreifen (Pfeile); HE-Färbung.

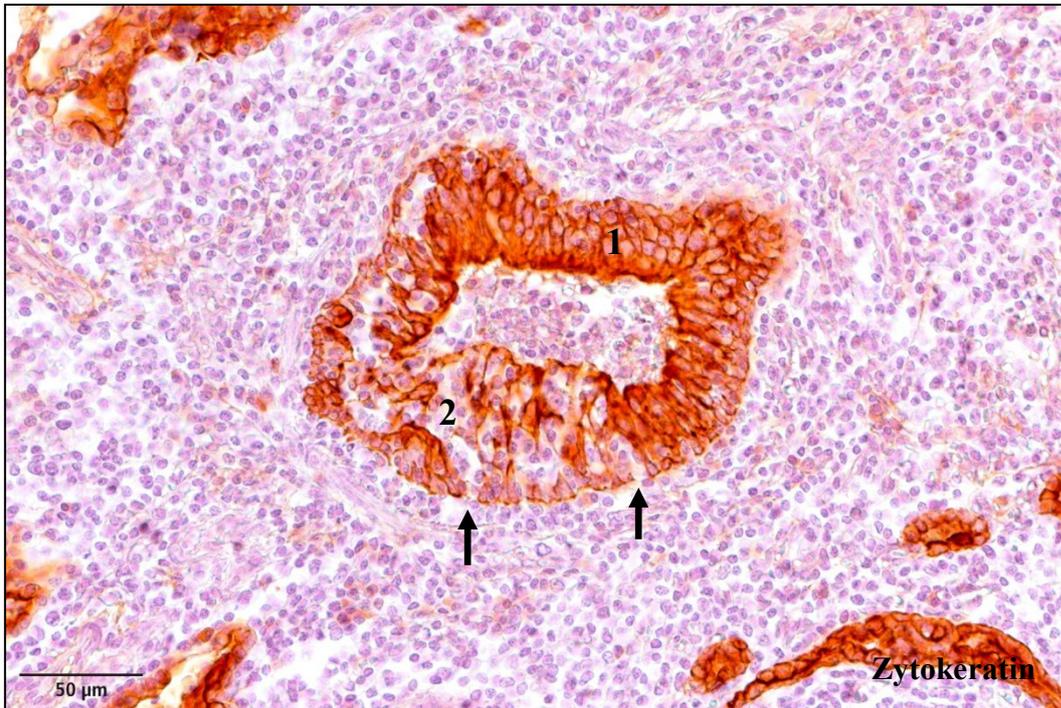


Abb. 17: Übersicht eines Bronchiolus, neben dem normalen Epithel (1) ist das aufgelockerte Lymphoepithel mit schmalen Zytoplasmastreifen der Epithelzellen zu erkennen (2), die basale Begrenzung der Epithelzellen ist teilweise weniger deutlich zu erkennen (Pfeile).

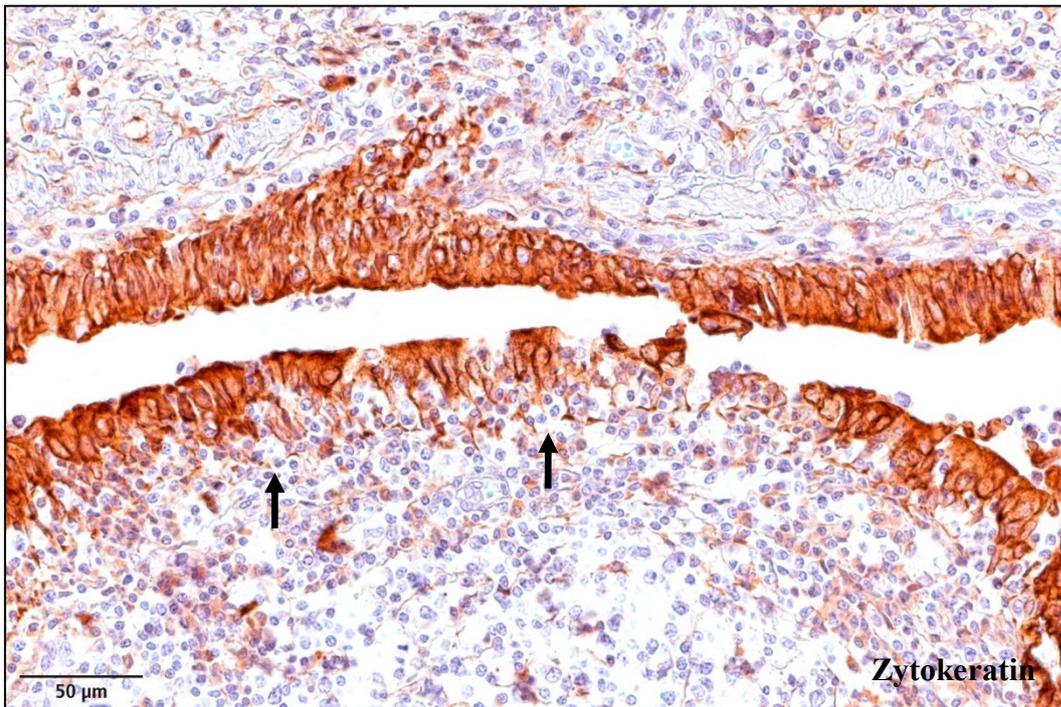


Abb. 18: Der Vergleich von normalem Epithel (oben) mit dem Lymphoepithel (unten) zeigt die Lückenhaftigkeit des Lymphoepithels und die damit verbundene kaum erkennbare basale Begrenzung (Pfeile).

Der diskontinuierlichen basalen Begrenzung der Epithelzellen entspricht das Fehlen einer versilberbaren Basalmembran (Abb. 19).

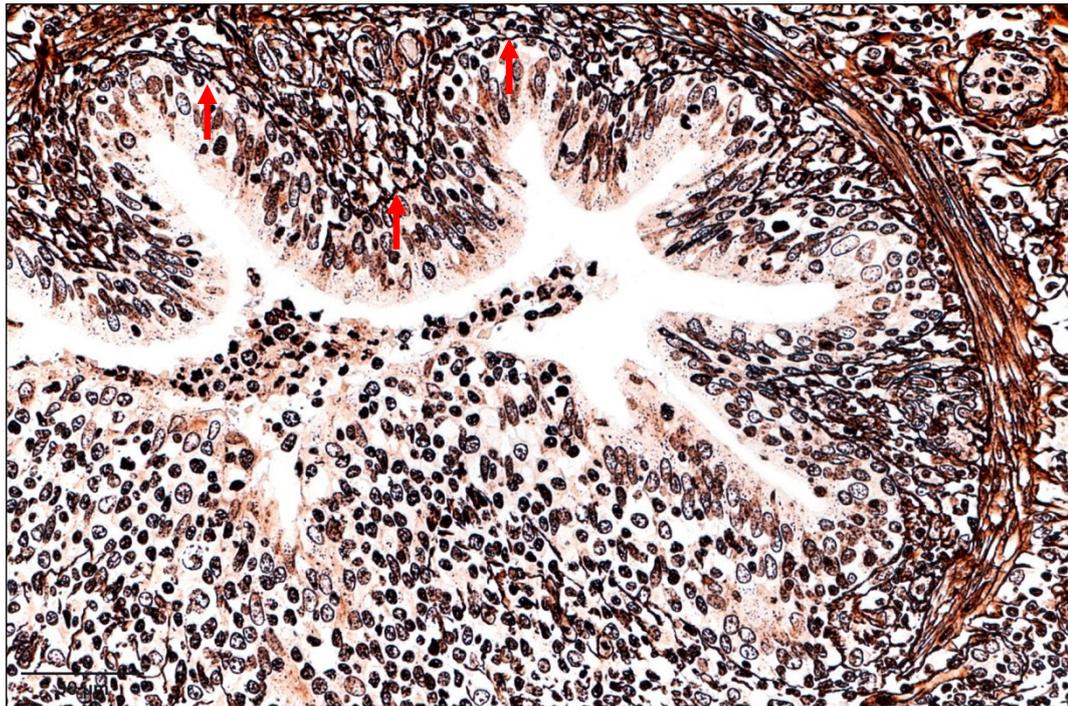


Abb. 19: Das normale Epithel (oben) ruht auf einer Basalmembran (Pfeile), im Bereich des Lymphoepithels (unten) ist keine Basalmembran zu erkennen; Versilberung nach AVALLONE.

Die Anzahl der in den größeren Bronchioli auftretenden PAS-positiven Becherzellen ist im Lymphoepithel gegenüber dem normalen respiratorischen Epithel reduziert (Abb. 20).

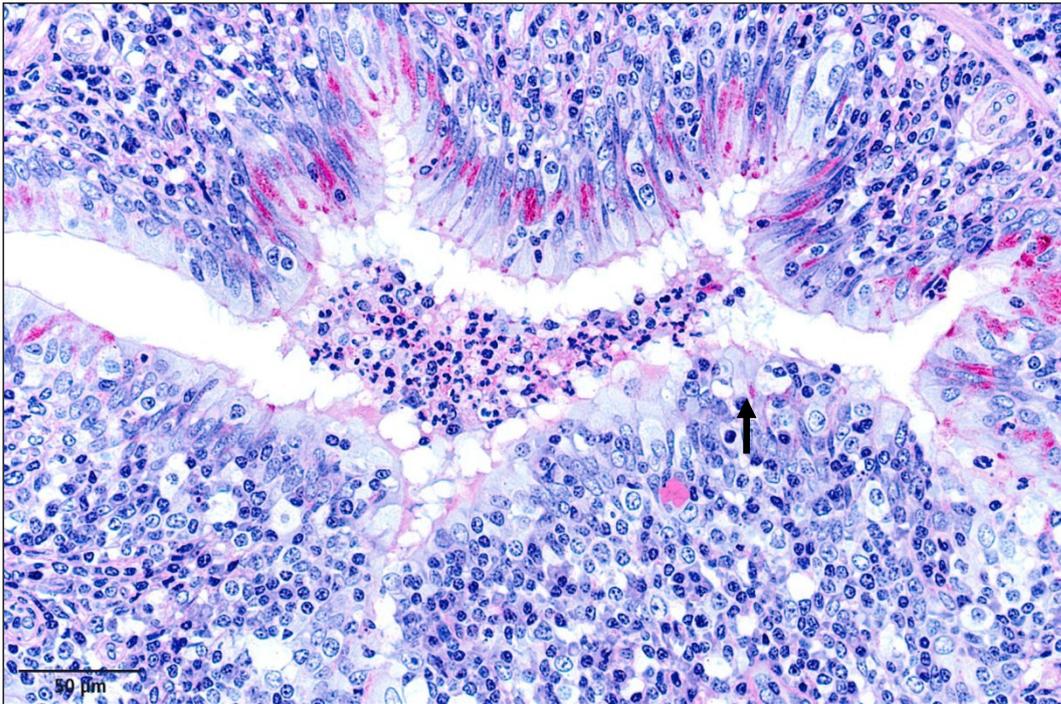


Abb. 20: Das normale Epithel (oben) zeigt in regelmäßigen Abständen die PAS-positiven Granula der Becherzellen, im Lymphoepithel (unten) sind sie nur ganz vereinzelt zu erkennen (Pfeil); PAS-Reaktion.

Zellen, die lichtmikroskopisch M-Zellen entsprechen könnten, können im Lymphoepithel nicht beobachtet werden. Der immunhistochemische Nachweis solcher Zellen mittels Vimentin fällt negativ aus.

3.1.1.2. Lymphozytäre Komponente des Lymphoepithels

Lymphatische Zellen stellen den überwiegenden Anteil der freien Zellen im Lymphoepithel dar. Die Größe der zumeist runden Zellkerne reicht von kleinen und heterochromatinreichen bis zu mittelgroßen Kernen mit deutlichen Nukleoli. Die Menge an Zytoplasma reicht von kaum erkennbar bis zu einem umfangreichen und dunkelblauen Zytoplasma in der Färbung nach Giemsa (Abb. 21). Neben zahlreichen Lymphozyten unterschiedlicher Reife- bzw. Aktivierungsstadien gehören zu den freien Zellen im Lymphoepithel auch reife Plasmazellen (Marschalko-Typ), welche sich ebenfalls deutlich erkennbar in der Färbung nach Giemsa darstellen lassen (Abb. 22).

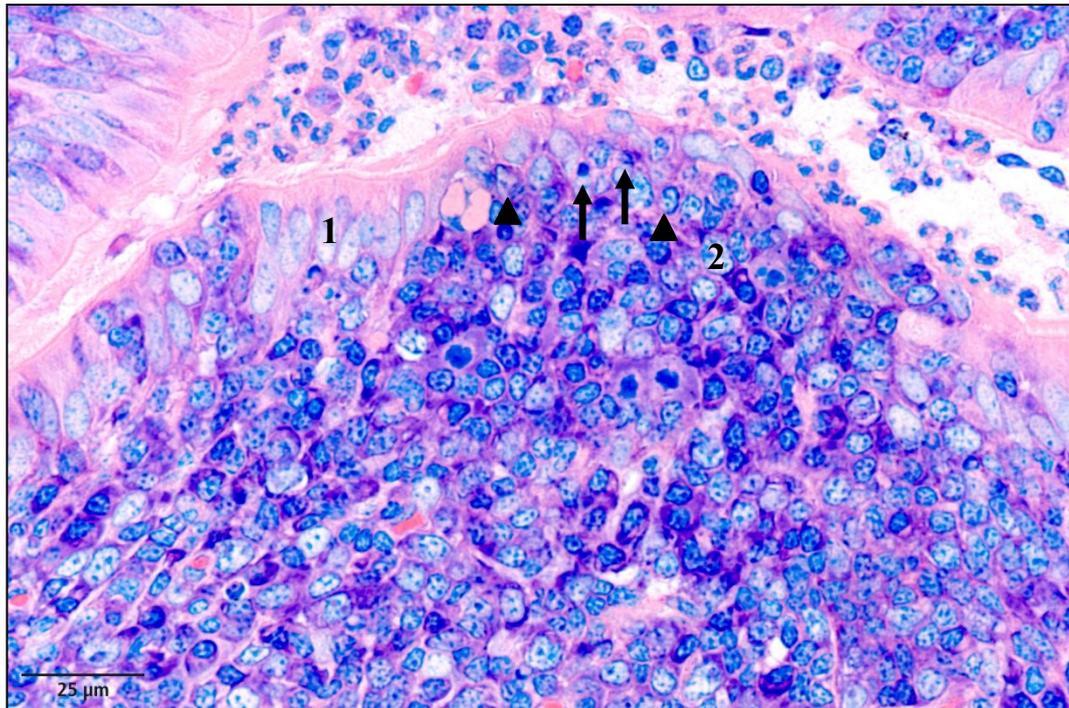


Abb. 21: Neben einem normalen Bronchiolusepithelzellverband (1) liegt ein lymphoepithelialer Schleimhautabschnitt (2), in dem freie Zellen hauptsächlich als Lymphozyten zu erkennen sind; es sind sowohl kleine Lymphozyten (Pfeile) als auch mittelgroße Lymphozyten (Pfeilköpfe) vertreten; Färbung nach Giemsa.

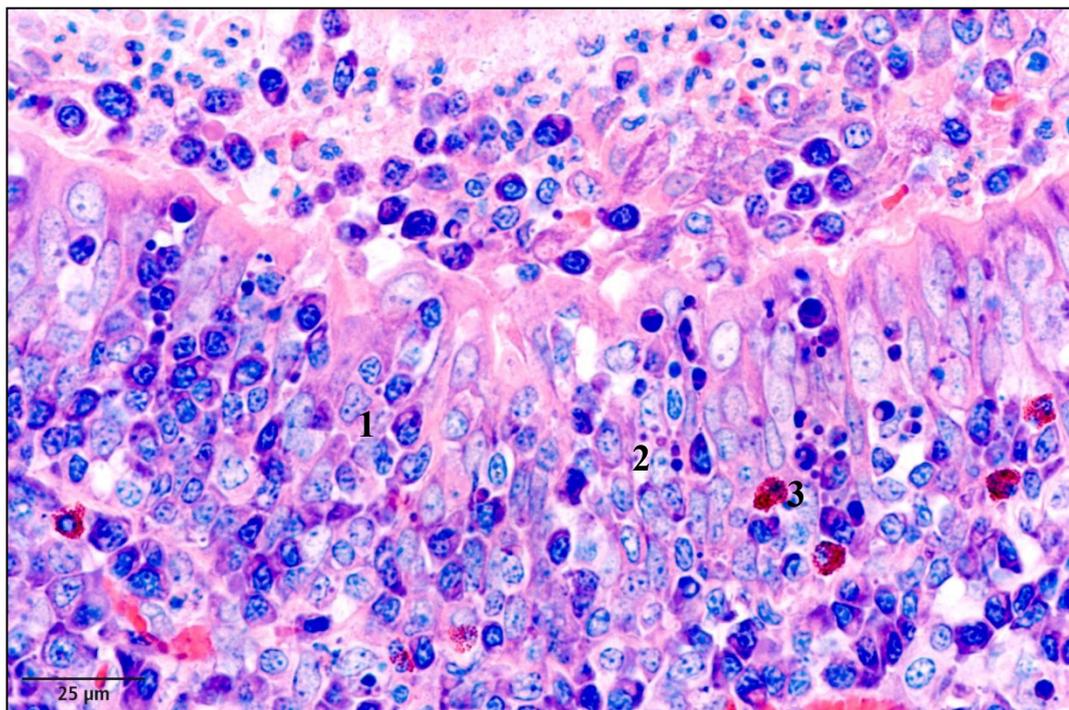


Abb. 22: Neben kleinen Lymphozyten finden sich in geringer Anzahl Plasmazellen im Lymphoepithel (1), außerdem neben intakten Lymphozyten auch zahlreiche Kerntrümmer (2) sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten (3); Färbung nach Giemsa.

Als freie Zellen des Lymphoepithels treten in Lungen mit katarrhalisch-eitriger Bronchopneumonie außerdem vereinzelt neutrophile und eosinophile Granulozyten auf (Abb. 22).

In der immunhistochemischen Differenzierung der intraepithelialen Lymphozyten zeigt sich, dass die überwiegende Mehrheit CD20-positive B-Lymphozyten darstellen (Abb. 23). Die CD3-positiven T-Lymphozyten treten hingegen in weit-aus geringerer Anzahl auf, welche nicht größer zu sein scheint als die im normalen Bronchiolusepithel (Abb. 24). Aufgrund der quantitativen Verteilung von B- und T-Lymphozyten kann das Lymphoepithel als B-Zellareal angesprochen werden.

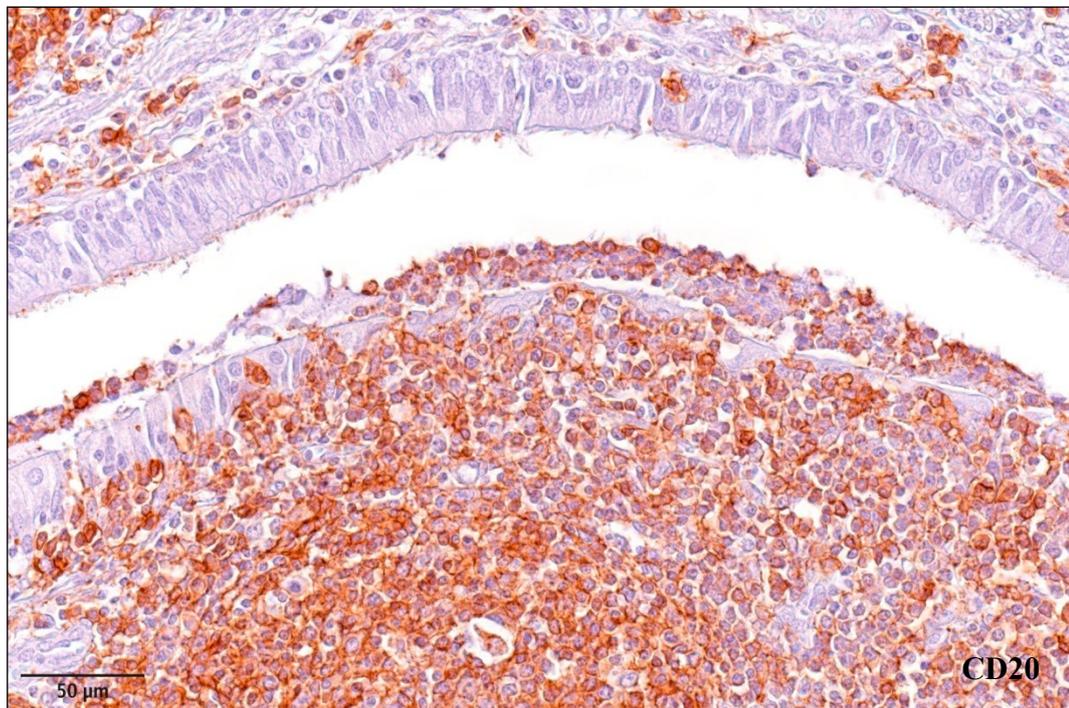


Abb. 23: Zahlreich liegen die CD20-positiven B-Lymphozyten zwischen den Epithelzellen des Lymphoepithels (unten), im normalen Epithel (oben) sind sehr vereinzelt positive Zellen zu finden; außerdem ist eine basale Begrenzung des Lymphoepithels, wie sie im normalen Epithel zu sehen ist, nicht erkennbar.

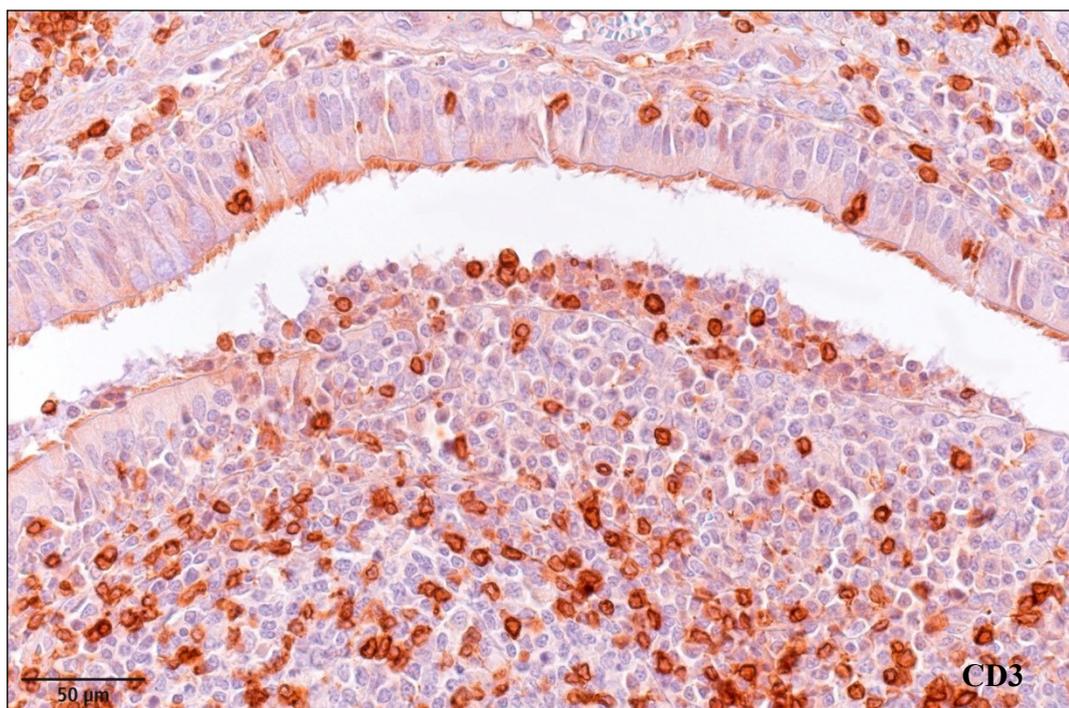


Abb. 24: Vereinzelt liegen die CD3-positiven T-Lymphozyten im Lymphoepithel (unten), auch zwischen den Zellen des normalen Epithels (oben) liegen vereinzelt CD3-positiv T-Lymphozyten, die Zelldichte scheint annähernd gleich.

3.1.2. Follikel-assoziierte Lamina propria

Der Abschnitt der *Lamina propria* eines Bronchiolus, der zwischen dem basal undeutlich abgegrenzten Lymphoepithel und dem dazugehörigen Follikel liegt, weist ebenfalls Veränderungen gegenüber einer normalen Lamina propria auf. Die Veränderungen sind wie beim Lymphoepithel nur in Verbindung mit einem Schleimhaut-assoziierten Follikel zu beobachten, sodass im Folgenden die Bezeichnung Follikel-assoziierte Lamina propria verwendet wird.

Die Follikel-assoziierte Lamina propria zeigt zumeist eine Verdickung gegenüber benachbarter normaler Lamina propria (Abb. 25). Sie scheint damit an der beetartigen Vorwölbung des Lymphoepithels in das Lumen beteiligt zu sein. Die Breite der Follikel-assoziierten Lamina propria entspricht weitestgehend der Breite des Lymphoepithels.

Bei Anbildung zahlreicher Follikel um den Bronchiolus herum nimmt also neben dem Anteil des Lymphoepithels auch der Anteil der Follikel-assoziierten Lamina propria im Querschnitt des Bronchiolus zu. Das Lumen des Bronchiolus ist dann zumeist hochgradig eingengt (Abb. 26).

In der Follikel-assoziierten Lamina propria stellen, wie im Lymphoepithel, die lymphatischen Zellen mit unterschiedlichen Reife- bzw. Aktivierungsstadien die überwiegende Mehrheit der freien Zellen dar (Abb. 27). Auch die immunhistochemische Darstellung zeigt, dass das Verhältnis von B- und T-Lymphozyten dem des Lymphoepithels entspricht. Zahlreich treten die CD20-positiven B-Lymphozyten auf, deutlich geringer ist der Anteil der T-Lymphozyten (Abb. 28).

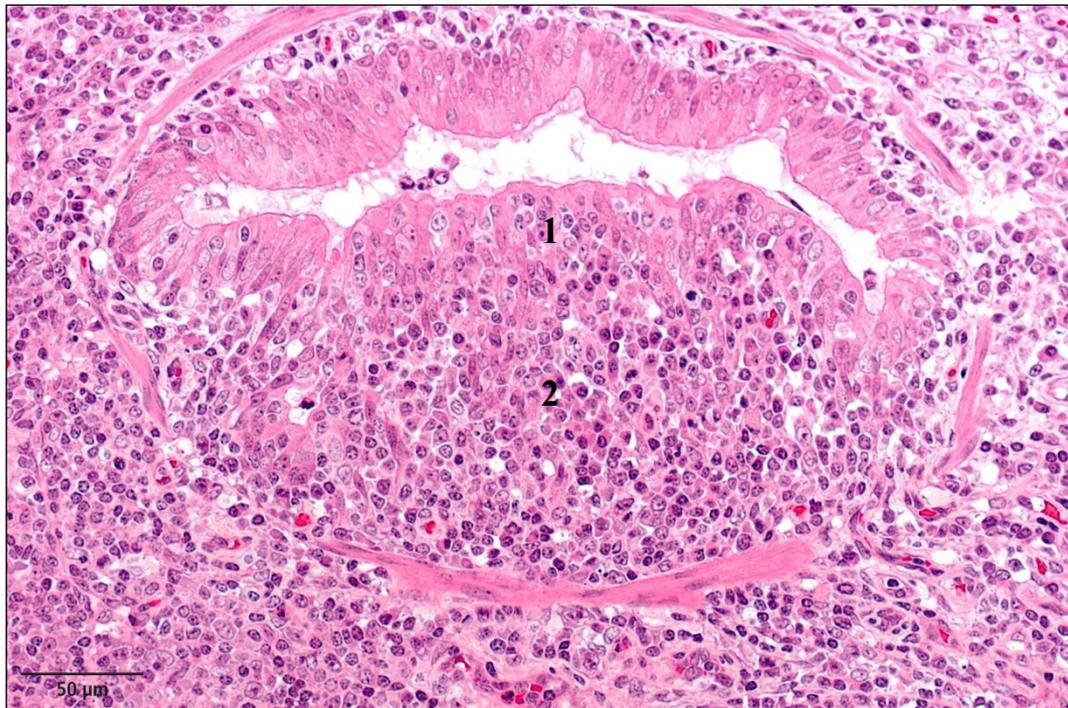


Abb. 25: An das basal undeutlich abgegrenzte Lymphoepithel (1) schließt sich die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) an, im Vergleich zur gegenüberliegenden normalen Lamina propria (oben) ist die Follikel-assoziierte Lamina propria verdickt und scheint zu der beetartigen Vorwölbung des Lymphoepithels in das Lumen beizutragen; HE-Färbung.

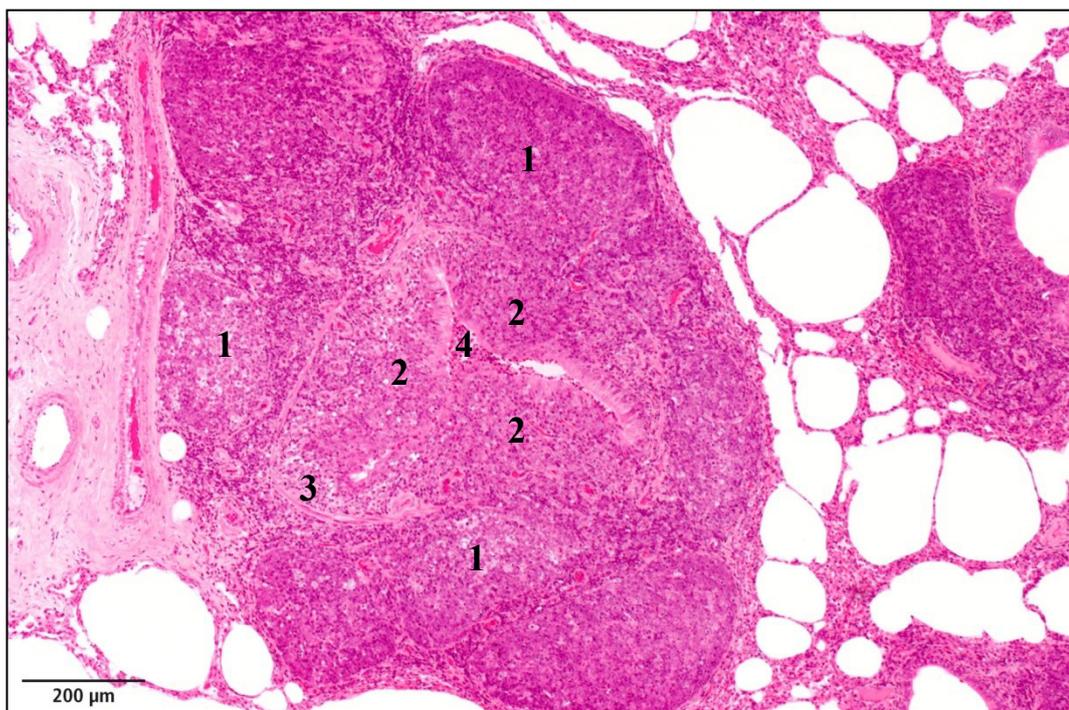


Abb. 26: Bei hochgradiger BALT-Anbildung mit mehreren Follikeln (1) überwiegt der Anteil der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) gegenüber normaler Lamina propria (3), das Lumen des Bronchiolus ist sichtlich eingengt und bei Vorliegen einer katarrhalisch-eitriger Bronchopneumonie außerdem mit eitrigem Schleim gefüllt (4); HE-Färbung.

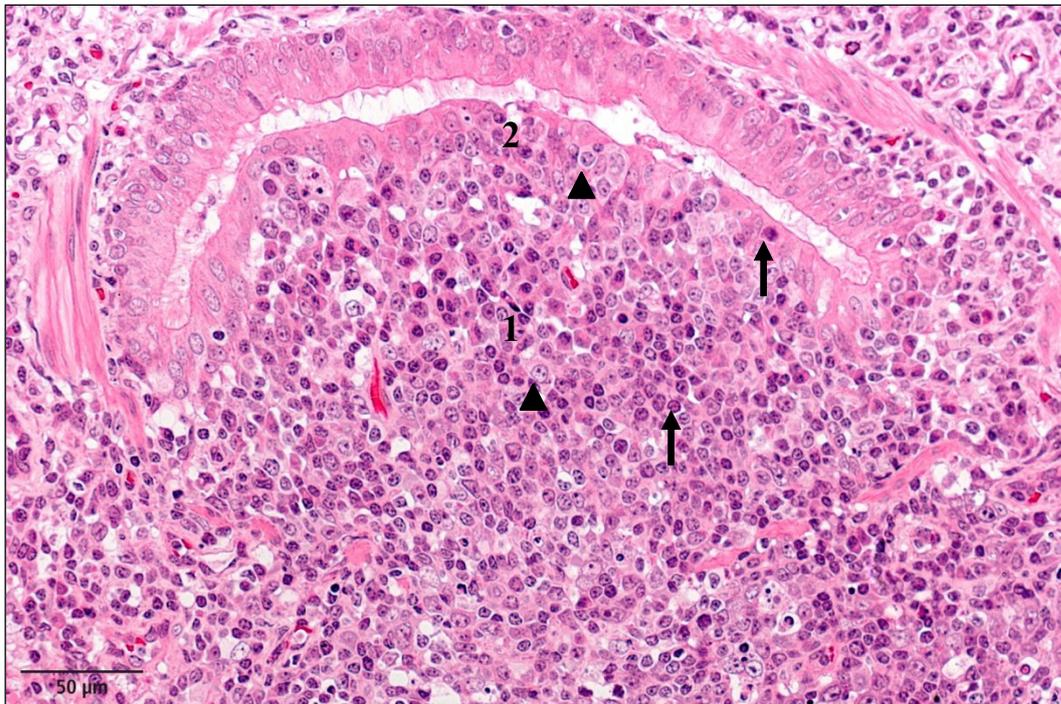


Abb. 27: Die Follikel-assoziierte Lamina propria (1) enthält wie das Lymphoepithel (2) zahlreiche Lymphozyten, es sind Lymphozyten mit einem kleinen dunklen Zellkern (Pfeile) und solche mit einem mittelgroßen Zellkern und deutlichem Nukleolus (Pfeilköpfe); HE-Färbung.

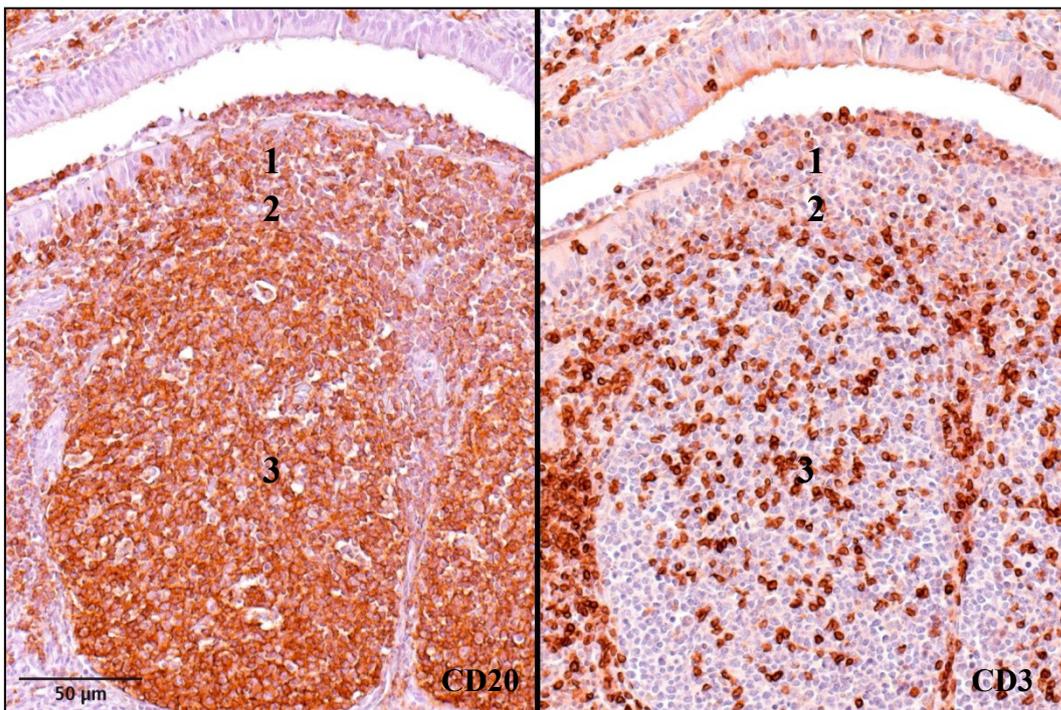


Abb. 28: In Lymphoepithel (1), Follikel-assoziiierter Lamina propria (2) und Follikel (3) sind in der immunhistochemischen Darstellung gleichermaßen zahlreiche CD20-positive B-Lymphozyten (links) und vereinzelt CD3-positive T-Lymphozyten vertreten (rechts).

Anhand der Zellzusammensetzung der B- und T-Lymphozyten allein ist eine morphologische Abgrenzung der Follikel-assoziierten Lamina propria sowohl zum Lymphoepithel, als auch zum Follikel kaum möglich (Abb. 28). Jedoch kann sie häufig bei mittelgradiger, mehr noch bei hochgradiger BALT-Anbildung anhand des Auftretens zahlreicher Plasmazellen deutlich von den anderen Komponenten unterschieden werden. Dass sie dann den Hauptsitz der Plasmazellen im BALT darstellt, wird in der Färbung nach Giemsa am deutlichsten (Abb. 29).

Die Verteilung der Plasmazellen in der Follikel-assoziierten Lamina propria kann durch die Lage des zugehörigen Follikels variieren. Wenn ein Follikel lumenwärts durch die Muskelschicht dringt, kommen die zwischen Lymphoepithel und Follikel liegenden Plasmazellen dichter zusammen und bilden einen schmalen Bogen (Abb. 29 und Abb. 30). Die Muskelschicht des Bronchiolus stellt also nicht immer die basale Begrenzung der typischen Plasmazellansammlung der Follikel-assoziierten Lamina propria des mittel- bis hochgradig angebildeten BALT dar.

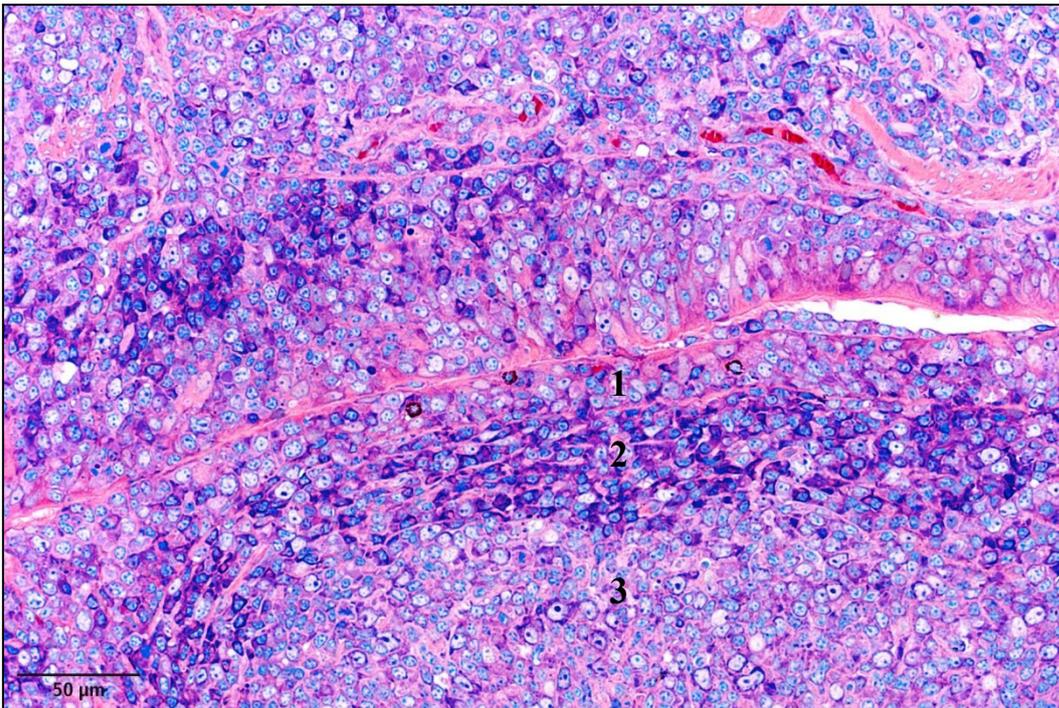


Abb. 29: Zwischen Lymphoepithel (1) und Follikel (3) ist die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) deutlich an den zahlreichen Plasmazellen mit ihrem dunkelblauen (stark basophilen) Zytoplasma zu erkennen; Färbung nach Giemsa.

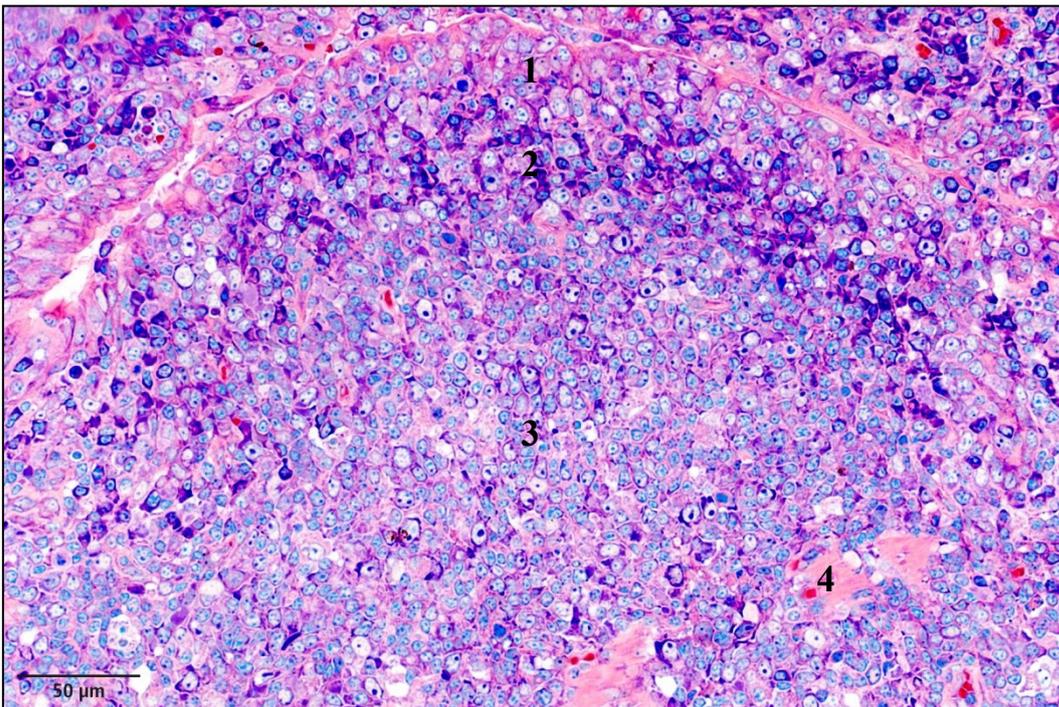


Abb. 30: Basal des Lymphoepithels (1) sind die Plasmazellen der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) zu einem Bogen verdichtet, der angrenzende Follikel (3) ist lumenwärts durch die Muskelschicht (4) hindurch gedrungen; Färbung nach Giemsa.

3.1.3. Follikel

An einem modifizierten Schleimhautabschnitt findet sich eine Ansammlung von lymphatischen Zellen, die sich im Verlauf der BALT-Anbildung zum Schleimhaut-assoziierten Follikel formiert. Das Auftreten von Lymphoepithel und Follikel-assoziiierter Lamina propria ist parallel mit der Formation des Follikels beobachtbar.

Ab mittelgradiger BALT-Anbildung stellt der Follikel die prominenteste Komponente des BALT dar. Das bedeutet, dass ein BALT in einer zufälligen histologischen Schnittebene am Bronchiolus oft nur anhand der alleinig angeschnittenen follikulären Komponente zu erkennen ist (Abb. 31), obwohl andere Komponenten wie das Lymphoepithel bei einer Schnittebene durch alle Komponenten des BALT bereits ab geringgradiger BALT-Anbildung mit undeutlicher Follikelformation beobachtet werden können (Abb. 32). Dem Schleimhaut-assoziiert liegenden Follikel können bei höhergradiger BALT-Anbildung auch weitere Follikel ohne direkten Schleimhautkontakt benachbart sein (Abb. 31).

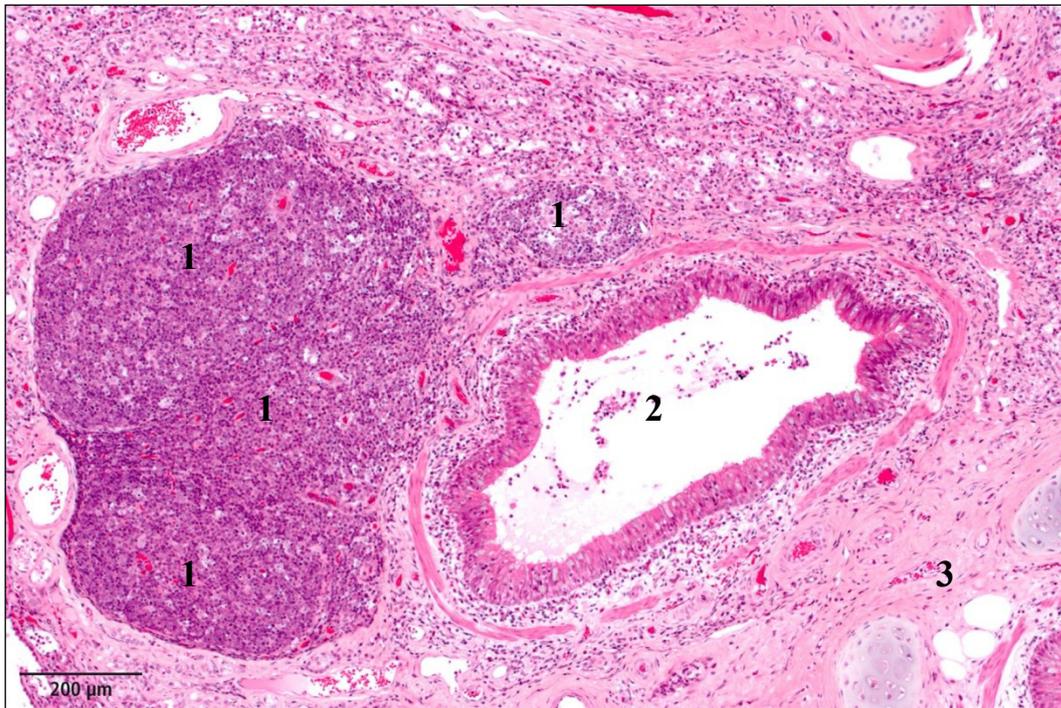


Abb. 31: Ein oder mehrere Follikel (1) sind des Öfteren die einzige Komponente des BALT, die in einem histologischen Zufallsschnitt eines Lungengewebes mit BALT-Anbildung erkennbar wird; eine Follikel-assoziierte Lamina propria oder ein Lymphoepithel sind nicht zu sehen; im Bild ist außer dem Bronchiolus (2) ein benachbartes Peribronchium mit Knorpel eines Bronchus abgebildet (3); HE-Färbung.

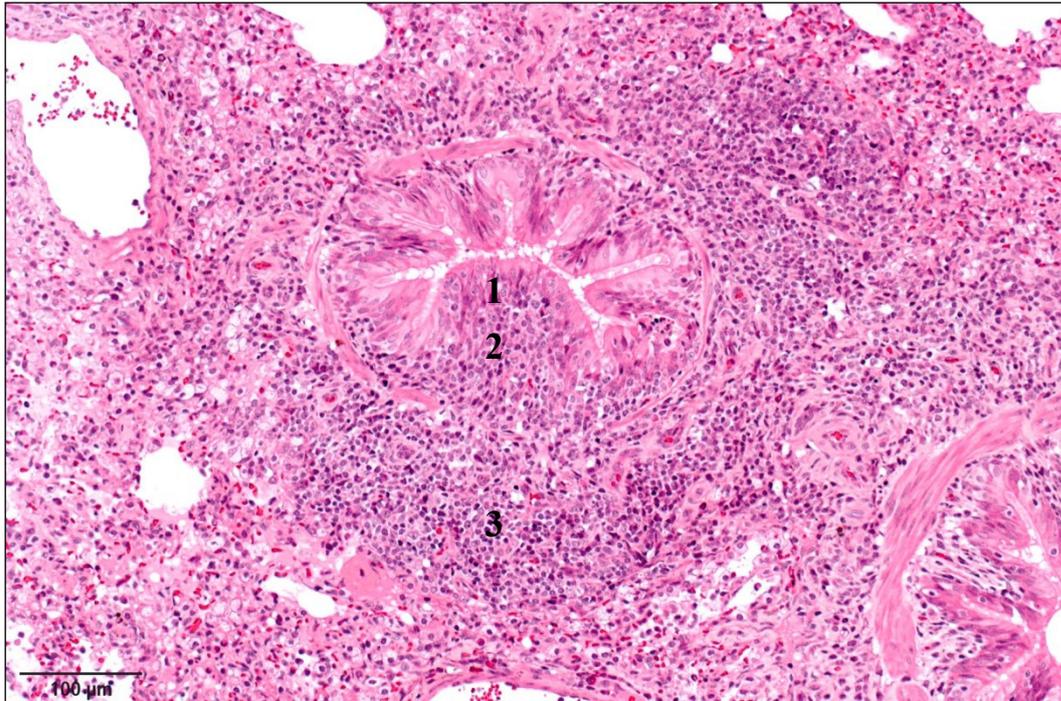


Abb. 32: Das Lymphoepithel (1) sowie die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) sind auch bei noch undeutlicher Follikelformation (3) der geringgradigen BALT-Anbildung schon sicher zu erkennen, jedoch sind die drei Komponenten weniger häufig gemeinsam angeschnitten; HE-Färbung.

In einer Schnittebene ohne Lymphoepithel und Follikel-assoziierte Lamina propria kann es bei geringgradiger BALT-Anbildung dann mitunter schwer fallen, eine peribronchioläre Lymphozytenansammlung als eine frühe Follikelanbildung im Sinne eines BALT zu interpretieren. Im Rahmen der interstitiellen Pneumonie können zahlreiche Lymphozyten nicht nur die Alveolarsepten sondern auch das gesamte Peribronchium bzw. Peribronchiolum infiltrieren. Hilfreich bei der Unterscheidung zwischen einer bloßen Lymphozytenansammlung am Bronchiolus und einer beginnenden Follikelanbildung eines BALT kann ein benachbartes Blut- oder Lymphgefäß sein (Abb. 33). Denn mindestens eines der beiden Gefäße kann in der Regel auch basal und seitlich eines deutlich angebildeten Follikels des BALT beobachtet werden (Abb. 34).

Ab mittelgradiger BALT-Anbildung zeigt der Follikel meistens eine typische schalenartige zelluläre Organisation: Innen liegt ein rund-ovales helleres Keimzentrum, drumherum bildet sich eine dunklere halbmondförmige Mantelzone (Abb. 35).

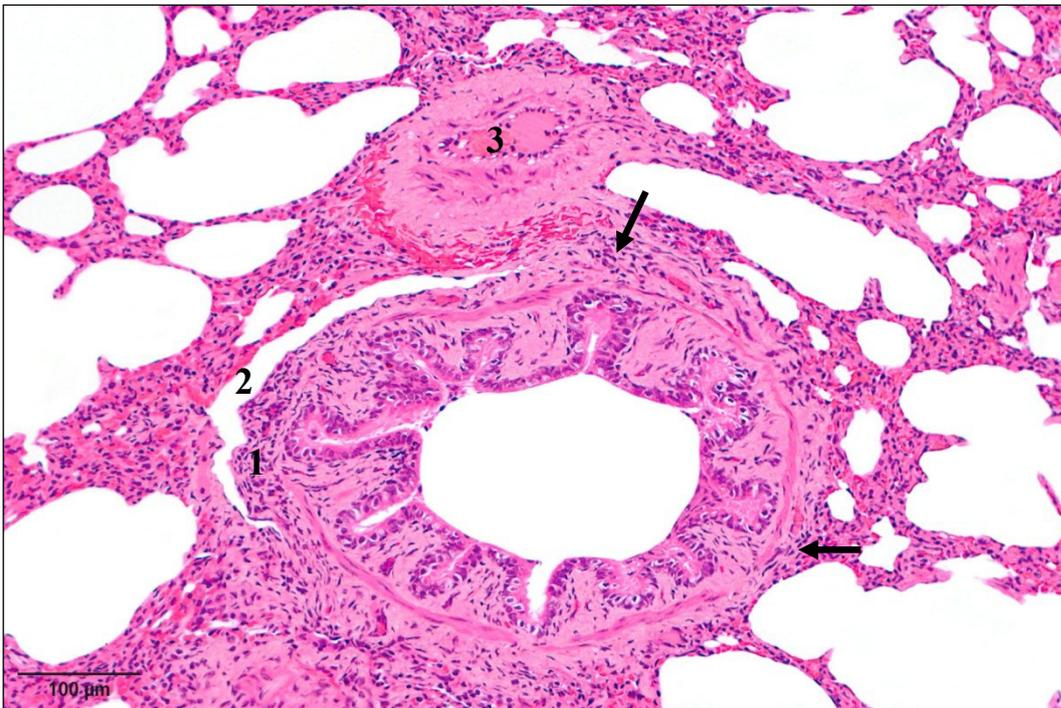


Abb. 33: Das Peribronchiolum ist multifokal mit Lymphozyten infiltriert (Pfeile). Eine Lymphozytenansammlung (1) ist einer von Endothel ausgekleideten Lymphgefäßspalte benachbart (2), in unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich auch ein Blutgefäß (3); HE-Färbung.

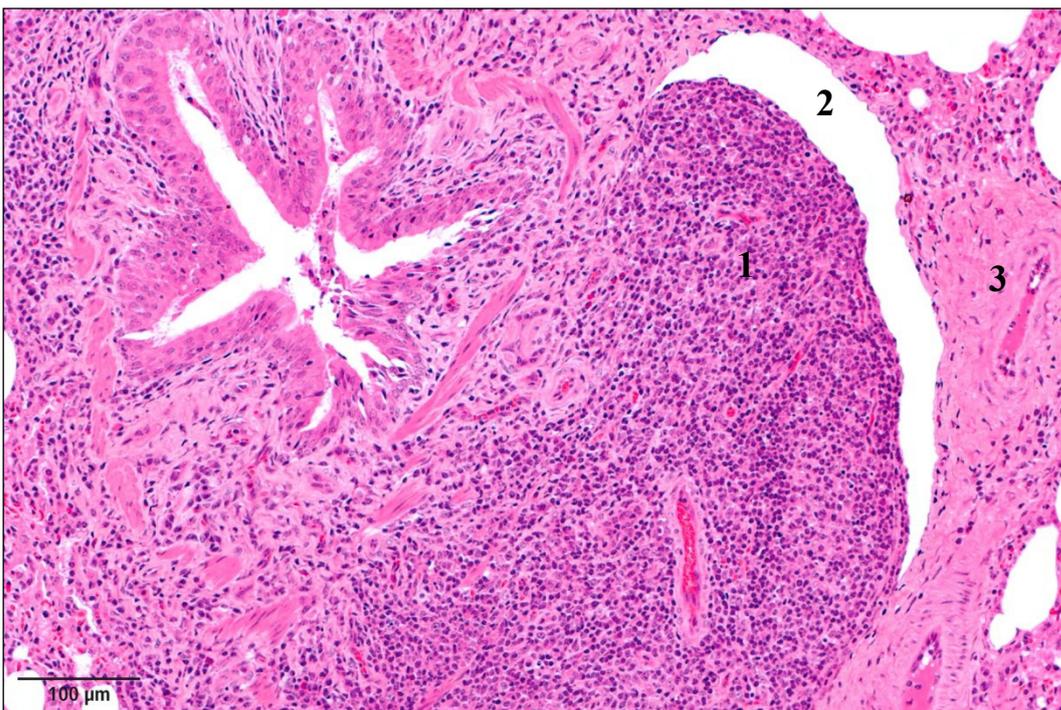


Abb. 34: Basal und seitlich des deutlich abgebildeten Follikels (1) ist meistens mindestens ein benachbartes Gefäß angeschnitten, das kann ein Lymphgefäß (2) und / oder Blutgefäß sein (3); HE-Färbung.

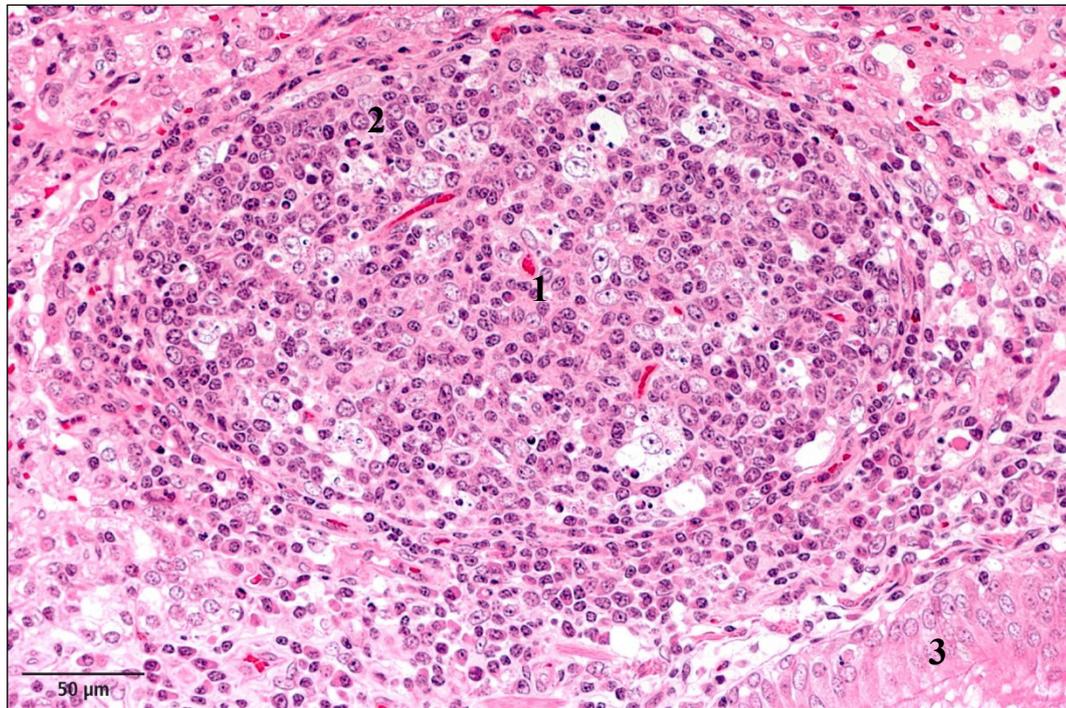


Abb. 35: Der Follikel zeigt ab mittelgradiger BALT-Anbildung im Inneren ein helles Keimzentrum (1), außen eine dunklere halbmondförmige Mantelzone (2), die abgewandt vom Bronchiolusepithel liegt (3); HE-Färbung.

Noch deutlicher werden die beiden Bereiche durch die Darstellung der im Follikel vorkommenden Zellgruppen mittels Färbung nach Giemsa (Abb. 36).

Das hellere Keimzentrum ist durch eine lockere Zellzusammensetzung mit überwiegend großen lymphatischen Zellen geprägt. Lichtmikroskopisch kann man in der Färbung nach Giemsa Zellen mit wenig, aber dunkelblauem (stark basophilem) Zytoplasma und unterschiedlich großem rundem Zellkern erkennen (Zentroblasten). Ebenfalls sind Zellen mit einem schwach bläulichen (schwach basophilem) Zytoplasma und eingekerbten Zellkern (Zentrozyten) zu finden (Abb. 37).

In der dicht gepackten Mantelzone finden sich überwiegend kleine Lymphozyten mit einem heterochromatinreichen Zellkern und mittelgroße Lymphozyten mit einem Zellkern, dessen Nukleolus deutlicher zu erkennen ist (Abb. 37). In der Mantelzone treten selten auch reife Plasmazellen auf.

Mittels der immunhistochemischen Differenzierung der lymphatischen Zellen bestätigt sich der Follikel als CD20-positives B-Zellareal. CD3-positive T-Lymphozyten kommen hingegen in geringer Zahl vor und sind eher in der lumennahen Follikelhälfte zu finden, sodass in der halbmondförmigen Mantelzone keine T-Lymphozyten nachweisbar sind (Abb. 38).

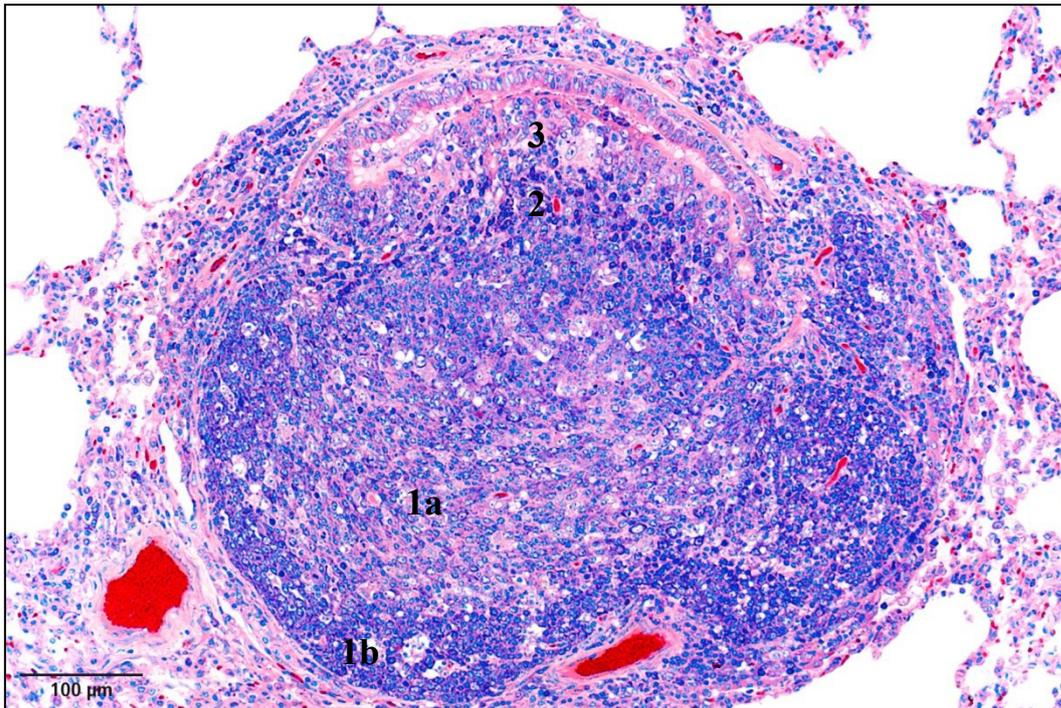


Abb. 36: Der reaktive Follikel im BALT zeigt ein deutliches rund-ovales Keimzentrum (1a), basal umgeben von einer dunklen halbmondförmigen Mantelzone (1b); lumenwärts liegen das Plasmazellband der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) und das Lymphoepithel (3); Färbung nach Giemsa.

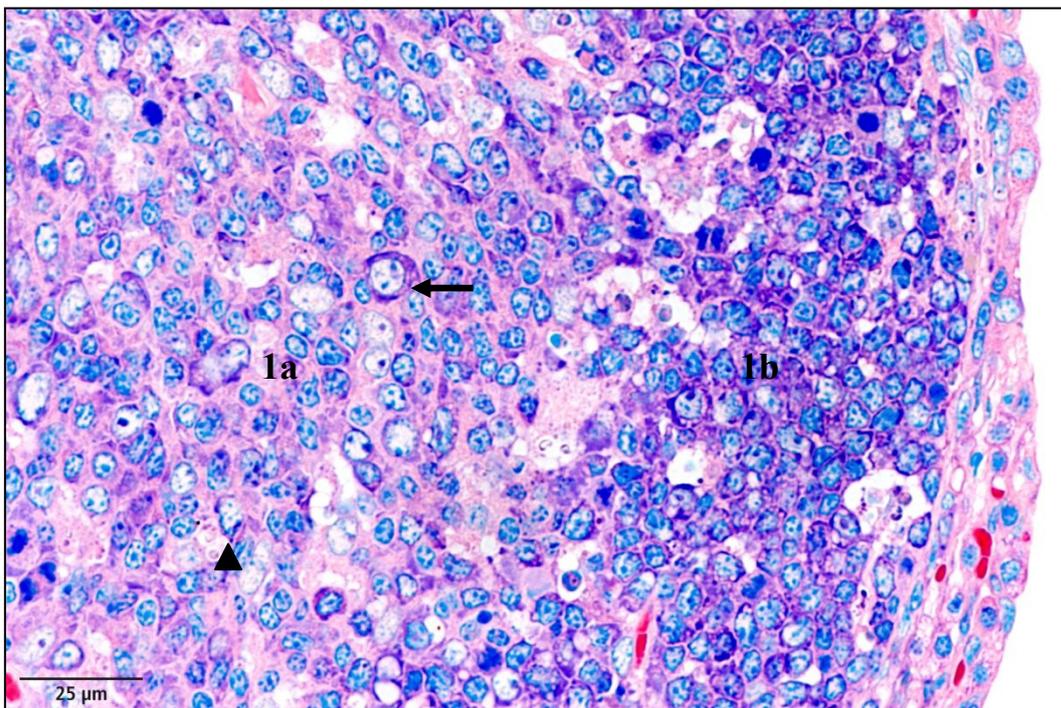


Abb. 37: Im hellen Keimzentrum (1a) kommen überwiegend große lymphatische Zellen vor, es sind Zentroblasten (Pfeil) und Zentrozyten (Pfeilkopf) zu erkennen; in der dunklen Mantelzone hingegen sind vor allem kleine und mittelgroße Lymphozyten zu sehen; Färbung nach Giemsa.

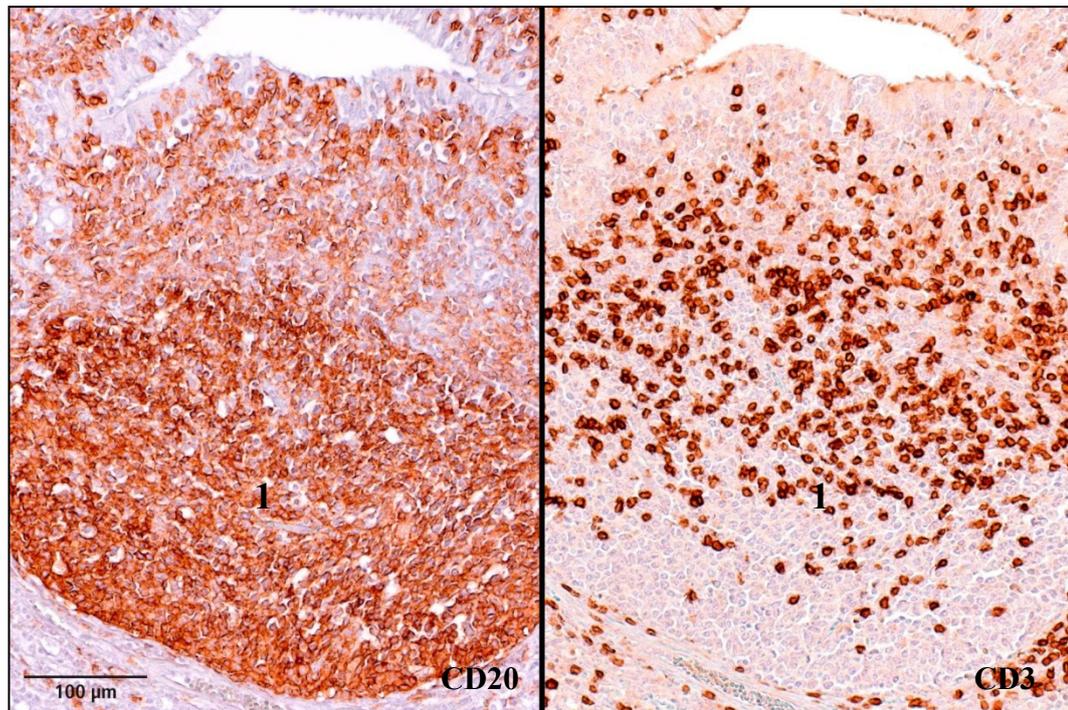


Abb. 38: Immunhistochemisch betrachtet ist der Follikel (1) ein CD20-positives B-Zellareal (links), gering fällt der Anteil an CD3-positiven T-Lymphozyten im Follikel aus (rechts); die meisten T-Lymphozyten sind in der Hälfte des Follikels zu sehen, die näher am Lumen liegt.

Sowohl im Keimzentrum als auch in der Mantelzone kann man regelmäßig die auffälligen Sternhimmel-Makrophagen (Histiozytäre Retikulumzellen) finden, die phagozytierte Reste von apoptotisch untergegangenen Zellen enthalten (Abb. 39).

Zusätzlich können neben den oben beschriebenen, im Follikel vorkommenden Zellpopulationen Vimentin-positive Zellen beobachtet werden. Der überwiegende Anteil der Zellen bildet ein maschenwerkartiges Netz (Abb. 40). Vereinzelt Zellen ähneln aber auch einer vielfach verzweigten Zellgestalt, die mit schlanken Fortsätzen die anderen negativen lymphatischen Zellen umgibt.

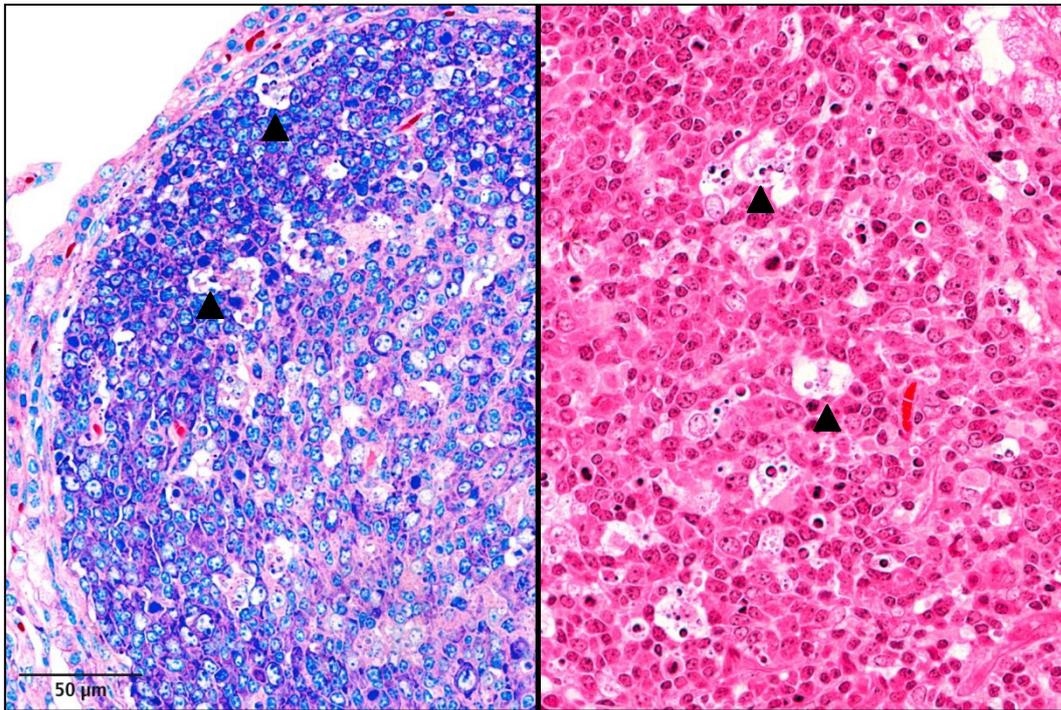


Abb. 39: In den Übersichtsfärbungen Giemsa und HE fallen im Follikel besonders die Sternhimmel-Makrophagen durch ihre großen Vakuolen und darin enthaltenem phagozytierten Material auf (Pfeilköpfe).

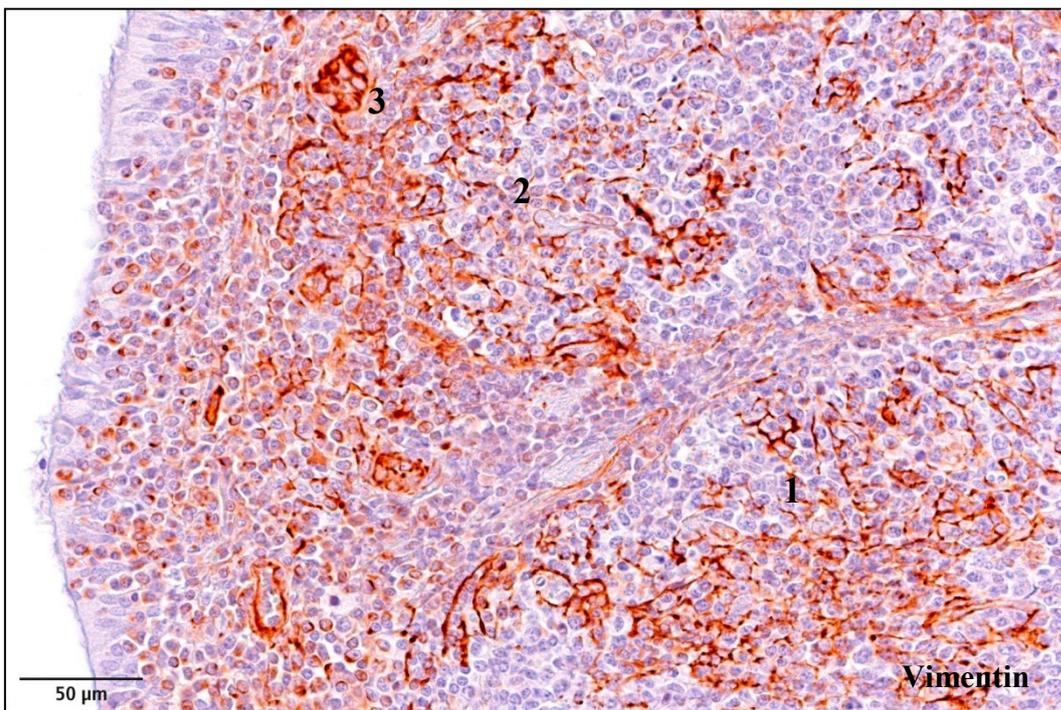


Abb. 40: In der immunhistochemischen Darstellung von Vimentin reagieren im Follikel vor allem Zellelemente, die wie ein Maschenwerk zwischen den Zellkernen Vimentin-negativer Zellen liegen (1); im benachbarten T-Zellareal ist ein ähnliches positives Muster zu sehen (2), außerdem reagiert ein Gefäß mit ins Lumen ragenden Endothelzellkernen positiv (3).

Eine bindegewebige Begrenzung des Follikels bzw. des BALT in Form einer Kapsel ist nicht erkennbar. Bei der immunhistochemischen Darstellung mittels Zytokeratin wird als natürliche Begrenzung des Follikels ein epithelialer Zelltyp nachgewiesen (Abb. 41).

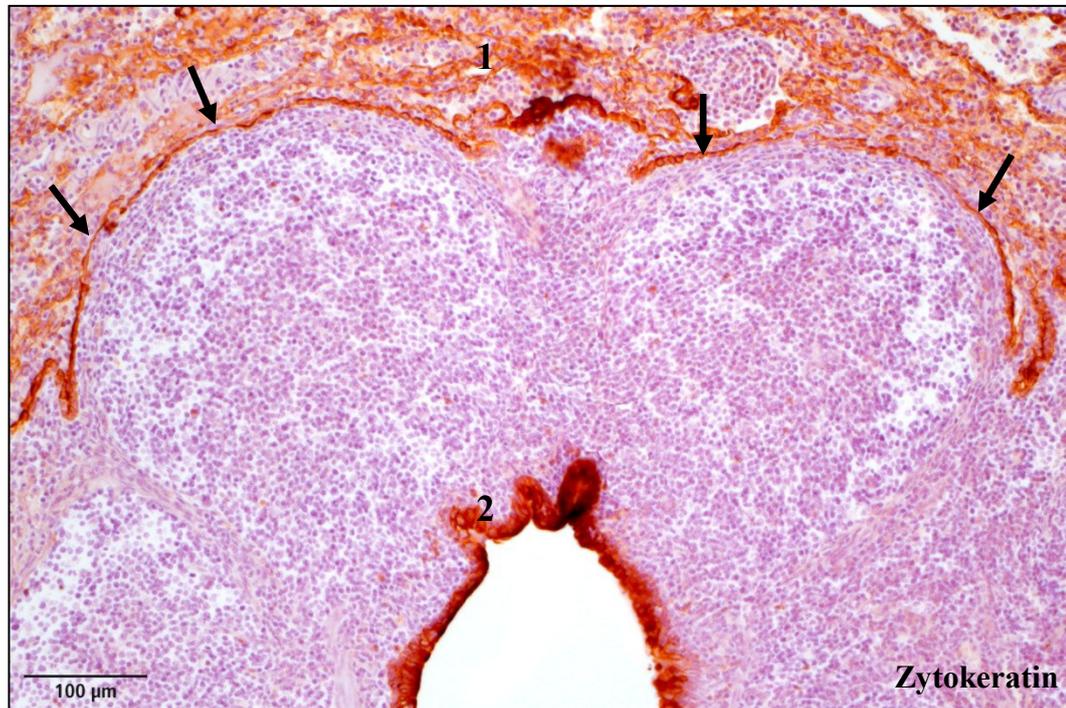


Abb. 41: Die natürliche Begrenzung des BALT bzw. des Follikels (Pfeile) ist ebenso Zytokeratin-positiv wie das Alveolarepithel (1) und das Lymphoepithel (2).

3.1.4. T-Zellareal

Ab der mittelgradigen BALT-Anbildung kann neben dem dann deutlich erkennbaren Follikel außerhalb der Muskelschicht des Bronchiolus ein weiteres Zellareal von lymphatischen Zellen beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Zellareal weitaus unregelmäßigere Formen als andere Zellbereiche des BALT bildet, kann es in der Übersichtsfärbung HE nur schwer als eine weitere Komponente des BALT wahrgenommen werden. Am sichersten ist dieses Zellareal bei hochgradiger BALT-Anbildung in interfollikulären Bereichen abgrenzbar (Abb. 42). Aber auch bei weniger angebildeten Follikeln am Bronchiolus kann das Areal in der Übersichtsfärbung HE verdachtsweise angesprochen werden, es liegt außerhalb der Muskelschicht und dann zumeist parafollikulär (Abb. 43). Ist es beiderseits eines Follikels zu sehen, können beide Zellareale basal um den Follikel herum durch einen schmalen Saum von Lymphozyten verbunden sein (Abb. 43).

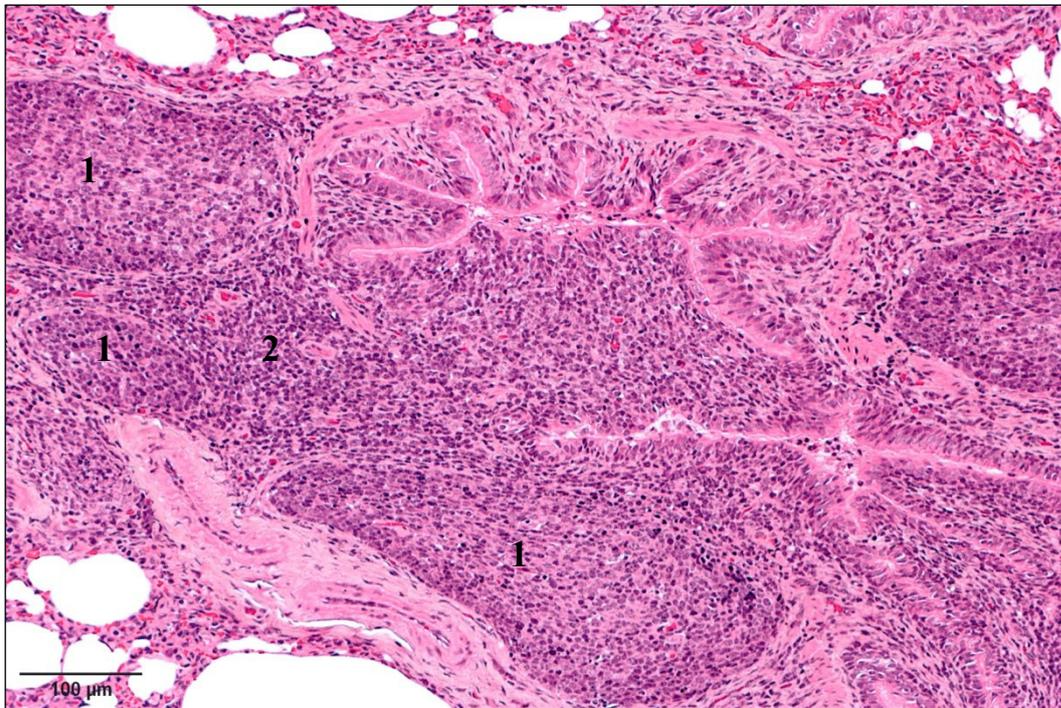


Abb. 42: Zwischen mehreren Follikeln mit hellerem Zentrum (1) kann man ein Areal erkennen (2), das aus gleichförmigen, kleinen Lymphozyten aufgebaut ist; es kann in dieser Lage als ein interfollikuläres Zellareal angesprochen werden; HE-Färbung.

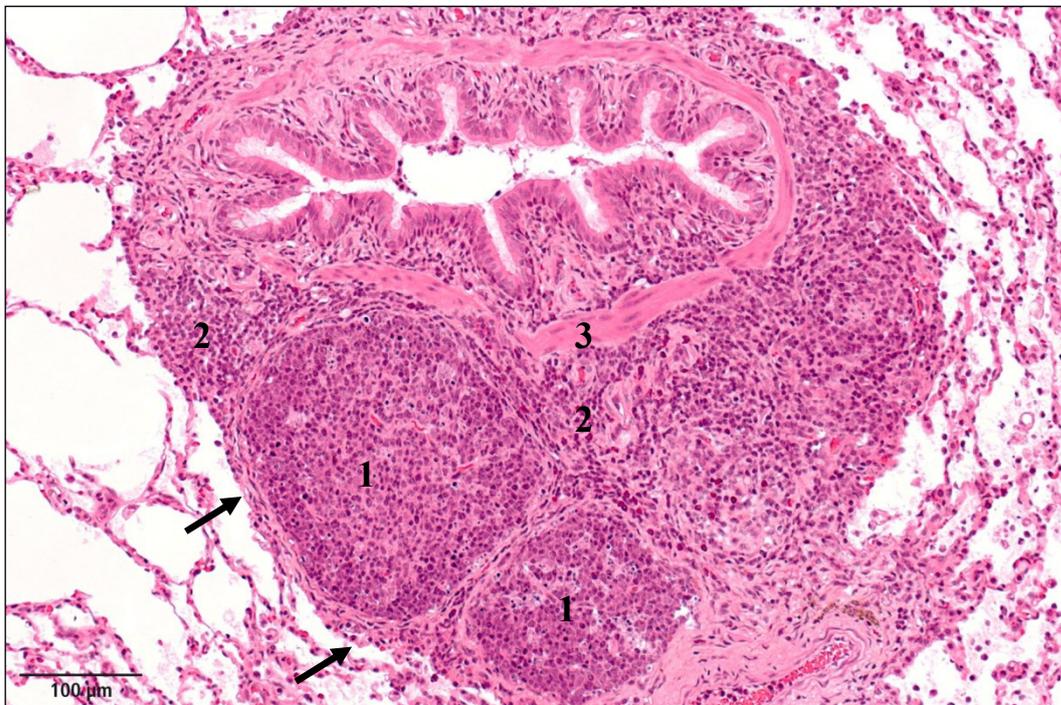


Abb. 43: Am Bronchiolus sind vereinzelt deutliche Follikel angebildet (1), darüber hinaus kann man weitere lymphatische Zellareale (2) außerhalb der Muskelschicht (3) in parafollikulärer Lage erkennen; die beiden parafollikulären Zellareale sind basal um den Follikel herum durch einen schmalen Saum von Lymphozyten verbunden (Pfeile); HE-Färbung.

Mit der immunhistochemischen Darstellung von CD3 stellt sich heraus, dass die inter- und parafollikulären lymphatischen Zellansammlungen des Öfteren ab mittelgradiger und stets bei hochgradiger BALT-Anbildung deutlich als T-Zellareal angesprochen werden können. Die Mehrheit der CD3-positiven T-Lymphozyten liegt dann in dem in der HE-Färbung beobachteten Zellareal, dem Follikel benachbart und außerhalb der bronchiolären Muskelschicht (Abb. 44).

Bei den lymphatischen Zellen des T-Zellareals handelt es sich in der Färbung nach Giemsa um Lymphozyten mit kleinen und mittelgroßen, zumeist runden Zellkernen (Abb. 45). Vereinzelt können auch reife Plasmazellen in diesem Bereich auftreten.

In Lungen mit katarrhalisch-eitriger Bronchopneumonie sind gelegentlich auch neutrophile und eosinophile Granulozyten in moderater Anzahl im T-Zellareal vertreten.

Mittels immunhistochemischer Darstellung von Vimentin fallen im T-Zellareal vor allem positiv reagierende Endothelzellen von Gefäßen auf, deren Zellkerne prominent in das Gefäßlumen ragen (hochendothelisierte Venolen, HEV) (Abb. 46). Sie können im deutlich angebildeten T-Zellareal regelmäßig beobachtet werden.

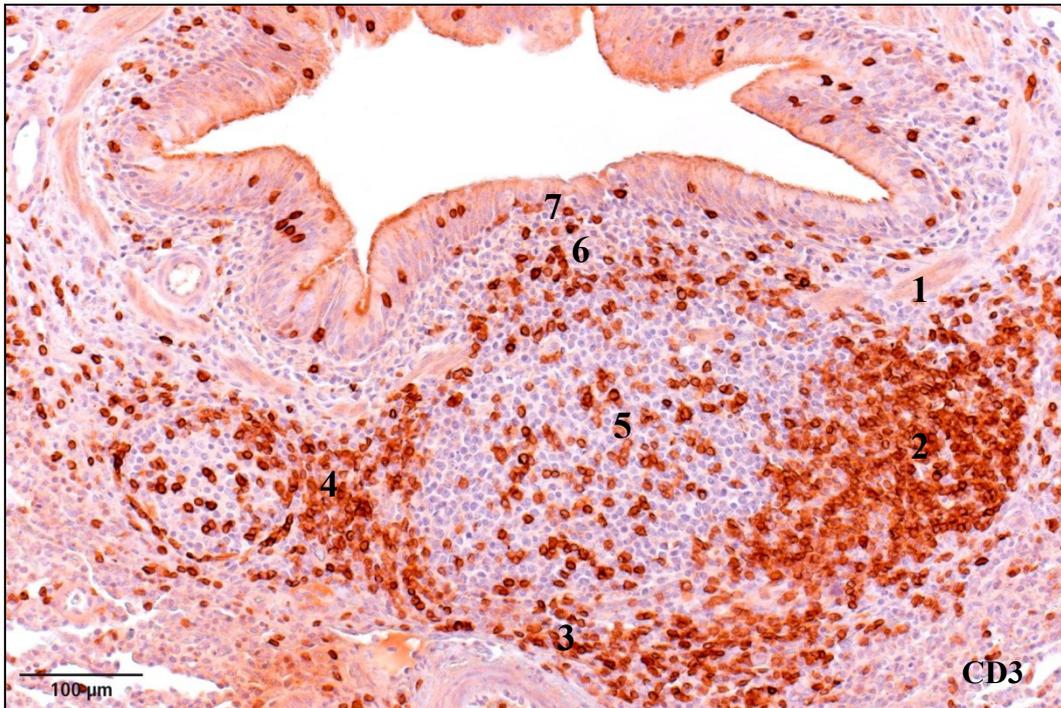


Abb. 44: Die meisten CD3-positiven Zellen sind außerhalb der Muskelschicht (1) und neben dem Follikel (2) zu finden und können als T-Zellareal parafollikulärer Ausprägung angesprochen werden; basal um den Follikel ist eine CD3-positive Saumbildung (3) zum linksseitigen T-Zellareal zu erkennen, welches durch einen weiteren benachbarten Follikel ein interfollikuläres T-Zellareal darstellt (4); nur vereinzelt sind weitere CD3-positiv Zellen im Follikel (5), in der Follikel-assoziierten Lamina propria (6) und dem Lymphoepithel (7) zu erkennen.

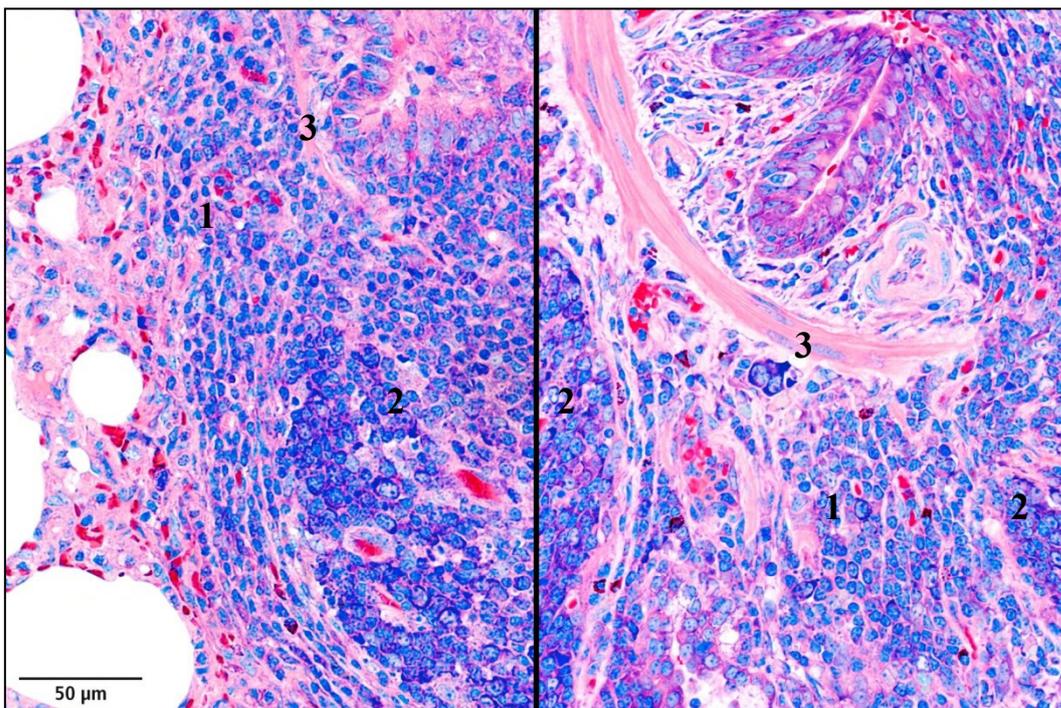


Abb. 45: In der Färbung nach Giemsa kann das T-Zellareal anhand kleiner und mittelgroßer Lymphozyten (1) neben einem Follikel (2) außerhalb der Muskelschicht (3) angesprochen werden; das T-Zellareal kann sich parafollikulär (links) und interfollikulär (rechts) zeigen.

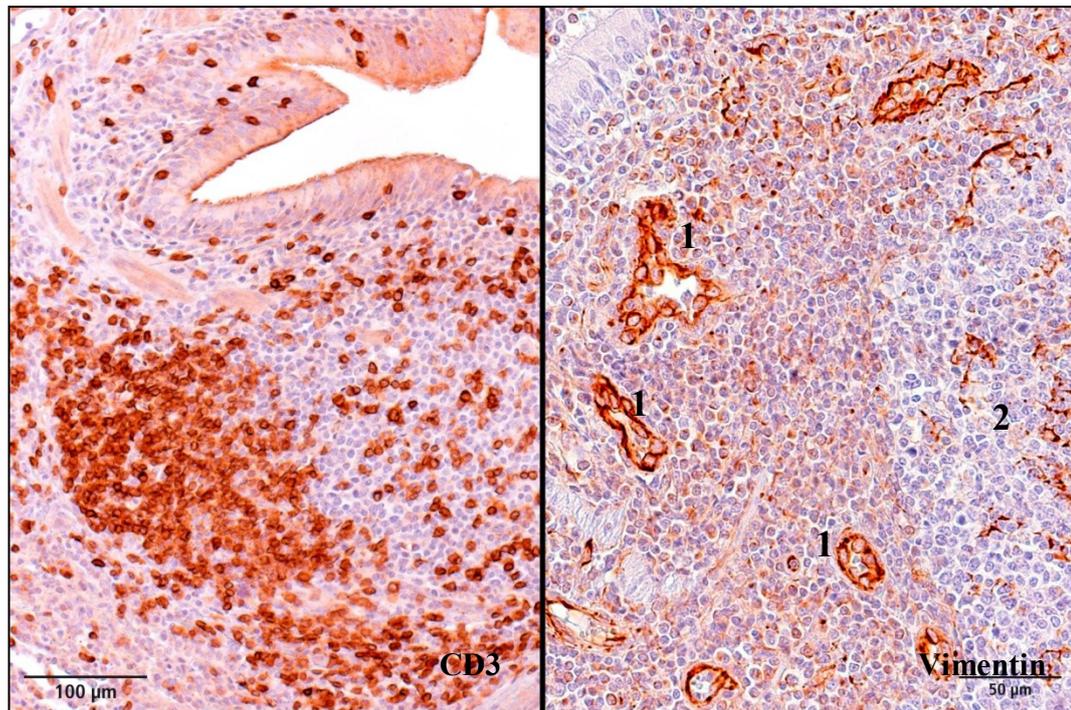


Abb. 46: Im CD3-positiven T-Zellareal (links) sind in der Vimentin-Darstellung (rechts) hochendothelisierte Venolen (HEV) zu finden (1), der Follikel (2) hingegen ist frei von solchen Venolen.

3.1.5. Ausprägung der Komponenten des BALT des Schweines in den verschiedenen BALT-Anbildungsgraden

Alle dargestellten Komponenten eines vollständig angebildeten BALT des Schweines (siehe Kapitel IV.3.1.1 bis IV.3.1.4) weisen unterschiedliche Merkmalsausprägungen auf, die in den jeweilig beobachteten Anbildungsvorstufen tabellarisch zusammengefasst werden (Tab. 8).

Tab. 8: Die beobachteten Merkmale der vier Komponenten des BALT (Lymphoepithel, Follikel-assoziierte Lamina propria, Follikel, T-Zellareal mit HEV) in den verschiedenen Anbildungsgraden. Die aufgeführten Anbildungsgrade entsprechen den definierten Graden der Tab. 7. Für die Beurteilung der Komponenten wurde eine BALT-Anbildung nur ausgewählt, wenn Lymphozyteninfiltrate mindestens in den Komponenten Follikel, Follikel-assoziiierter Lamina propria und Lymphoepithel zu sehen waren. + = Komponentenmerkmal ausgeprägt, - = Komponentenmerkmal nicht ausgeprägt, +/- = Komponentenmerkmal sowohl ausgeprägt als auch nicht ausgeprägt beobachtet. Ep. Modifikation = Epitheliale Modifikation, Lz. Infiltration = Lymphozytäre Infiltration, Follikel-ass. L. propria = Follikel-assoziierte Lamina propria, HEV = hochendothelisierte Venole.

BALT-Anbildungsgrad am Bronchiolus	Lymphoepithel		Follikel-ass. L. propria		Follikel		T-Zellareal mit HEV
	Ep. Modifikation	Lz. Infiltration	Lz. Infiltration	Plasmazellband	Follikelformation	Keimzentrum	
geringgradig (Follikelformation) 46 Tiere, 104 Lokalisationen	+/-	+	+	-	+	-	-
mittelgradig (1 - 2 Follikel) 39 Tiere, 64 Lokalisationen	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-
hochgradig (> 2 Follikel) 13 Tiere, 15 Lokalisationen	+	+	+	+	+	+	+

3.2. Histologie des Ektopischen lymphatischen Gewebes (ELG)

Bei der Untersuchung des BALT fällt in den EP-typischen Lungen ein weiteres lymphatisches Gewebe auf, das aufgrund seiner schleimhautunabhängigen Lage vom Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) abgegrenzt werden muss. Es handelt sich dabei um ein sogenanntes Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG).

In 16 der insgesamt untersuchten 47 Lungen (34%) kann ein ELG nachgewiesen werden. Bezogen auf die 4 untersuchten Lokalisationen der Lungen sind in den 16 Lungen 21 von 64 Lokalisationen (33%) betroffen. Die Verteilung der Lokalisationen mit ELG-Anbildung liegt mit 10 von 21 Lokalisationen (47,5%) bei Lokalisation 1 (*Lobus cranialis sinister*), mit 9 von 21 Lokalisationen (43%) bei Lokalisation 2 (*Lobus medius*) und mit 2 von 21 Lokalisationen (9,5%) bei Lokalisation 3 (*Lobus caudalis sinister*). Die 4. Lokalisation (*Lobus caudalis dexter*) ist frei von ELG.

Das ELG besteht aus fokalen Ansammlungen von Lymphozyten mit erkennbarer Follikelformation (Abb. 47) bis hin zur Ausbildung von typischen Sekundärfollikeln mit einem helleren Keimzentrum (Abb. 48). Es wird fern von bronchialer und bronchiolärer Schleimhaut beobachtet. Es liegt immer in der Nachbarschaft von Lymphgefäßen, also insbesondere subpleural (Abb. 47) und septal (Abb. 48).

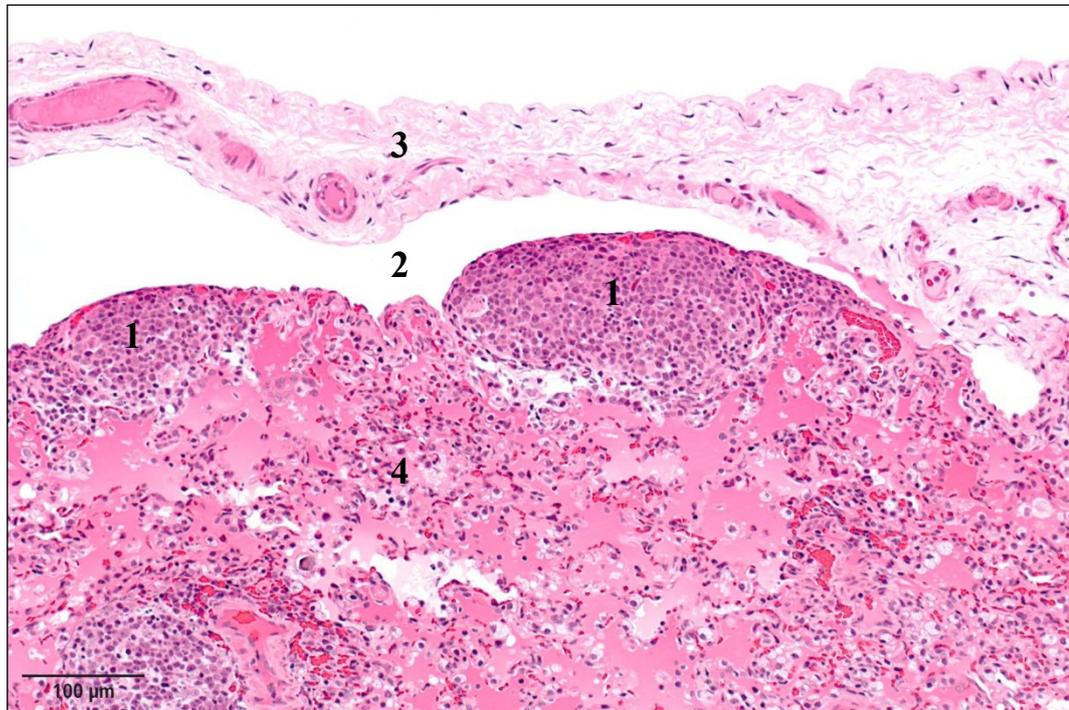


Abb. 47: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); zwei Follikelformationen (1) wölben sich in einen Lymphgefäßspalt (2) unter der Pleura (3), es handelt sich um das subpleural gelegene ELG; ein Bezug der Follikel zu Atemwegen ist nicht erkennbar, sie grenzen direkt an ödematisiertes Alveolargewebe (4), HE-Färbung.

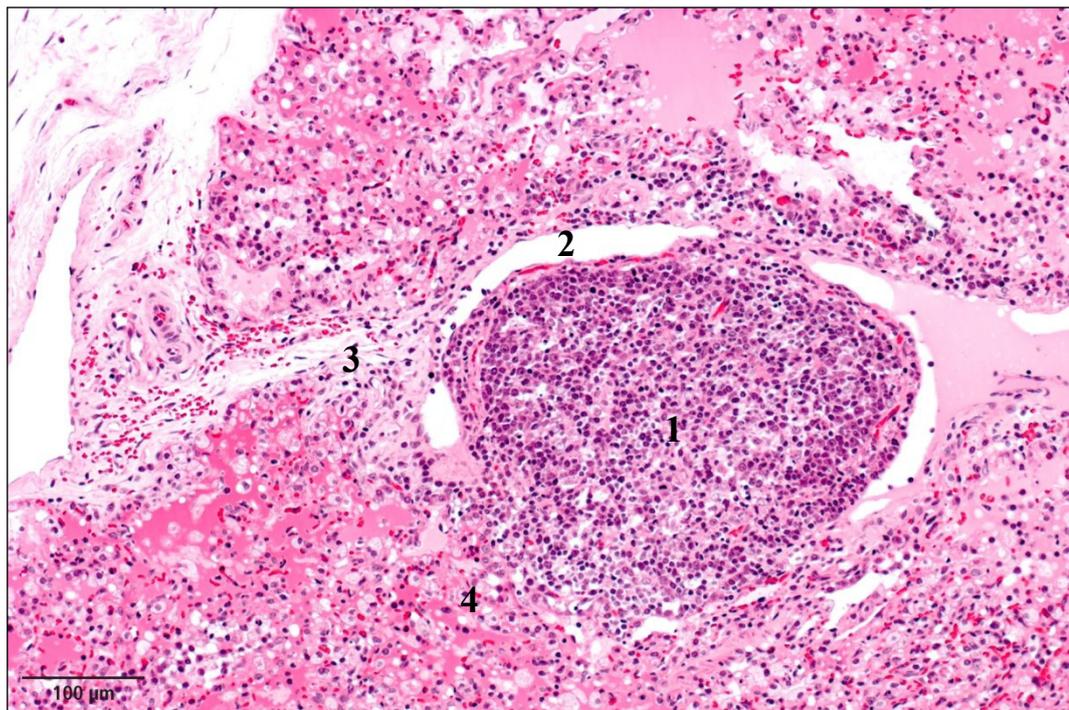


Abb. 48: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); ein typischer Sekundärfollikel mit einem helleren zentralen Zellareal (1) ragt in das Lymphgefäß (2) eines bindegewebigen Septums (3), es handelt sich um ein septales ELG zwischen zwei benachbarten Lungenläppchen; die Alveolarräume sind ödematisiert, das ELG grenzt basal an Alveolargewebe (4), oberhalb der Follikels wölbt es sich in den Lymphgefäßspalt; HE-Färbung.

Bei den lymphatischen Zellen des ELG handelt es sich in den Follikelformationen überwiegend um kleine bis mittelgroße Lymphozyten mit einem heterochromatinreichen Zellkern bis hin zu einem deutlicheren Nukleolus im Zellkern (Abb. 49). Follikel mit einem Keimzentrum weisen eine typische zentrale hellere Zone auf, in der größere lymphatische Zellen zu sehen sind. Plasmazellen sind innerhalb des Follikels sehr vereinzelt vertreten, eher kann man sie in seinem Randbereich beobachten. Sternhimmel-Makrophagen sind häufig in den Follikeln zu erkennen (Abb. 49).

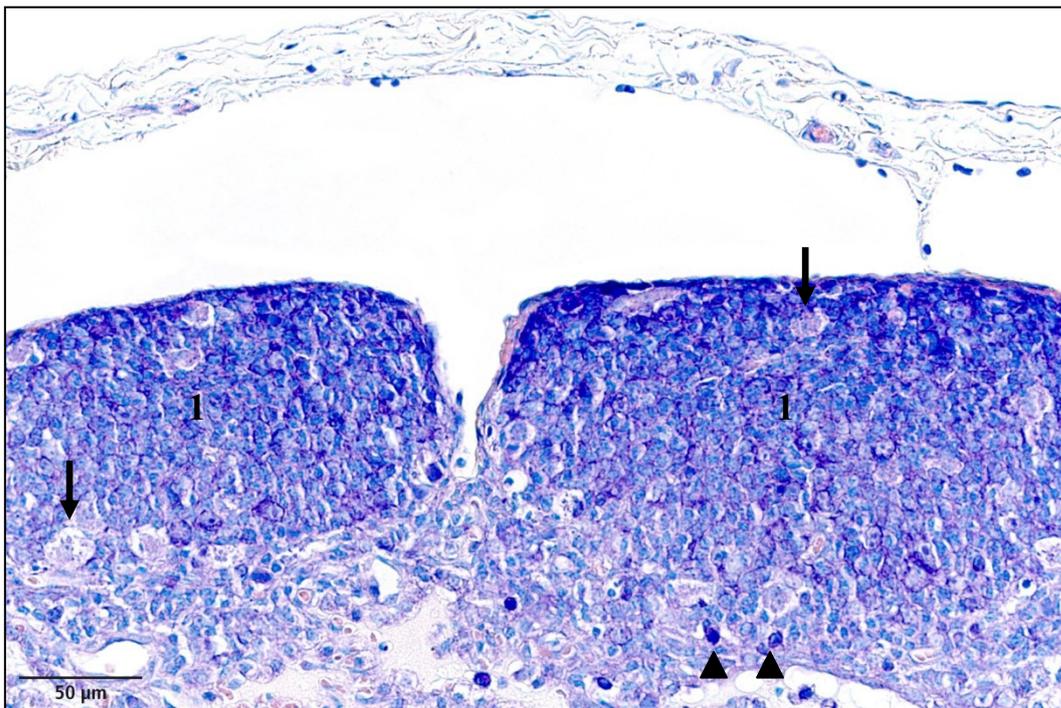


Abb. 49: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); in den zwei Follikeln ohne erkennbares Keimzentrum kommen vorwiegend kleine und mittelgroße Lymphozyten vor (1), im Follikel sind auch mehrere Sternhimmel-Makrophagen zu sehen (Pfeile); im basalen Randbereich des Follikels kann man Plasmazellen mit ihrem dunkelblauen Zytoplasma erkennen (Pfeilköpfe); Färbung nach Giemsa.

Die immunhistochemische Darstellung von CD20 und CD3 im ELG zeigt, dass überwiegend CD20-positive B-Zellen darin vorkommen. Sie bilden ein deutliches B-Zellareal (Abb. 50), wohingegen CD3-positive T-Lymphozyten vereinzelt und unregelmäßig verteilt innerhalb und um das B-Zellareal herum vorkommen (Abb. 51). Außerhalb des Follikels entspricht die Zahl der B-Lymphozyten etwa der Zahl der T-Lymphozyten. Eine deutliche Bildung eines T-Zellareals im ELG wird in den EP-typischen Lungen nicht beobachtet.

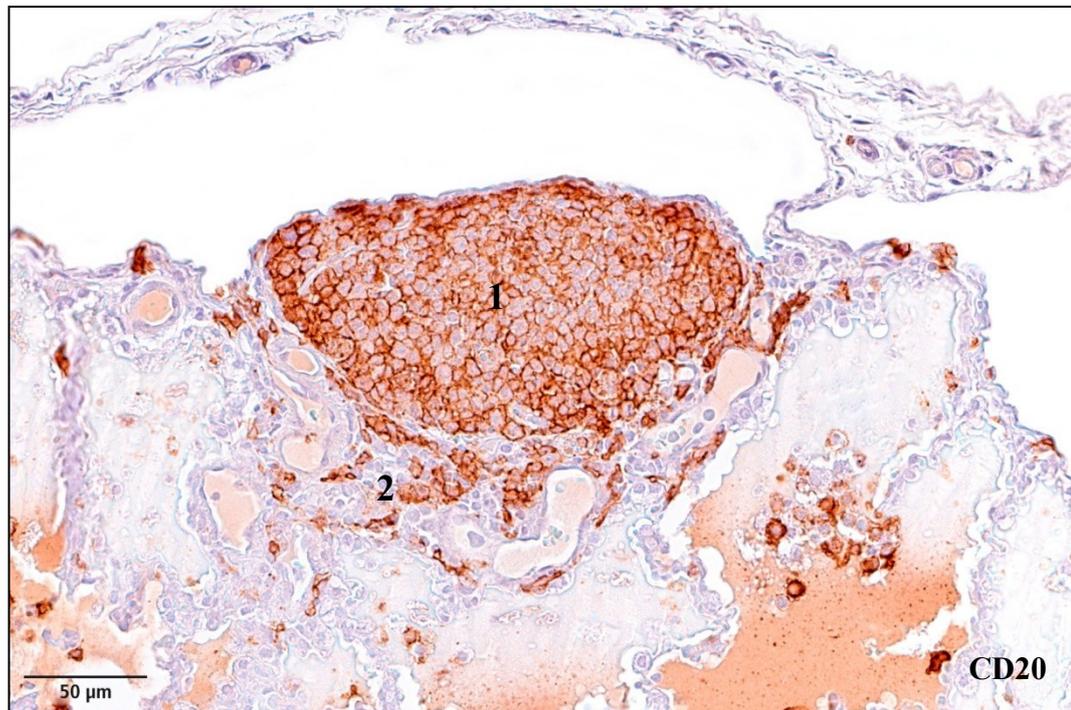


Abb. 50: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); durch die immunhistochemische Darstellung von CD20 kann der Follikel deutlich als B-Zellareal angesprochen werden (1); vereinzelt sind CD20-positive B-Lymphozyten auch im Alveolargewebe vertreten (2).

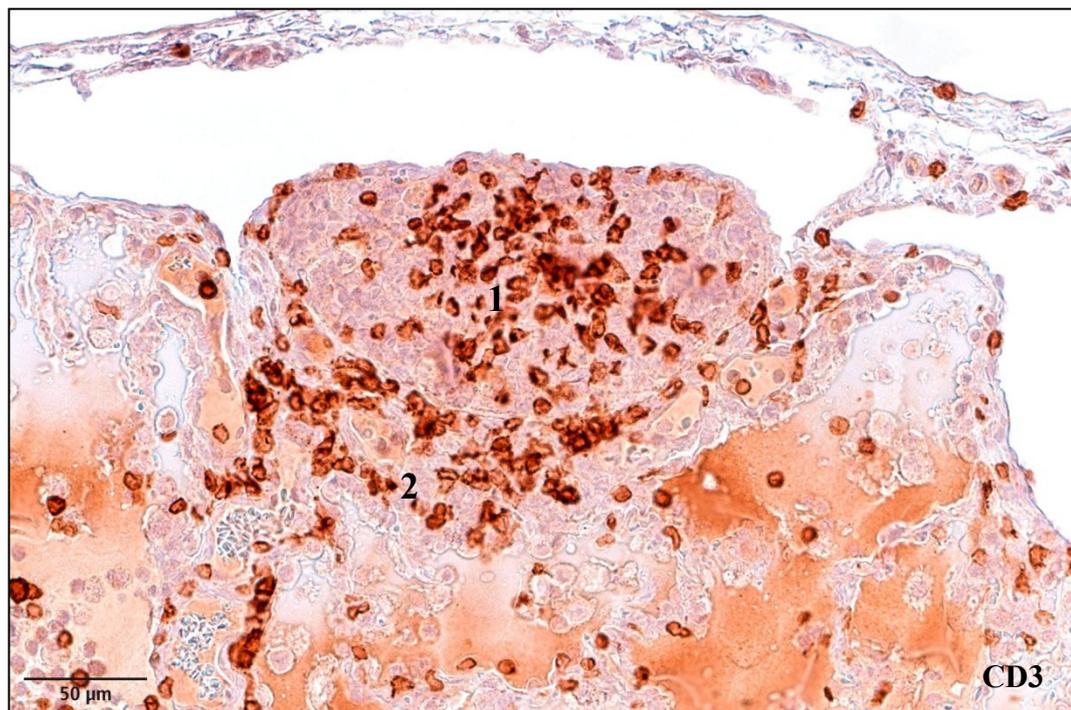


Abb. 51: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); CD3-positive T-Lymphozyten sind vereinzelt sowohl im Follikel (1) als auch außerhalb im angrenzenden Alveolargewebe zu beobachten (2), sodass von ihnen kein deutliches T-Zellareal gebildet wird.

Es können ebenfalls keine Venolen mit deutlicher hochendothelisierter Innenauskleidung (HEV) um den Follikel herum beobachtet werden, verdachtsweise angesprochene Gefäße weisen sich auch in der immunhistochemischen Darstellung von Vimentin nicht als solche aus (Abb. 52).

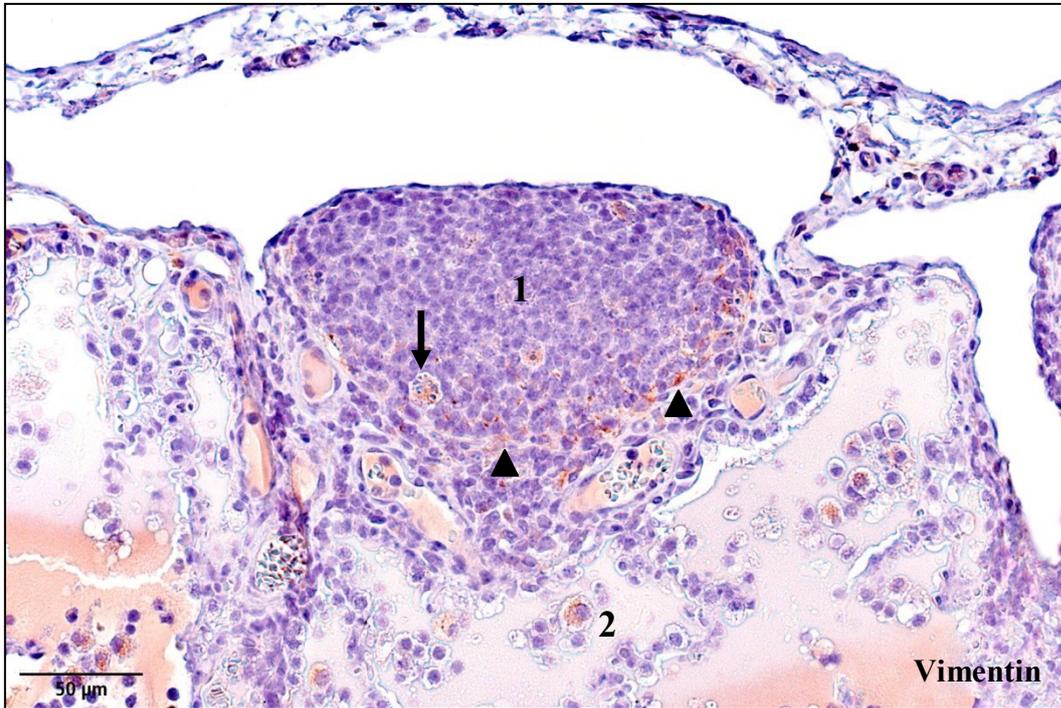


Abb. 52: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); im Follikel (1) zeigen sich Vimentin-positive Sternhimmel-Makrophagen (Pfeil); vor allem im Randbereich des Follikels reagieren Zellausläufer zwischen den lymphatischen Zellkernen (Pfeilköpfe), ebenfalls reagieren die Alveolarmakrophagen positiv (2); Blutgefäße, deren Endothelzellen einer HEV entsprechen könnten, sind nicht erkennbar.

Normale größere Blutgefäße sind dem ELG nicht so stetig wie ein Lymphgefäß benachbart. Den Follikel selbst durchziehen regelmäßig feinste Kapillaren (Abb. 53).

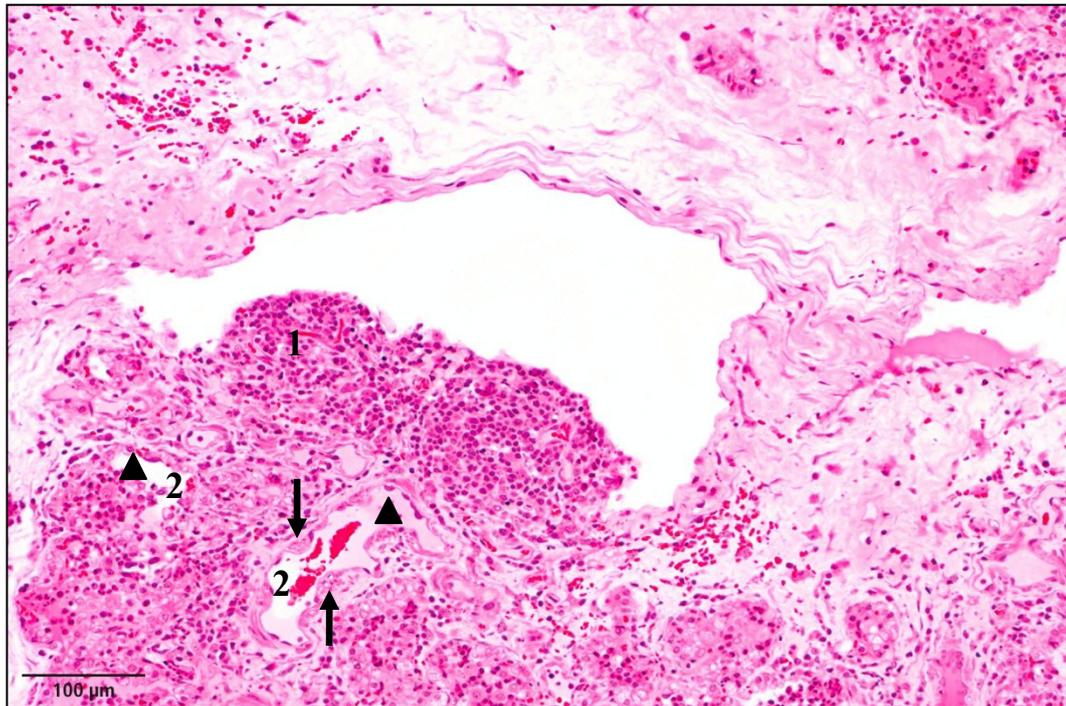


Abb. 53: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); feine Kapillaren liegen zwischen den lymphatischen Zellen des ELG (1), ein größeres Blutgefäß ist nicht in Nachbarschaft des Follikels zu sehen; des Weiteren sind die basal angrenzenden Alveolen (2) teils von breiten bindegewebigen Septen umgeben (Pfeile), die Innenauskleidung besteht vorwiegend aus kleinen kubischen Alveolarepithelzellen (Pneumozyten Typ II) (Pfeilköpfe), die Alveolen sind mit Ödemflüssigkeit gefüllt, teils sind darin ebenfalls extravasale Erythrozyten und neutrophile Granulozyten zu sehen; HE-Färbung.

Der deutlich angebildete Follikel eines ELG mit typischer rund-ovaler Form wölbt sich oft hochgradig in das Lumen der ihm benachbarten Lymphgefäßspalte vor (Abb. 54). Als Vorstufen des Follikels können lymphatische Zellen beobachtet werden, die sich zwischen Lymphgefäßendothel und Alveolarepithel ansammeln (Abb. 55).

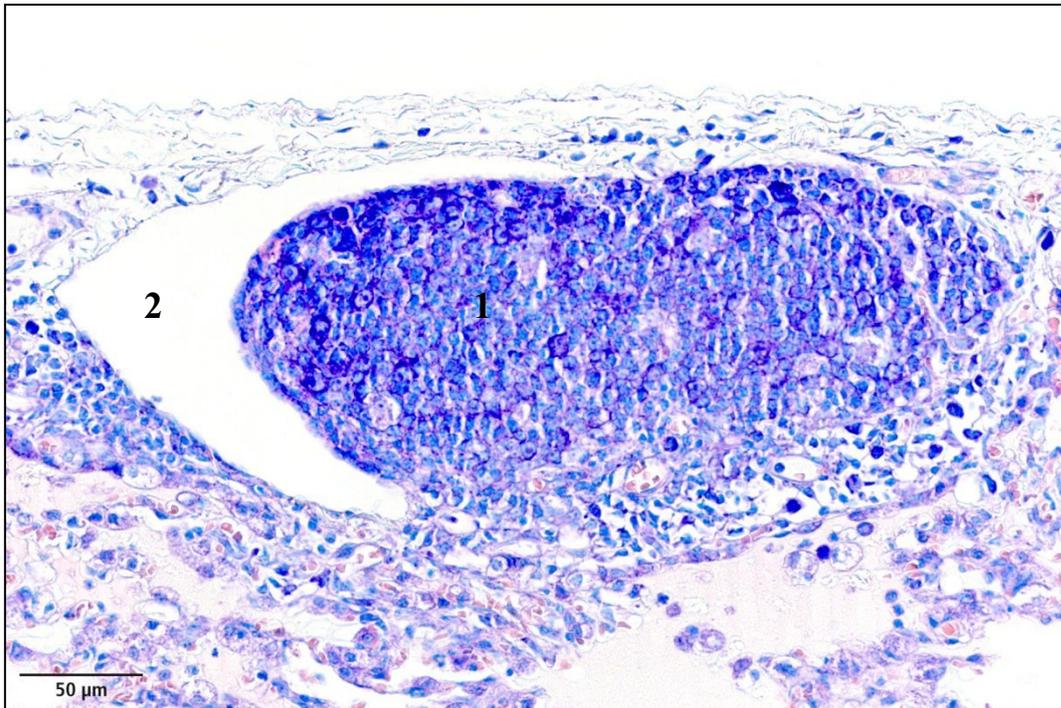


Abb. 54: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); der prominente Follikel (1) ragt weit in ein subpleurales Lymphgefäß (2) hinein; Färbung nach Giemsa.

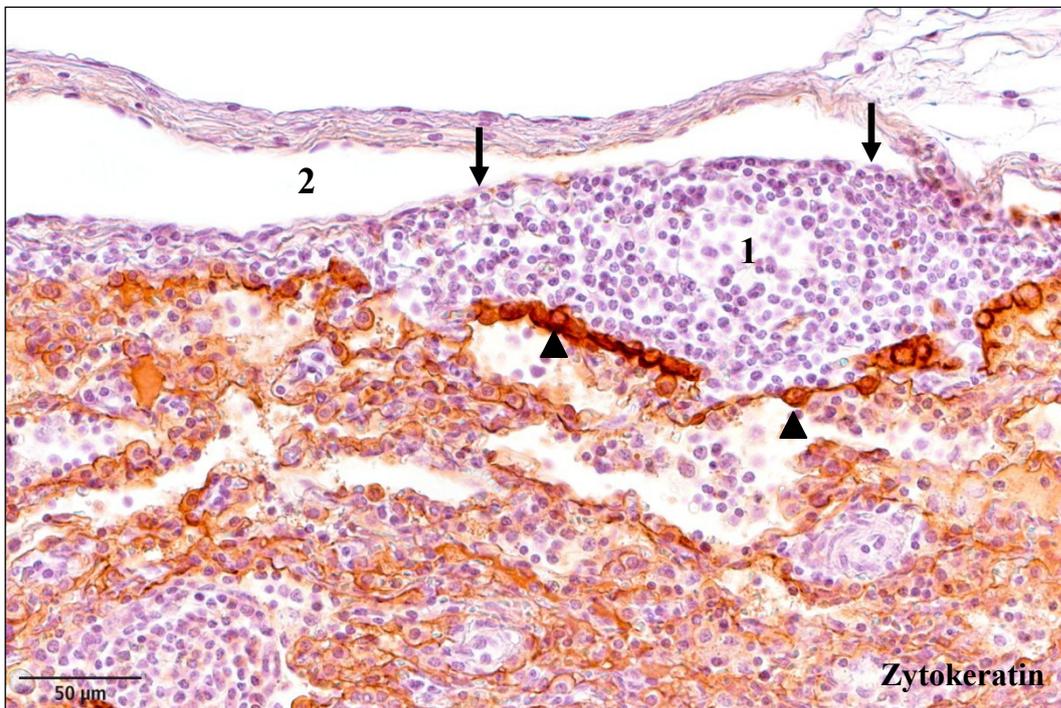


Abb. 55: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); der sich anbildende Follikel (1) ist einerseits von flachen, langgestreckten Endothelzellen (Pfeile) des benachbarten Lymphgefäßes (2) bedeckt und grenzt andererseits direkt an Alveolarepithelzellen, deren Zytokeratin immunhistochemisch dargestellt ist (Pfeilköpfe).

V. DISKUSSION

Im Rahmen der Enzootischen Pneumonie (EP) des Schweines mit dem Primärerreger *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) können immunpathologische Lungenveränderungen wie die hochgradige Anbildung des Bronchus- und Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) beobachtet werden (LIVINGSTON et al., 1972; THACKER, 2006). Da die Anbildung des BALT wie bei vielen Spezies erst bei krankhaften Prozessen zu beobachten ist (PABST & GEHRKE, 1990), stellt es ein sogenanntes tertiäres lymphatisches Gewebe dar (PABST & TSCHERNIG, 2010). Über die Morphologie des BALT oder allgemein tertiäres lymphatisches Gewebe in der Lunge des Schweines ist nur wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das tertiäre lymphatische Gewebe in der Lunge des Schweines morphologisch zu charakterisieren, weiterhin aber auch hinsichtlich seines Verteilungsmusters innerhalb der Lunge zu untersuchen. Für ein möglichst breites Anbildungsspektrum wurden Lungen von konventionell gehaltenen Mastschweinen unterschiedlicher Herkunft mit mikroskopischen Läsionen, wie sie für eine EP typisch sind, herangezogen. In Voruntersuchungen an Obduktionsmaterial des Institutes für Tierpathologie wurden darüber hinaus Versuche zur makroskopischen Identifikation und gezielten Gewinnung von BALT durchgeführt, um eine ultrastrukturelle Untersuchung des BALT in die vorliegende Arbeit einschließen zu können.

1. Versuch der makroskopischen Identifikation von BALT

Es konnte in den Mastschweinelungen aus dem Obduktionsmaterial des Institutes der Tierpathologie im Zeitraum 08/2012 bis 07/2013 das BALT makroskopisch nicht sicher identifiziert und gezielt für eine qualitativ hochwertige ultrastrukturelle Untersuchung gewonnen werden. Dies verwundert insofern, dass SARRADELL UND MITARBEITER (2003) sowie RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004) in Lungen, die makroskopisch für eine Enzootische Pneumonie (EP) verdächtig waren, lymphatische Knötchen im Sinne einer BALT-Anbildung sehen konnten. Sie beschrieben sie als kleine, blass-weiße und gräuliche Knötchen gegen roten Lungenhintergrund. Die von ihnen untersuchten Lungen stammten von konventionell gehaltenen Mastschweinen zum Schlachtzeitpunkt, weshalb die makroskopische Identifikation des BALT in

Mastschweinlungen aus Obduktionsmaterial für die vorliegende Arbeit kein Problem darstellen sollte. Das Gewebe um die größeren Atemwege (Bronchien) herum und das Bronchiallumen selbst waren mit der Lupe gut zu beurteilen, hier konnte kein BALT identifiziert werden. Die Bronchioli waren aufgrund ihrer Lumenweite von ≤ 1 mm nicht gut beurteilbar, aber auch das umgebende Gewebe wies keine Auffälligkeiten gegen den Rest des Lungengewebes auf. Was laut HUANG UND MITARBEITER (1990) die effiziente Identifikation der lymphatischen Gewebe behindert, sind die Schleimhautfalten in den Atemwegen, die konsolidierten Bereiche des Parenchyms bei einer Pneumonie und dass die kleineren BALT-Anbildungen leicht zu übersehen sind. Es liegt aufgrund letzterer Aussage die Vermutung nahe, dass das BALT in den Lungen aus dem verwendeten Obduktionsmaterial nicht ausgeprägt genug angebildet war, um makroskopisch erkannt werden zu können. Das würde bedeuten, dass in vorgenannten Studien von SARRADELL UND MITARBEITER (2003), RODRIGUEZ UND MITARBEITER (2004) sowie LORENZO UND MITARBEITER (2006) das BALT weitaus mehr und auch in größeren, gut beurteilbaren Atemwegen ausgeprägt gewesen sein muss. Es liegt die Vermutung nahe, dass entweder Abwesenheit, zu kurze Besiedelungsdauer oder unterschiedliche Pathogenität des Erregers *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) der Grund für weniger hochgradig angebildetes BALT gewesen sein könnte. MEYNS UND MITARBEITER (2007) stellten experimentell fest, dass die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Stämme von Mh in ihrer jeweiligen Wachstumsrate und Fähigkeit als Modulator einer starken Entzündungsreaktion liegt. Hochvirulente Stämme von Mh zeigten gegenüber niedrigvirulenten Stämmen eine signifikant höhere Wachstumsrate in Lungen. Ebenso konnten in den mit hochvirulenten Stämmen infizierten Lungen signifikant höhere Konzentrationen an TNF- α und IL-1 β in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) nachgewiesen werden. TNF- α und IL-1 β sind an der Aktivierung von lymphatischen Zellen (MURTAUGH & FOSS, 2002) beteiligt. Es liegt also die oben angestellte Vermutung nahe, dass die Pathogenität von bestimmten Mh-Stämmen die BALT-Anbildung in einem derartigen Ausmaß stimulieren könnte, dass die Sichtbarkeit in der Makroskopie möglich wird. VRANCKX UND MITARBEITER (2012) erhärten diesen Gedanken anhand mikroskopischer Untersuchungen des BALT in Bezug auf seine Zelldichte. Bei experimenteller Infektion von Tieren mit hochvirulenten Stämmen beobachteten

sie eine höhere Zelldichte von Makrophagen, T- und B- Lymphozyten im BALT gegenüber Tieren, die mit niedrig-virulenten Stämmen infiziert wurden.

Die Schwierigkeit einer makroskopischen Identifikation des BALT ist auch damit zu erklären, dass das BALT des Schweines in Lungengeweben mit tatsächlicher BALT-Anbildung in nachfolgenden Untersuchungen vorrangig an den kleineren Bronchioli statt Bronchien beobachtet werden konnte. Gleiche Beobachtungen wurden von HUANG UND MITARBEITERN (1990) sowie DELVENTHAL UND MITARBEITERN (1992) gemacht, die die BALT-Verteilung entlang des gesamten Bronchialbaumes untersuchten und zu 82 bis 95% am Bronchiolus beobachten konnten.

Zusammenfassend ist die gezielte Probennahme des zumeist am Bronchiolus angebildeten BALT des Schweines als schwierig zu beurteilen. Es muss aufgrund der Fragilität dieser kleinen Atemwege ohne Knorpelgerüst für zukünftige ultrastrukturelle Untersuchungen verschiedener BALT-Anbildungsgrade des Schweines eine äußerst gewebeschonende Methode für die gezielte Gewinnung und Aufbereitung der Proben etabliert werden.

2. Untersuchung von Anbildungsgraden des BALT des Schweines

Für die Untersuchung der Anbildungsgrade des BALT wurden 47 Lungen von Mastschweinen herangezogen. Es sollte ein möglichst breites Anbildungsspektrum des Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebes gegeben sein. Die Vorauswahl bezog sich deshalb auf Tiere, die aus konventionellen Haltungsbetrieben mit vorberichtlichen Bestandsproblemen einer *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektion stammten. Sie wurden nach klinischen Anzeichen einer akuten respiratorischen Erkrankung ausgewählt, ihre Lungen am Schlachtband auf EP-verdächtige Läsionen untersucht und im gegebenen Falle für die histologische Probennahme ausgewählt. Anschließend wurden die Gewebe mikroskopisch auf das Vorhandensein von BALT-Anbildungen, wie sie für eine Enzootische Pneumonie typisch sind, überprüft.

2.1. Interpretation der bakteriologischen Ergebnisse

Freundlicherweise konnten bei 40 der 47 in die Untersuchung einbezogenen Lungen bakteriologische Ergebnisse von CEESA (Centre Européen d'Etudes pour

la Santé Animale) von der Schweineklinik überlassen werden. Die Lungen wurden kulturell auf Mykoplasmen untersucht. In 8 von 40 untersuchten Lungen konnte das Vorkommen von *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) bestätigt werden.

Der kulturelle Nachweis von Mh aus Lungengewebe wird als der Goldstandard unter den diagnostischen Möglichkeiten betrachtet. Der kulturelle Nachweis erfordert ein spezielles Friis-Medium (THACKER, 2006). Aufgrund der langen über Wochen andauernden Isolation kommt es häufig zu falsch-negativen Ergebnissen durch Überwucherungen des Nährmediums durch schneller wachsende Mykoplasmen-Arten wie *Mycoplasma hyorhinis* oder *Mycoplasma flocculare* (MAES et al., 1996). Es konnte neben Mh in 10 der 40 Lungen *Mycoplasma hyorhinis* nachgewiesen werden (Tab. 9), was möglicherweise zu falsch-negativen Ergebnissen geführt haben könnte. THACKER (2006) beschreibt die akkurate Diagnose von *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) in der Lunge als Herausforderung, die durch das Verhalten dieses Mikroorganismus im Respirationstrakt begründet ist. Seine Lokalisation an der Schleimhautoberfläche des Respirationstraktes, die Variation in seiner Genexpression und die Fähigkeit, die Immunantwort des Wirtes regulieren zu können, gestalten den Nachweis im Lungengewebe so schwierig.

Dass das BALT pathohistologisch nachweisbar war, obwohl die Kultur ein negatives Ergebnis für Mh lieferte, könnte auch andere Gründe haben. Man könnte in Betracht ziehen, dass Mh zum Schlachtzeitpunkt und Probennahme womöglich nur noch in geringer Zahl oder gar nicht mehr vorhanden war. Gegen die Möglichkeit einer vollständigen Erregerelimination zum Schlachtzeitpunkt sprechen jedoch epidemiologische Fakten. Da die 47 Tiere aus Betrieben mit vorherberichtlichen Mykoplasmen-Infektionen stammten, erscheint eine vollständige Erregerelimination unwahrscheinlicher als die Reinfektion der Tiere bis zum Schlachtzeitpunkt (GOODWIN, 1985). Darüber hinaus spricht die Dauer der Persistenz der Erreger gegen die vollständige Eliminierung. Sie variiert in Literaturangaben von 85 bis 158 Tagen nach experimenteller Infektion. Die Erreger wurden mittels sehr sensitiver Methoden wie der nested-PCR nachgewiesen (SORENSEN et al., 1997; FANO et al., 2005). Des Weiteren ist der Zeitpunkt der beginnenden Rückbildung hochgradiger BALT-Anbildungen erst mit 4 Monaten nach Infektion beschrieben (MAES et al., 1996). Diese Beobachtung bestätigt möglicherweise die lange Persistenz des Erregers.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der diagnostischen Methode des Nachweises von Mh und einem nicht vollständig vorliegenden Ergebnis auf eine weiterführende Auswertung im Zusammenhang mit der BALT-Anbildungsuntersuchung verzichtet.

2.2. Zur Definition von BALT-Anbildungsgraden

Die in der vorliegenden Arbeit definierten Bildungsgrade des BALT negativ, geringgradig, mittelgradig und hochgradig (0 bis +++) berücksichtigen semiquantitativ die Menge an Bronchioli mit überwiegend gleichen BALT-Bildungsgraden im histologischen Lungengewebeschnitt. Die Bildungsgrade des BALT reichen dabei von lediglich follikelartiger Lymphozytenaggregation (=Follikelformation) bis hin zu mehr als zwei deutlichen Follikeln je Bronchiolus. Es wurde in der Definition für die Verteilung und Morphologie des BALT bewusst der Begriff BALT-Anbildung verwendet. Der in der Literatur mehrfach verwendete Begriff der BALT-Hyperplasie wurde gemieden. Definitionsgemäß entspricht der Begriff Hyperplasie der Vergrößerung eines Gewebes oder Organes durch Zunahme seiner ursprünglichen Zellzahl (MYERS & MCGAVIN, 2009). Das BALT wurde in dieser Arbeit aber von Beginn seiner Neuanbildung (Neogenese) her betrachtet, was die Zunahme einer ursprünglichen Zellzahl und damit den Begriff der Hyperplasie ausschließt. Eine in den Studien der Lungenläsionen bei *Mycoplasma hyopneumoniae*-Infektion von SARRADELL (2003), RODRIGUEZ (2004) sowie REDONDO UND MITARBEITER (2009) verwendete Gradeinteilung von LIVINGSTON (1972) war für die vorliegende Arbeit nicht anwendbar, weil sie die gesamten Lungenveränderungen einer Enzootischen Pneumonie einschließlich der für eine bakterielle Sekundärinfektion typischen Lungenveränderung einschließt (0 bis +++++): + in der Submukosa sind ein oder mehrere lymphatische Knötchen präsent, die nicht die Muskelschicht durchdringen; ++ ein oder mehr lymphatische Knötchen dringen durch die Muskelschicht, geringgradige Zellinfiltration mit neutrophilen Granulozyten in den Alveolen und Bronchien, geringgradige Verdickung der Alveolarwände; +++ perivaskuläre und peribronchioläre lymphatische „Hyperplasie“ mit steigender Zahl an Zellen in Alveolen und massiven Akkumulationen von neutrophilen Granulozyten in den Bronchien; +++++ perivaskuläre und peribronchioläre lymphatische „Hyperplasie“ dringt umfangreich in das Lungengewebe ein, Massen an neutrophilen Granulozyten, Ödem. Der Fokus der vorliegenden Arbeit

lag auf der Charakterisierung des BALT in unterschiedlichen Ausbildungsstufen. Es sollten dabei auch die einzelnen Komponenten des BALT berücksichtigt werden. Letztlich war eine Übernahme des in vorigen Studien verwendeten Schemas nicht möglich, sodass eine abgewandelte Definition für die Ausbildungsgrade des BALT erarbeitet werden musste.

2.2.1. Interpretation der Ergebnisse der BALT-Ausbildungsgrade

Bei Betrachtung der ermittelten Ausbildungsgrade in *Lobus cranialis sinister* (1), *Lobus medius* (2), *Lobus caudalis sinister* (3) und *Lobus caudalis dexter* (4) konnte festgestellt werden, dass das BALT in der Lunge unterschiedlich verteilt vorkommt, und darüber hinaus das unterschiedlich verteilte BALT auch unterschiedliche Ausbildungsgrade aufweist. Die Befunde sprechen allgemein für eine ungleichmäßige Stimulation des BALT in den Bronchialsystemen der einzelnen Lappen. Höhergradig angebildetes BALT, d.h. mittel- und hochgradig, war überwiegend in den beiden kranialen Lokalisationen (1) und (2) zu beobachten. Dieser Befund zeigt, dass die für eine Anbildung und Weiterentwicklung erforderliche mikrobielle Stimulation des BALT des Schweines (PABST & GEHRKE, 1990) im Rahmen einer Enzootischen Pneumonie hauptsächlich in den vorderen Lungenbereichen stattfindet. Das legt die Vermutung nahe, dass *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) sich entweder hauptsächlich in den vorderen Lungenlappen ansiedelt, die Vermehrung des Erregers in diesen vorderen Lungenlappen begünstigt ist und/oder die Dauer der Besiedelung in diesen Lungenbereichen länger anhält.

Den größten Anteil der Ausbildungsgrade in allen Lokalisationen machte der geringgradige Ausbildungsgrad des BALT aus (104/188 Lokalisationen). Jedoch konnte nur bei 6/47 Lungen der vorliegenden Arbeit eine annähernd gleichmäßige Verteilung des geringen Ausbildungsgrades beobachtet werden. Die erkennbare Ausprägung kleiner Follikelanbildungen des BALT wurde von LIVINGSTON UND MITARBEITERN (1972) mittels experimenteller Mh-Infektion von Ferkeln im Zeitraum von 6-10 Tagen beobachtet. Daher könnte bei den 6 Tieren der vorliegenden Arbeit an ein frühes Stadium der Infektion mit Mh gedacht werden. Außerdem könnte es sein, dass das BALT in seiner frühen Anbildung tendenziell noch einer gleichmäßig verteilten Stimulation in der Lunge unterliegt. Das würde bedeuten, dass die höhergradige Anbildung des BALT erst später in der Pathogenese der Enzootischen Pneumonie in vorderen Bereichen bevorzugt ist. Es

bleibt jedoch bei den 6 Lungen mit geringgradiger BALT-Anbildung in allen 4 Lokalisationen zu bedenken, dass in anderen, vor allem vorderen nicht beprobten Lokalisationen eventuell mehr BALT angebildet gewesen sein könnte. Dies ist durch die beobachtete sehr unregelmäßige BALT-Anbungsverteilung der anderen 41 Lungen nicht auszuschließen. Darüber hinaus waren die Tiere der vorliegenden Arbeit konventioneller Herkunft mit vorberichtlicher Mh-Problematik im Bestand und adult. Somit waren sie bis zum Untersuchungszeitpunkt bereits anderen Umweltfaktoren ausgesetzt als die experimentell infizierten Tiere von LIVINGSTON UND MITARBEITERN (1972). Ein zusätzlicher Einfluss von bakteriellen Sekundärinfektionen, vor allem bei der höhergradigen Anbildung des BALT in vorderen Lungenlappen, muss dabei ebenfalls bedacht werden.

Es kann aus den Untersuchungen der Anbildungsgrade des BALT geschlossen werden, dass seine Anbildung in allen untersuchten Lungenbereichen stattfinden kann. Die Anbildung ist jedoch nicht gleichmäßig verteilt zu beobachten. Sie ist kranial höhergradiger, was auf einen kranial stärkeren Stimulus hindeuten könnte.

3. Untersuchungen zur Morphologie tertiärer lymphatischer Gewebe in Lungen von Schweinen

Ein für das vorliegende Untersuchungsvorhaben erforderliches breites Anbildungsspektrum tertiärer lymphatischer Gewebe in der Lunge des Schweines war durch mikroskopische Voruntersuchungen in Lungen mit typischen Läsionen Enzootischer Pneumonie (EP) sichergestellt worden. Es ließ sich neben der EP-typischen Lungenveränderung BALT noch ein weiteres lymphatisches Gewebe feststellen. Es handelt sich dabei um das Ektopische lymphatische Gewebe (ELG). ELG kann allgemein in unterschiedlichen Organen beobachtet werden, wie Leber und Niere. Es entsteht u.a. im Rahmen von chronischen Entzündungen (DRAYTON et al., 2006). Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte ELG der Schweinelunge ist wie das BALT aufgrund seiner Anbildung unter krankhaften Bedingungen in die Gruppe der tertiären lymphatischen Gewebe einzuordnen.

3.1. Interpretation der Ergebnisse der Morphologie des BALT

Das vollständig angebildete Bronchiolus-assoziierte lymphatische Gewebe (BALT) des Schweines wies regelmäßig 4 Komponenten auf:

1) Lymphoepithel, 2) Follikel-assoziierte Lamina propria, 3) Follikel mit Keimzentrum, der in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen liegt und 4) T-Zellareal mit hochendothelisierten Venolen (HEV).

Im Vordergrund der Charakterisierung stand die histologische und immunhistochemische Darstellung von Komponenten, wie sie im Immunsystem der Schleimhäute für ein Induktions-Kompartiment, wie z.B. die PEYERsche Platte des Darmes als konstitutives MALT (BRANDTZAEG & PABST, 2004) beschrieben sind. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann entnommen werden, dass die Voraussetzung einer möglichen Funktion des BALT des Schweines als Induktions-Kompartiment im Immunsystem der Schleimhäute aufgrund der ermittelten Komponenten prinzipiell erfüllt wird. Auch wenn dieses vollständig angebildete BALT erst im Zusammenhang krankhafter Prozesse wie der Enzootischen Pneumonie angebildet wird. Die beobachteten Komponenten ähneln der eines Induktions-Kompartiments wie der PEYERschen Platte (PP) jedoch nicht in jeglicher Hinsicht und sollen folgend anhand der PP als Vergleichsmodell diskutiert werden.

Prinzipiell gleicht das Lymphoepithel des BALT des Schweines dem in der PP beschriebenen Lymphoepithel, auch Follikel-assoziiertes Epithel genannt (BOCKMAN & COOPER, 1973; BIENENSTOCK et al., 1973a). Es konnte im Lymphoepithel des BALT jedoch nicht das Vorhandensein eines spezialisierten Zelltyps, die M-Zelle, festgestellt werden. Die M-Zelle ist im Lymphoepithel der PP für den Transport von Antigen aus dem Lumen des Darmes in die PP zuständig (OWEN, 1977), sodass in der PP schließlich eine lokale oder auch systemische Immunantwort induziert werden kann (PABST, 1987). Die in dieser Arbeit angewandte immunhistochemische Methode, die M-Zellen mittels Vimentin darzustellen, wurde angelehnt an die Studie von BEYAZ UND MITARBEITERN (2010). Es konnten auf diese Weise M-Zellen der PP beim Kaninchen dargestellt werden. Eine bei der PP des Schweines erfolgreiche Methode war die Verwendung von Antikörpern gegen Zytokeratin 18, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen (GEBERT et al., 1994). Weiterhin sollte wie oben beschrieben, eine zusätzlich geplante, aber nicht

durchführbare Raster- sowie Transmissionselektronenmikroskopie der Darstellung von eventuell vorhandenen M-Zellen dienen. Es bleibt in zukünftigen Studien also weiterhin zu klären, ob diese auf den Antigen-Transport durch das Epithel spezialisierte Zelle im BALT vorhanden ist. Sollte es eine M-Zelle jedoch nicht geben, müsste trotzdem der Nachweis einer für den essentiellen Transport von Antigenen aus dem Bronchiallumen zuständigen Zelle erbracht werden. Ohne eine Antigen-zuführende Zelle in der Schleimhaut wäre das BALT des Schweines kein Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe per Definition (BRANDTZAEG & PABST, 2004).

Die im BALT des Schweines beobachtete Follikel-assoziierte Lamina propria liegt zwischen Follikel und Lymphoepithel. In der PEYERschen Platte liegt in diesem Bereich die sogenannte Dome-Region, die sich ins Darmlumen vorwölbt. Die Vorwölbung ist durch den unter der Mukosa liegenden Follikel der PP bedingt. In der Dome Region sind verschiedene Zellen zu beobachten, hauptsächlich B- und T- Lymphozyten, aber auch Plasmazellen und Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen (PABST, 1987). Prinzipiell ist die Form der Follikel-assoziierten Lamina propria des BALT mit der Dome Region der PP vergleichbar, es konnten weiterhin T- und B- Lymphozyten nachgewiesen werden. Was jedoch im vollständig angebildeten BALT deutlich auffiel, war die hochgradige Infiltration mit reifen Plasmazellen in diesem Bereich. Dies erscheint ungewöhnlich für ein Induktions-Kompartiment, da reife Plasmazellen, vor allem SIgA-produzierende, eher ein zellulärer Bestandteil der *Lamina propria* von Effektor-Kompartimenten im Schleimhaut-Immunsystem darstellen. Sie gehören also zu den Effektorzellen der Schleimhäute (BRANDTZAEG & PABST, 2004). Es erscheint daher der Gedanke nicht abwegig, dass die Follikel-assoziierte Lamina propria im BALT des Schweines bei vollständiger Anbildung sowohl Teil eines Induktions-Kompartiments sein könnte, als auch gleichzeitig eine normale *Lamina propria* als Effektor-Kompartiment darstellen könnte. Eine Erklärung könnte sein, dass die Anbildung eines vollständigen BALT in den vorliegenden Untersuchungen zumeist mit mehr als 2 Follikeln am Bronchiolus einherging. Es war dann teilweise der gesamte Querschnitt der *Lamina propria* des betroffenen Bronchiolus zur Follikel-assoziierten Lamina propria modifiziert. Daher besteht die Vermutung, dass den reifen Plasmazellen letztlich kein Raum außerhalb einer Follikel-assoziierten Lamina propria bleibt, um ihre Funktion als Effektorzelle

außerhalb des BALT zu erfüllen. Dadurch könnte es zur beobachteten vermehrten Ansammlung dieser in diesem Bereich kommen. Letzteres spricht durch nachfolgend aufgeführte Studie jedoch nicht grundsätzlich gegen das BALT des Schweines als Induktions-Kompartiment. KOBISCH UND MITARBEITER (1993) konnten die Entwicklung einer Resistenz gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) bei spezifisch-pathogenfreien Ferkeln infolge zweifacher intratrachealer Inokulation mit Mh nachweisen. So entwickelten 12 von 12 Tieren nach der ersten Infektion deutliche respiratorische Symptome, die nach einer nach 14 Wochen erfolgten 2. Inokulation nicht wieder auftraten. Die Lungen zeigten makroskopisch und mikroskopisch bei 11 der 12 Tiere in Regression befindliche Läsionen und eine deutliche BALT-Anbildung. Mh konnte mittels kultureller Untersuchung und direktem Immunfluoreszenztest in den Lungen zum Sektionszeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Sie selbst schlussfolgerten, dass aufgrund eines deutlichen Anstiegs der Serum-Immunglobuline auch nach zweiter Inokulation mit Mh die Serum-Immunglobuline allein letztlich nicht zum Schutz einer Reinfektion beigetragen haben können. Die Befunde dieser Studie und die eigenen Beobachtungen im vollständig angebildeten BALT sprechen sehr deutlich für eine induktive Funktion im Rahmen einer Immunantwort des BALT des Schweines. Vor der vollständigen Anbildung sind jedoch Vorstufen des BALT des Schweines zu beobachten, die nicht alle Komponenten enthalten. Sie stellen eher unorganisierte lymphatische Zellaggregate dar, die sich nicht in B- und T-Zellareale unterscheiden lassen. Dies deutet darauf hin, dass, sofern gegeben, das BALT des Schweines seine Funktion als Induktions-Kompartiment im Schleimhaut-Immunsystem nur in vollständiger Anbildung erwirken kann. Bisher wurde eine ähnlich hohe zelluläre Organisation des BALT des Schweines nur im Zusammenhang mit der Infektion von Mh beschrieben (SARRADELL et al., 2003).

Im Rahmen der immunhistochemischen Darstellung von Vimentin im BALT fielen im Follikel vereinzelt Vimentin-positive Zellen auf. Diese Zellen erinnerten aufgrund ihrer vielfach verzweigten Zellgestalt an Follikuläre dendritische Zellen (FDC). FDC spielen eine essentielle Rolle in der Formation von echten B-Zell-Follikeln und in der Induktion einer Immunantwort. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und kommen nur im B-Zellareal vor (ALLEN & CYSTER, 2008). Tatsächlich konnten jedoch ähnlich verzweigte, Vimentin-positive Zellen auch im

T-Zellareal beobachtet werden, sodass die Beobachtung von vermeintlichen FDC nicht bestätigt werden kann. Teils war das Vimentin-positive Signal auch als ein maschenwerkartiges Netz in beiden Arealen zu beobachten. Es liegt die Vermutung nahe, dass hier stromale Zellen, ebenfalls mesenchymaler Herkunft, reagieren, die sowohl im T- als auch B-Zellareal des BALT vorkommen können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte also nicht die Ursache der Formation des Follikels ergründet werden. Da sich aber im vollständig angebildeten BALT die T- und B-Zellareale, letztere mit deutlichen Keimzentren, histologisch und immunhistochemisch gut voneinander separiert darstellen, ist die Anwesenheit von dafür notwendigen Zellen zu vermuten. Das Keimzentrum der Follikel des BALT enthielt deutlich erkennbar die typischen Zentrozyten und Zentroblasten eines Sekundärfollikels (ALLEN et al., 2007). Als weitere wichtige akzessorische Zelle in der Induktion einer Immunantwort konnte die professionell Antigen-präsentierende Dendritische Zelle (MURTAUGH & FOSS, 2002) bereits von SARRADELL UND MITARBEITERN (2003) und SOERENSEN UND MITARBEITERN (2005) im BALT und seiner Umgebung nachgewiesen werden.

Als weitere Komponenten des BALT des Schweines konnten sowohl in der Nachbarschaft der Follikel Lymphgefäße als auch hochendothelisierte Venolen (HEV) im T-Zellareal beobachtet werden. Beide Gefäße sind laut Literatur in der Lymphozytenab- und -zuwanderung eines Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes beteiligt. Das Lymphgefäß soll dabei efferenter Natur sein und für die Abwanderung der im Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe geprägten T- und B-Gedächtniszellen zu regionalen Lymphknoten notwendig (PABST, 1987). Die hochendothelisierte Venole (HEV) dient als Austrittsort von T- und B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut in das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe (YAMAGUCHI & SCHOEFL, 1983). Somit wäre im BALT des Schweines auch die Voraussetzung einer notwendigen Lymphozytenzirkulation erfüllt.

Zusammengefasst stellt das vollständig angebildete BALT des Schweines ein hoch organisiertes lymphatisches Gewebe dar. Es enthält folgende Komponenten: 1) Lymphoepithel, 2) Follikel-assoziierte Lamina propria, in der hauptsächlich Plasmazellen vorkommen, 3) Follikel mit Keimzentrum, in der Nachbarschaft von Lymphgefäßen und 4) T-Zellareal mit hochendothelisierten Venolen (HEV). Das BALT des Schweines ist in dieser vollständigen Formation erst im Rahmen einer

krankhaften Lungenveränderung (Enzootische Pneumonie) zu beobachten. Die Anbildungsvorstufen enthalten nicht alle Komponenten. Die Komponenten des vollständig angebildeten BALT entsprechen dem Aufbau anderer Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe wie z.B. dem der PEYERsche Platte. Das vollständig angebildete BALT des Schweines spricht in seinem Aufbau für eine positive Funktion im Abwehrsystem der Schleimhäute. Zukünftige Untersuchungen sollten auf das Vorkommen von dafür essentiellen Zellen, wie z.B. der Follikulären dendritischen Zelle (FDC), abzielen. Auf diese Weise könnten tiefere Einblicke in die Induktion einer erfolgreichen Immunantwort des BALT des Schweines gewonnen werden.

3.2. Interpretation der Ergebnisse der Morphologie und Verteilung des ELG

Die Morphologie des Ektopischen lymphatischen Gewebes (ELG) stellte sich in den Übersichtsfärbungen und immunhistochemischen Untersuchungen weitestgehend einfach dar. Regelmäßig konnte ein einzelner Follikel, der überwiegend B-Lymphozyten enthält, beobachtet werden. Weder konnte in der Nachbarschaft ein deutliches T-Zellareal, noch eine hochendothelisierte Venole beobachtet werden. Teilweise wies der Follikel ein helleres Zentrum auf. Letzteres könnte auf eine aktive Lymphozytopoese hindeuten und liefert einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung im Abwehrsystem der Schweinelunge. Von einer rein protektiven Funktion des in dieser Arbeit untersuchten ELG kann jedoch nicht zwangsläufig ausgegangen werden. In der Literatur wird ektopisches lymphatisches Gewebe auch mit negativen Effekten auf betroffene Organe assoziiert. So sehen BADDOURA UND MITARBEITER (2005) in der lymphatischen Neogenese von ELG einen möglichen Grund von chronischen Transplantatabstoßungen. In ihrer Studie wurde das ELG zu 78% in abgestoßenen Herztransplantaten von Mäusen beobachtet. Sie vermuten die Beteiligung des ELG in der lokalen T-Zell-Aktivierung, die letztlich in einer Transplantatabstoßung resultiert. Das von ihnen beobachtete ELG war teils mit T- und B-Zellarealen sowie hochendothelisierten Venolen (HEV) zu beobachten, teils zeigte sich das ELG aber auch unorganisierterer Morphologie. Ebenso wird in der Literatur die Initiation einer Autoimmunantwort durch ELG diskutiert, deren Pathogenese ursprünglich durch einen mikrobiellen Organismus bedingt ist. Es bildet sich ein ELG zum Beispiel in der Niere des Schweines durch die

Langzeitpersistenz von *Leptospira pomona* an (PEZZOLATO et al., 2012). Durch eine anhaltende Entzündung im Rahmen einer Langzeitinfektion mit mikrobiellen Organismen wird Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie der Follikulären dendritischen Zelle (FDC) eine mögliche Erweiterung ihrer Antigenpräsentation um körpereigenes Antigen unterstellt, die letztlich zur Autoimmunreaktion führt (BAIO et al., 2008). Ein eventuell gewebeschädigender Charakter des ELG in der Schweinelunge kann aufgrund der vorgenannten Studien also nicht ausgeschlossen werden. Im Gedanken an die vorgenannte Studie von PEZZOLATO UND MITARBEITERN (2012) einer ELG-Anbildung durch langzeitpersistierende Leptospiren in der Niere des Schweines, erscheint der Gedanke einer möglichen Anbildung des in dieser Arbeit untersuchten ELG in der Lunge auf mikrobieller Basis keinesfalls abwegig. *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) ist mit einer Persistenzdauer von 185 Tagen im Respirationstrakt beschrieben worden (FANO et al., 2005). Ein Antigen-Nachweis von Mh mittels in situ-Hybridisierung konnte im chronischen Verlauf einer Mh-Infektion auch in tieferen Anteilen der Lunge wie dem Alveolarepithel und in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (KWON et al., 2002). Sodass eine daraus resultierende chronische Entzündung auch im subpleuralen oder septalen Bereich zur Anbildung des dort beobachteten ELG geführt haben könnte. PALMIERI UND MITARBEITER (2007) beobachteten ektopisches lymphatisches Gewebe in der Lunge von Wildschweinen und erwähnen einen möglichen parasitär bedingten Zusammenhang aufgrund gleichzeitig beobachteter Helminthen in der Lunge. Das von ihnen beobachtete ELG bestand aus mehreren lymphatischen Follikeln, die meist von einer dünnen bindegewebigen Kapsel umgeben waren. Die Lage des ELG in der Wildschweinelunge wurde sowohl subpleural als auch im Lungengewebe beobachtet. Eine Assoziation zu Lymphgefäßen wie in der vorliegenden Arbeit wird nicht beschrieben. Interessanterweise ist das BALT in den Wildschweinelungen verglichen mit dem ELG wenig bis gar nicht organisiert beschrieben worden. Das in der Wildschweinelunge beschriebene ELG ähnelt in seiner Morphologie wenig der dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten ELG. Daraus wiederum könnte geschlussfolgert werden, dass ELG in der Lunge verschiedene Ausprägungen haben kann. Daher könnte man annehmen, dass das in der vorliegenden Arbeit untersuchte, sich durchweg ähnlich darstellende ELG, womöglich auch ähnlicher Pathogenese ist. Es ist in seiner stets subpleuralen und paraseptalen Lage immer

in der Nachbarschaft von Lymphgefäßen beobachtet worden. Daher könnte dieser Befund womöglich die Vermutung von THAUNAT UND MITARBEITERN (2006) unterstützen, dass eine anhaltende lokale Antigenstimulation und chronische Entzündung nicht allein die Ursache für die Anbildung von ELG sind. Es ist ihrer Vermutung nach ein die Entzündung begleitender Lymphgefäßstau mitverantwortlich. Die Neogenese ektopischen lymphatischen Gewebes resultiert folglich aus fokalen Ansammlungen von Lymphozyten, die in ihrer Abwanderung aus dem chronisch entzündeten Organ behindert sind. Diese Theorie könnte dann auch die vorrangig kranial in der Lunge beobachtete ELG-Anbildung erklären. In kranialen Lungenlappen spielt gravitationsbedingt möglicherweise ein erschwerter Lymphabfluss eine Rolle (SORENSEN et al., 2006).

Zusammenfassend kann das Ektopische lymphatische Gewebe (ELG) in der Lunge des Schweines mit mikroskopischen Läsionen einer Enzootischen Pneumonie als ein tertiäres lymphatisches Gewebe mit einem wenig komplexen Aufbau bei konsequentem Lymphgefäßbezug charakterisiert werden. Es besteht hauptsächlich aus einem lymphatischen Follikel, d.h. es kommen überwiegend B-Zellen im ELG vor. Der Follikel liegt immer einem subpleuralen oder septalen Lymphgefäß benachbart. T-Zellareale und hochendothelisierte Venolen (HEV) können nicht beobachtet werden. Die Verteilung des ELG innerhalb der Lunge ist vorrangig in kranialer gelegenen Lungenlappen zu beobachten. Die vorliegenden Ergebnisse der Charakterisierung des ELG bieten reichlich Anstoß für weiterführende Untersuchungen. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf der Klärung der tatsächlichen Funktion des ELG im Abwehrsystem der Lunge des Schweines liegen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, tertiäre lymphatische Gewebe in der Lunge des Schweines histologisch und immunhistochemisch zu charakterisieren. Tertiäre lymphatische Gewebe sind zum Zeitpunkt der Geburt nicht vorhanden. Sie werden erst unter krankhaften Bedingungen angebildet, wie bei einer Enzootischen Pneumonie. Tertiäres lymphatisches Gewebe in der Lunge des Schweines besteht aus dem Bronchiolus-assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) und dem Ektopischen lymphatischen Gewebe (ELG). Die Charakterisierung beider Gewebe erfolgte in Bezug auf Morphologie und Verteilung ihrer Anbildung innerhalb der Lunge.

Es wurde festgestellt, dass das vollständig angebildete BALT des Schweines aus folgenden Komponenten besteht: 1) Lymphoepithel, 2) Follikel-assoziierte Lamina propria 3) Follikel mit Keimzentrum, die in Nachbarschaft von Blut- und Lymphgefäßen liegen und 4) T-Zellareale mit hochendothelisierten Venolen.

Anders als das BALT hat das ELG keine räumliche Verbindung mit Bronchioli. Das ELG liegt immer in der Nachbarschaft von Lymphgefäßen, die unter dem Serosaüberzug der Lunge und im Bindegewebe zwischen den Läppchen der Lunge verlaufen. Außerdem ist das ELG gegenüber dem BALT von einfacherem Aufbau.

Neben dem vollständig angebildeten BALT können Vorstufen im Rahmen seiner Anbildung unterschieden werden, die nicht alle oben genannten Komponenten aufweisen. Für die Einteilung der unterschiedlichen Anbildungsstufen des BALT sind die Anbildungsgrade geringgradig (+), mittelgradig (++) und hochgradig (+++) definiert worden. Das hochgradig angebildete BALT (+++) entspricht dabei dem vollständig angebildeten BALT mit allen Komponenten. Im Vergleich verschiedener Lungenlappen ist das BALT unterschiedlich verteilt. Darüber hinaus weist dieses unterschiedlich verteilte BALT unterschiedliche Anbildungsgrade auf. Das hochgradig angebildete BALT (+++) ist vorwiegend an den Bronchioli der kranialen Lungenlappen zu beobachten. Das ELG kommt im Vergleich zum BALT weitaus weniger häufig in den untersuchten Lungenlappen vor. Es bildet sich bevorzugt in den vorderen Lungenlappen an.

Anhand der erfolgten Charakterisierung des BALT in der Lunge des Schweines kann geschlussfolgert werden, dass das hochgradig angebildete BALT durch

vollständige Ausprägung seiner Komponenten dem Aufbau anderer Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe entspricht. Die Voraussetzung für eine lokale oder auch weiterführende Funktion im Immunsystem der Schleimhäute des Schweines ist damit erfüllt. Neben dem BALT kann auch ein ELG als tertiäres lymphatisches Gewebe beobachtet werden. Sein Aufbau ist jedoch weniger komplex.

VII. SUMMARY

The purpose of the present study was the histological and immunohistochemical characterization of tertiary lymphoid tissues in the lung of the pig. Tertiary lymphoid tissues are not present at the time of birth. They are formed only under pathological conditions, such as enzootic pneumonia. Tertiary lymphoid tissues in the lung of the pig consist of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) and ectopic lymphoid tissue (ELT). The characterization of both tissues was carried out in terms of morphology and distribution within the lung.

It was established that the fully developed BALT of the pig consists of the following components: 1) lymphoepithelium, 2) follicle-associated lamina propria, 3) follicles with a germinal center, which are close to blood vessels or lymphatic vessels and 4) T-cell areas with high endothelial venules.

Unlike BALT the ELT has no spatial association with bronchioles. ELT is rather located in the neighborhood of lymphatic vessels, which run beneath the serous membrane of the lung and between the lobules of the lung. Furthermore, the structure of ELT is simple compared to BALT.

In addition to fully developed BALT prestages of its occurrence can be distinguished, which do not have all the components listed above. In order to classify the different developmental stages of BALT the developmental levels low (+), medium (++) and high (+++) were defined. Highly developed BALT (+++) corresponds to fully developed BALT with all its components. In comparison of different lung lobes BALT is distributed differently. Moreover, this differently distributed BALT also shows different levels of development. Highly developed BALT (+++) is mainly observed in the bronchioles of the cranial lung lobes. Compared to BALT the ELT is much less common in the examined lung lobes. It occurs preferably in the anterior lobes of the lung.

Based on the performed characterization of BALT in the lung of the pig it can be concluded that fully developed BALT with all its components corresponds to the structure of other mucosa-associated lymphoid tissues. Thus the requirement for a local or advanced role in the immune system of the mucous membranes of the pig is fulfilled. In addition to BALT, ELT also can be observed as tertiary lymphoid tissue. However, its structure is less complex.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Allen CDC, Okada T, Cyster JG, 2007, Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 27, 190-202.

Allen CDC, Cyster JG, 2008, Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Seminars in Immunology* 20, 14-25.

Anonymous, 2012, Nomina Anatomica Veterinaria. Nomenclature. Editorial Committee Hannover (Germany), Columbia MO (USA), Ghent (Belgium), Sapporo (Japan), 58.

Asai T, Okada M, Ono M, Irisawa T, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S, 1993, Increased levels of tumor-necrosis-factor and interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma-hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 38, 253-60.

Asai T, Okada M, Ono M, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S, 1994, Detection of interleukin-6 and prostaglandin E2 in bronchoalveolar lavage fluids of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 44, 97-102.

Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG, 2005, Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *American Journal of Transplantation* 5, 510-6.

Baio P, Brucato A, Buskila D, Gershwin ME, Giacomazzi D, Lopez LR, Luzzati R, Matsuura E, Selmi C, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, 2008, Autoimmune diseases and infections: controversial issues. *Clinical and Experimental Rheumatology* 26, 74-80.

Baskerville A, 1970, Ultrastructural studies of the normal pulmonary tissue of the

pig. *Research in Veterinary Science* 11, 150-5.

Baskerville A, 1972, Development of the early lesions in experimental enzootic pneumonia of pigs: an ultrastructural and histological study. *Research in Veterinary Science* 13, 570-8.

Baskerville A, Cox CS, Stirrup JA, 1978, Quantitative studies on the development of the bronchi and bronchial glands of the pig from birth to maturity. *Acta Anatomica (Basel)* 100, 386-90.

Baum H, 1938, Das Lymphgefäßsystem des Schweines. Grau H (editor). *Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin*. 72-77.

Beyaz F, Ergun E, Bayraktaroglu A, Ergun L, 2010, Identification of intestinal m-cells in isolated lymphoid follicles and peyer's patches of the angora rabbit. *Cell and Tissue Research* 341, 417-27.

Bienenstock J, M.R.C.P., Johnston N, Perey DYE, M.D., 1973a, Bronchial lymphoid tissue. I. morphologic characteristics. *Laboratory Investigation* 28, 686-92.

Bienenstock J, M.R.C.P., Johnston N, Perey DYE, M.D., 1973b, Bronchial lymphoid tissue. II. functional characteristics. *Laboratory Investigation* 28, 693-8.

Bienenstock J, Johnston N, 1976, A morphologic study of rabbit bronchial lymphoid aggregates and lymphoepithelium. *Laboratory Investigation* 35, 343-8.

Bienenstock J, Befus D, 1984, Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue. *The American Journal of Anatomy* 170, 437-55.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Lannic JL, Gouranton J, Kobisch M, 1992, Electron microscopic observation of the respiratory tract of spf piglets inoculated with *mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 30, 329-41.

Bockman DE, Cooper MD, 1973, Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in bursa of fabricius, appendix, and peyers patches - electron-microscopic study. *American Journal of Anatomy* 136, 455-77.

Boehm T, Hess I, Swann JB, 2012, Evolution of lymphoid tissues. *Trends in Immunology* 33, 315-21.

Brandtzaeg P, Pabst R, 2004, Let's go mucosal: communication on slippery ground. *Trends in Immunology* 25, 570-7.

Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW, 2008, Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology* 1, 31-7.

Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD, 2008, Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Seminars in Immunology* 20, 26-42.

Caswell JL, Williams KJ, 2007, The respiratory system. In: Jubb, Kennedy & Palmer's *Pathology of Domestic Animals*, 5th edn. Grant Maxie M (editor). Elsevier Saunders, Edinburgh, New York. 591-2.

Chambaud I, Wróblewski H, Blanchard A, 1999, Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends in Microbiology* 7, 493-9.

Choi C, Kwon D, Jung K, Ha Y, Lee YH, Kim O, Park HK, Kim SH, Hwang KK, Chae C, 2006, Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology* 134, 40-6.

DeBey MC, Ross RF, 1994, Ciliostasis and loss of cilia induced by mycoplasma hyopneumoniae in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity* 62, 5312-8.

- Delventhal S, Hensel A, Petzoldt K, Pabst R, 1992, Effects of microbial stimulation on the number, size and activity of bronchus-associated lymphoid-tissue (BALT) structures in the pig. *International Journal of Experimental Pathology* 73, 351-7.
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH, 2006, Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology* 7, 344-53.
- Fano E, Pijoan C, Dee S, 2005, Dynamics and persistence of mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 69, 223-8.
- Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R, 1994, Cytokeratin 18 is an m-cell marker in porcine peyer's patches. *Cell and Tissue Research* 276, 213-21.
- Gebert A, Pabst R, 1999, M cells at locations outside the gut. *Seminars in Immunology* 11, 165-70.
- Goodwin RFW, 1985, Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds - search for possible causes. *Veterinary Record* 116, 690-4.
- Gröne A, Wohlsein P, Baumgärtner W, 2007, Lymphatische Organe. In: *Pathohistologie für die Tiermedizin*. Baumgärtner W (editor). Enke Verlag, Stuttgart. 108.
- Hermeyer K, Buchenau I, Thomasmeyer A, Baum B, Spargser J, Rosengarten R, Hewicker-Trautwein M, 2012, Chronic pneumonia in calves after experimental infection with mycoplasma bovis strain 1067: characterization of lung pathology, persistence of variable surface protein antigens and local immune response. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54, 9-20.
- Huang YT, Chu RM, Liu RS, Weng CN, 1990, Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid-tissues in swine. *Veterinary*

Immunology and Immunopathology 25, 13-22.

Jacques M, Blanchard B, Foiry B, Girard C, Kobisch M, 1992, In vitro colonization of porcine trachea by mycoplasma hyopneumoniae. Annals of Veterinary Research 23, 239-47.

Jericho KW, 1970, Intrapulmonary lymphoid tissue of healthy pigs. Research in Veterinary Science 11, 548-52.

Jericho KWF, Derbyshire JB, Jones JET, 1971, Intrapulmonary lymphoid tissue of pigs exposed to aerosols of haemolytic streptococcus group L and porcine adenovirus. Journal of Comparative Pathology 81, 1-11.

Klein EE, 1873, The Anatomy of the Lymphatic System/II. In: The Lung. Smith, Elder and Co, London. 20-8.

Kobisch M, Blanchard B, Le Potier MF, 1993, Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. Veterinary Research 24, 67-77.

Kraehenbuhl JP, Neutra MR, 1992, Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. Physiological Reviews 72, 853-79.

Kwon D, Choi C, Chae C, 2002, Chronologic localization of mycoplasma hyopneumoniae in experimentally infected pigs. Veterinary Pathology 39, 584-7.

Liebler-Tenorio EM, Pabst R, 2006, MALT structure and function in farm animals. Veterinary Research 37, 257-80.

Liu CH, Chu RM, 1984, The morphologic studies of bronchus-associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pigs. Journal of the Chinese Society of Veterinary Science 10, 85-91.

- Livingston CW, Mebus CA, Underdahl N. R., Stair EL, 1972, Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *American Journal of Veterinary Research* 33, 2249-58.
- Lorentziadis M, Chamogeorgakis T, Toumpoulis IK, Karayannacos P, Dosios T, 2005, Topographic anatomy of bronchial arteries in the pig: a corrosion cast study. *Journal of Anatomy* 207, 427-32.
- Lorenzo H, Quesada O, Assuncao P, Castro A, Rodriguez F, 2006, Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 109, 199-207.
- Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A, 1996, Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly* 18, 104-9.
- Maina JN, van Gils P, 2001, Morphometric characterization of the airway and vascular systems of the lung of the domestic pig, *Sus scrofa*: comparison of the airway, arterial and venous systems. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology* 130, 781-98.
- Meyns T, Maes D, Calus D, Ribbens S, Dewulf J, Chiers K, de Kruif A, Cox E, Decostere A, Haesebrouck F, 2007, Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Veterinary Microbiology* 120, 87-95.
- Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, 1995, Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59, 197-204.
- Müller J, 1906, Zur vergleichenden Histologie der Lungen unserer Haussäugetiere (Dissertation). Bonn: F. Cohen: Grossherzoglich-Hessische Ludwigs-Universität zu Gießen (Justus Liebig-Universität Gießen).

Murphy K, 2012, Janeway's immunobiology, 8th edn. Garland Science, Taylor and Francis Group, London and New York. 9-21.

Murtaugh MP, Foss DL, 2002, Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87, 109-21.

Myers RK, McGavin MD, 2009, Allgemeine Pathologie. In: Pathologie der Haustiere. McGavin MD, Zachary JF (editors). Elsevier GmbH, München. 34.

Nakakuki S, 1994, Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. *Journal of Veterinary Medical Science* 56, 685-9.

Neurand K, Wissdorf H, Messow C, 1970, Beitrag zur Bronchialverzweigung beim Schwein. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 83, 467-70.

Nickel R, Schummer A u. Seiferle E, 1999, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II: Eingeweide, 8. Edition. Frewein J, Gasse H, Leiser R, Roos H, Thomé H, Vollmerhaus B, Waibl H (editors). Parey, Berlin. 269.

Owen RL, 1977, Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine: an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72, 440-51.

Pabst R, 1987, The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anatomy and Embryology (Berlin)* 176, 135-44.

Pabst R, Gehrke I, 1990, Is the bronchus-associated lymphoid-tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 3, 131-5.

Pabst R, Binns RM, 1994, The immune system of the respiratory tract in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43, 151-6.

- Pabst R, 1996, The respiratory immune system of pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 191-5.
- Pabst R, 2007, Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs: what are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunology Letters* 112, 1-8.
- Pabst R, Tschernig T, 2010, Bronchus-associated lymphoid tissue: an entry site for antigens for successful mucosal vaccinations? *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology* 43, 137-41.
- Palmieri C, Brunetti M, Della Salda L, 2007, Immunohistochemical characterization of kisselev nodules (ectopic lymphoid follicles) in wild boar (*sus scrofa l.*). *Research in Veterinary Science* 83, 109-15.
- Pezzolato M, Maina E, Lonardi S, Bozzetta E, Grassi F, Scanziani E, Radaelli E, 2012, Development of tertiary lymphoid structures in the kidneys of pigs with chronic leptospiral nephritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145, 546-50.
- Piffer IA, Ross RF, 1984, Effect of age on susceptibility of pigs to mycoplasma hyopneumoniae pneumonia. *American Journal of Veterinary Research* 45, 478-81.
- Racz P, Tenner-Racz K, Myrvik QN, Fainter LK, 1977, Functional architecture of bronchial associated lymphoid tissue and lymphoepithelium in pulmonary cell-mediated reactions in the rabbit. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 22, 59-83.
- Randall TD, Carragher DM, Rangel-Moreno J, 2008, Development of secondary lymphoid organs. *Annual Review Immunology* 26, 627-50.
- Razin S, 1992, Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating

prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters* 100, 423-31.

Razin S, Yogev D, Naot Y, 1998, Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1094-156.

Redondo E, Masot AJ, Fernandez A, Gazquez A, 2009, Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology* 140, 260-70.

Rodriguez F, Sarradell J, Poveda JB, Ball HJ, Fernandez A, 2000, Immunohistochemical characterization of lung lesions induced experimentally by mycoplasma agalactiae and mycoplasma bovis in goats. *Journal of Comparative Pathology* 123, 285-93.

Rodriguez F, Fernandez A, Oros J, Ramirez AS, Luque R, Ball HJ, Sarradell J, 2001, Changes in lymphocyte subsets in the bronchus-associated lymphoid tissue of goats naturally infected with different mycoplasma species. *Journal of Veterinary Medicine: B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48, 259-66.

Rodriguez F, Ramirez GA, Sarradell J, Andrada M, Lorenzo H, 2004, Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology* 130, 306-12.

Rodriguez F, Quesada O, Poveda JB, Fernandez A, Lorenzo H, 2007, Immunohistochemical detection of interleukin-12 and interferon-gamma in pigs experimentally infected with mycoplasma hyopneumoniae. *Journal of Comparative Pathology* 136, 79-82.

Sarradell J, Andrada M, Ramirez AS, Fernandez A, Gomez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herraes P, Rodriguez F, 2003, A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with mycoplasma hyopneumoniae. *Veterinary Pathology* 40,

395-404.

Schmidt JA, Browning GF, Markham PF, 2004, *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology* 186, 5790-8.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segales J, 2009, Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal* 181, 221-31.

Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SHM, 1989, Structure and Function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *CRC Critical Reviews in Immunology* 9, 119-50.

Soerensen CM, Holmskov U, Aalbaek B, Boye M, Heegaard PM, Nielsen OL, 2005, Pulmonary infections in swine induce altered porcine surfactant protein D expression and localization to dendritic cells in bronchial-associated lymphoid tissue. *Immunology* 115, 526-35.

Sorensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, BilleHansen V, Jensen NE, Pedersen MW, 1997, *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology* 54, 23-34.

Sorensen V, Jorsal SE, Mousing J, 2006, Diseases of the Respiratory System. In: Diseases of Swine. Straw BE, Zimmermann JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (editors). Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 153.

Talanti S, 1959, Studies on the lungs in the pig. *Anatomischer Anzeiger* 106, 68-75.

Thacker EL, 2006, Mycoplasmal Diseases. In: Diseases of Swine, 9th edn. Straw BE, Zimmermann JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (editors). Blackwell Publishing Ltd,

Oxford. 701-7.

Thaunat O, Kerjaschki D, Nicoletti A, 2006, Is defective lymphatic drainage a trigger for lymphoid neogenesis? *Trends in Immunology* 27, 441-5.

Vranckx K, Maes D, Marchioro SB, Villarreal I, Chiers K, Pasmans F, Haesebrouck F, 2012, Vaccination reduces macrophage infiltration in bronchus-associated lymphoid tissue in pigs infected with a highly virulent mycoplasma hyopneumoniae strain. *BMC Veterinary Research* 8, 24-30.

Yamaguchi K, Schoefl GI, 1983, Blood vessels of the peyer's patch in the mouse: III. High-endothelium venules. *Anatomical Record* 206, 419-38.

IX. ANHANG

1. Befunddokumentation

Tab. 9: Befunddokumentation zur BALT-Untersuchung in 47 Lungen von Mastschweinen mit typischen mikroskopischen Läsionen einer Enzootischen Pneumonie. BALT = Bronchiolus-assoziiertes lymphatisches Gewebe; ELG = Ektopisches lymphatisches Gewebe; E-Nr. = Tagebuchnummer; x = positiv, 0 = negativ, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig; * Es wurden keine antimikrobiellen Substanzen innerhalb der letzten 15 Tage vor der Schlachtung verabreicht; M. = Mycoplasma; - = Ergebnis nicht vorhanden.

E-Nr.	Betrieb, Tier. (Original- kennung Schweineklarinik)	Histologie										Bakteriologie*	
		Interstitielle Pneumonie (alveolär & peribronchiolär)	Grad der BALT - Anbildung				Katarhalisch - eitrige Bronchopneumonie	ELG					
			Lokalisation					Lokalisation					
			1	2	3	4		1	2	3	4		
2128/10	A.4. (2.4.)	x	+++	+	+	+	+	0	x	0	0	0	negativ
2129/10	A.7. (2.7.)	x	++	++	+	+	+	x	x	0	0	0	negativ
2130/10	A.10. (2.10.)	x	+	+	+	+	+	x	0				-
2228/10	A.1. (3.1.)	x	++	++	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ
2229/10	A.5. (3.5.)	x	++	+++	+	+	+	x	x	0	0	0	M. hyorhinis
2230/10	A.6. (3.6.)	x	+	+	+	+	+	0	0				negativ
2231/10	A.8. (3.8.)	x	+++	+	+	+	0	0	0				negativ
2232/10	A.9. (3.9.)	x	+	+	++	+	+	0	0				negativ
2415/10	A.99. (6.9.)	x	++	+	+	+	+	x	0	x	0	0	negativ
2110/10	B.1. (4.1.)	x	+	++	+	+	+	x	0				M. hyorhinis

E-Nr.	Betrieb, Tier. (Original- kennung Schweineklunik)	Histologie										Bakteriologie*	
		Interstitielle Pneumonie (alveolär & peribronchiolär)	Grad der BALT - Anbildung				Katarrhalisch - eitrige Bronchopneumonie	ELG					
			Lokalisation					Lokalisation					
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
2256/10	B.2. (4.2.)	x	++	+	+	+	+	x	0	x	0	0	-
2111/10	B.3. (4.3.)	x	+	++	++	++	++	x	0	0	0	0	-
2257/10	B.4. (4.4.)	x	++	+	+	+	+	x	0	0	x	0	negativ
2258/10	B.5. (4.5.)	x	+	++	+	+	+	x	x	x	0	0	negativ
2112/10	B.6. (4.6.)	x	+	++	++	++	++	x	0	0	0	0	-
2113/10	B.7. (4.7.)	x	++	++	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ
2259/10	B.8. (4.8.)	x	+	+	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ
2260/10	B.9. (4.9.)	x	+	++	0	0	0	0	0	0	0	0	-
2261/10	B.10. (4.10.)	x	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	-
2181/10	C.3. (5.3.)	x	++	+++	+	+	+	x	0	x	0	0	M. hyorhinis
2182/10	C.6. (5.6.)	x	+++	++	+	+	++	x	0	0	0	0	M. hyorhinis
2183/10	C.8. (5.8.)	x	++	++	+	+	+	x	x	0	0	0	M. hyopneumoniae
2184/10	C.10. (5.10.)	x	++	++	+	+	+	x	x	0	0	0	negativ

E-Nr.	Betrieb, Tier. (Original- kennung Schweineklarinik)	Histologie											Bakteriologie* Ergebnis der kulturellen Untersuchung auf Mykoplasmen	
		Interstitielle Pneumonie (alveolär & peribronchiolär)	Grad der BALT - Anbildung				Katarhalisch - eitrige Bronchopneumonie	ELG						
			Lokalisation					Lokalisation						
			1	2	3	4		1	2	3	4			
2512/10	D.2. (7.2.)	x	++	++	0	++	0	++	0	0	0	0	M. hyopneumoniae	
2513/10	D.3. (7.3.)	x	+++	++	+	++	+	++	+	0	0	0	M. hyorhinis	
2514/10	D.9. (7.9.)	x	+++	+++	+	++	+	++	+	0	0	0	M. hyorhinis	
2515/10	E.1. (8.1.)	x	+	+	+	+	+	++	+	0	0	0	M. hyorhinis	
2516/10	E.4. (8.4.)	x	++	++	+	++	+	+	+	0	x	0	0	negativ
2722/10	F.1. (10.1.)	x	+	++	+	+	+	+	+	x	0	0	0	negativ
2723/10	F.5. (10.5.)	x	+	+	+	+	+	++	+	x	0	0	0	negativ
2724/10	F.6. (10.6.)	x	+	++	+	++	+	++	+	x	0	0	0	M. hyopneumoniae
2725/10	F.8. (10.8.)	x	+++	+++	+	+	+	++	+	+	+	+	0	negativ
2726/10	F.9. (10.9.)	x	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	0	negativ
2939/10	G.3. (11.3.)	x	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	0	M. hyopneumoniae
2940/10	G.4. (11.4.)	x	+	+	+	+	+	++	+	x	+	+	0	M. hyorhinis
2941/10	G.5. (11.5.)	x	++	++	0	+	+	+	+	x	+	+	0	negativ

E-Nr.	Betrieb, Tier. (Original- kennung Schweineklunik)	Histologie										Bakteriologie*						
		Interstitielle Pneumonie (alveolär & peribronchiolär)		Grad der BALT - Anbildung				Katarrhalisch - eitrig Bronchopneumonie		ELG				Ergebnis der kulturellen Untersuchung auf Mykoplasmen				
				Lokalisation						Lokalisation								
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4					
2942/10	G.6. (11.6.)	x	++	+++	+	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ				
2943/10	G.7. (11.7.)	x	++	++	+	+	++	x	0	0	0	0	negativ					
2944/10	G.9. (11.9.)	x	++	+	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ					
2945/10	G.10. (11.10.)	x	++	++	+	+	++	x	0	0	0	0	M. hyorhinis					
71/11	H.1. (12.1.)	x	++	++	+	+	++	x	0	0	0	0	M. hyopneumoniae, M. hyorhinis					
72/11	H.3. (12.3.)	x	+++	+	++	+	+	x	0	0	0	0	-					
73/11	H.6. (12.6.)	x	++	++	+	+	+	x	0	0	0	0	M. hyopneumoniae					
74/11	H.7. (12.7.)	x	++	+	+	+	+	x	0	0	0	0	negativ					
821/11	I.2. (15.2.)	x	+++	++	+	+	+	x	0	0	0	0	M. hyopneumoniae					
819/11	I.4. (15.4.)	x	++	+++	+	+	+	0	0	0	0	0	M. hyorhinis					
820/11	I.6. (15.6.)	x	+++	++	+	+	+	0	0	0	0	0	M. hyopneumoniae					

2. Geräte

Tab. 10: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Gerätetyp, sortiert nach ihrer fortlaufenden Nummerierung im Material- und Methodenteil.

Gerät ^x	Gerät	Hersteller	Gerätetyp
1	Taumler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach	Polymax 2040
2	Taumler	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen	Modell 4010
3	Kühlschrank	Liebherr- International Deutschland GmbH, Biberach a.d. Riß	
4	Schneidemaschine	Manconi & C. Srl, Sumirago VA (Italy)	350 VK TC
5	Entwässerungsautomat	Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau	Histomaster Modell 2050/Di
6	Paraffin- Einbettungssystem	MEDITE GmbH, Burgdorf	TES 99
7	Rotationsmikrotom	MICROM International GmbH, Berlin	HM 315
8	Streckbad	Daglef Patz KG, Wankendorf	
9	Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	
10	Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen	
11	Entwässerungsautomat	Shandon GmbH, Frankfurt	Citadel 1000

Gerät^x	Gerät	Hersteller	Gerätetyp
12	Hartschnitt- Rotationsmikrotom	MICROM International GmbH, Berlin	HM 360
13	Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Burgwedel	1052
14	Heizplatte	Axel Johnson Lab System, New York, USA	
15	Wasserbad mit Schütteloption	Gesellschaft für Labortechnik (GFL) mbH, Burgwedel	1083
16	Mikrowelle	LG Electronics, Seoul, Südkorea	Mh6339H
17	Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	DM 1000
18	Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach	MR 2000
19	Mikrowelle	Krups GmbH, Offenbach/Main	Moulinex Micro-Chef, FM B 735 A

3. Fixationsmedien

3.1. Formaldehyd, 4%ig, neutral gepuffert nach Lillie

Herstellung von Phosphatpuffer:

40 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (AppliChem, Darmstadt, A1373) mit 65 g di-Natriumhydrogenphosphat (AppliChem, Darmstadt, A1372) in 1 l Aqua dest. lösen.

1 l Phosphatpuffer mit 1 l Formaldehyd 37-40% (SAV-Liquid Production, Flintsbach a. Inn, Nr. FO-10000-37-1) zu 8 l Aqua dest. geben.

Ausreichend umrühren, pH-Wert 7,0 bis 7,4 überprüfen und ggf. mit 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt, Nr. 109060) oder 0,1 N NaOH (AppliChem, Darmstadt, Nr. 109141) einstellen.

3.2. Paraformaldehyd, 4%ig

Herstellung von Cacodylatpuffer:

10,7 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) und 4,15 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in 500 ml Aqua dest. geben und pH-Wert 7,2 einstellen.

Zum hergestellten Cacodylatpuffer 500 ml Aqua dest. (80°C) geben, anschließend 40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Nr. 1.04005) und 0,735 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) darin lösen.

Die Lösung auf einem Magnetrührer¹⁸ (Anhang IX.2.) auf 70°C erhitzen und abschließend 1 N NaOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 35256) zugeben bis die Lösung klar geworden ist. Bei Raumtemperatur abkühlen lassen und pH-Wert 7,2 einstellen. Lagerung bei 4°C.

4. Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte

4.1. 70%iges Ethanol

7000 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr.0641) mit 2600 ml

Aqua dest. mischen.

4.2. Häkalaun-Eosin-Färbung

4.2.1. 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

Entspricht einer Herstellung aus

7000 ml 96%igem Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit 2500 ml Aqua dest. und 100 ml 25%iger Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030).

4.2.2. 0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung

100 ml 1%ige HCl-Ethanol-Lösung (Anhang IX.4.2.1.) mit 100 ml 70%igem Ethanol (Anhang IX.4.1.) mischen.

4.2.3. 1%ige Eosin-Lösung

Entspricht einer Herstellung aus

10 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in 1000 ml erhitztem Aqua dest. lösen, dazu 1,5 ml 100%igen Eisessig (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0820) geben.

Anschließend filtrieren.

4.3. Färbung nach Giemsa

4.3.1. 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung

Entspricht einer Herstellung aus

97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 13,61 g/l (AppliChem, Darmstadt, Nr. 1.01960) und 2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 14,19 g/l (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960), nach Mischung und Erwärmung auf 80°C Hinzugabe von 7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204).

pH-Wert 5,0 einstellen und filtrieren.

4.3.2. 0,5%ige Essigsäure

5ml 100%ige Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0820)

mit 995 ml Aqua dest. mischen.

5. Lösungen für die Kunststoffeinfettung

5.1. Spüllösung

Herstellung eines 0,1 M Cacodylatpuffer:

16,5 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 8.20670) mit 6,23 ml 1 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1040) in 1500 ml Aqua dest. lösen. pH-Wert 7,2 einstellen.

In dem 0,1 M Cacodylatpuffer 105 g Saccharose (VWR International GmbH, Darmstadt, Nr. 27483.294) und 1,105 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Nr. 1.02382) lösen. pH-Wert 7,2 einstellen.

5.2. Einbettungsmedien

Herstellung eines Einbettungsmedium A aus

60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (Merck, Darmstadt, Nr.8.00588), 20 ml Methacrylsäuremethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.05900), 16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Merck, Darmstadt, Nr. 8.01554) und 2 ml Polyethylenglykol 400 (Merck, Darmstadt, Nr. 8.17003). Anschließend 338 mg Benzoylperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 517909-500G) darin lösen.

Für das Einbettungsgemisch B zur Auspolymerisation

60 µl N-N Dimethylanilin (Merck, Darmstadt, Nr. 803060) zu 40 ml Einbettungsmedium A dazugeben.

6. Lösungen für die Färbung der Kunststoffschritte

6.1. Hämaun-Eosin-Phloxin-Färbung

6.1.1. 1%ige HCl-Ethanol-Lösung

10 ml einer 25%igen Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mit 700 ml 96% igem Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) und 250 ml Aqua dest. mischen.

6.1.2. Stammlösung Eosin

1,0 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.3. Stammlösung Phloxin

1,0 g Phloxin (Merck, Darmstadt, Nr. 15926) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

6.1.4. Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung

Entspricht einer Herstellung aus

468 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641),
30 ml Stammlösung Eosin,
3 ml Stammlösung Phloxin und
2,4 ml 96%iger Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0458).

Anschließend filtrieren.

6.2. Färbung nach Giemsa**6.2.1. 7%ige Giemsa-Gebrauchslösung**

Entspricht einer Herstellung aus

97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 13,61 g/l
(AppliChem, Darmstadt, Nr. 1.01960) und
2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 14,19 g/l
(Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960), nach Mischung und Erwärmung
auf 80°C Hinzugabe von 7 ml Giemsa-Azur-Eosin-
Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204).

pH-Wert 5,0 einstellen und filtrieren.

6.2.2. 0,5%ige Essigsäure

5ml 100%ige Essigsäure (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0820) mit
995 ml Aqua dest. mischen.

6.3. PAS-Reaktion

6.3.1. 1%ige Perjodsäure

Ansetzen von zwei Lösungen:

A) 10 g Perjodsäure (Sigma, St. Louis, USA, Nr. P7875) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

B) 1,6 g Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Nr. 6268) in 100 ml Aqua dest. lösen.

A und B mischen. Im Kühlschrank aufbewahren.

6.4. Modifizierte Versilberung nach AVALLONE

(AVALLONES Modifizierung von JONES Silbermethenamin-Färbung)

6.4.1. 1%ige Perjodsäure

Ansetzen von zwei Lösungen:

A) 10 g Perjodsäure (Sigma, St. Louis, USA, Nr. P7875) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

B) 1,6 g Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Nr. 6268) in 100 ml Aqua dest. lösen.

A und B mischen. Im Kühlschrank aufbewahren.

6.4.2. 5%ige Silbernitrat-Stammlösung

5 g Silbernitrat (AppliChem, Darmstadt, Nr. A0536) in 100 ml Aqua dest. lösen. Im Kühlschrank aufbewahren.

6.4.3. 3%ige Methenamin-Lösung

2,16 g Methenamin (Merck, Darmstadt, Nr. 4343) in 72 ml Aqua dest. lösen und auf einem Magnetrührer¹⁸ (Anhang IX.2.) gründlich durchmischen. Frisch ansetzen.

6.4.4. 0.05M Borax-Lösung

19,07 g Borax (Serva, Heidelberg, Nr. 30216) in 1000 ml Aqua dest. lösen. Frisch ansetzen und kurz in der Mikrowelle¹⁹ (Anhang IX.2.) aufkochen.

6.4.5. Silbermethenamin-Gebrauchslösung

Ansetzen von drei Lösungen

- A) 72 ml einer frisch angesetzten 3%igen Methenamin-Lösung (Anhang IX.6.4.3.) mit 216 ml Aqua dest. mischen.
- B) 8 ml einer 5%igen Silbernitrat-Stammlösung (Anhang IX.6.4.2.) mit 24 ml Aqua dest. mischen.
- C) 8 ml einer 0,05M Borax-Lösung (Anhang IX.6.4.4.) mit 24 ml Aqua dest. mischen.

A zu B hinzugeben, durch Schwenken den gebildeten weißen Niederschlag sofort auflösen. Anschließend C hinzugeben.

Gebrauchslösung filtrieren und 3 Minuten im Schüttelwasserbad¹⁵ (Anhang IX.2.) bei 65°C vorwärmen. Gebrauchslösung nicht mit Laborbesteck aus Metall (z.B. Küvettenhalter, Pinzetten) in Kontakt bringen.

6.4.6. 1%ige Goldchlorid-Stammlösung

1 g Tetrachlorogoldsäure-Trihydrat ($\geq 99,5\%$, Merck, Darmstadt, Nr. 1.01582.001) in 100 ml Aqua dest. lösen.

6.4.7. 0,1%ige Goldchlorid-Gebrauchslösung

10 ml einer 1%igen Goldchlorid-Stammlösung (Anhang IX.6.4.6.) mit 90 ml Aqua dest. mischen.

6.4.8. 2 %iges Natriumthiosulfat

20 g Natriumthiosulfat (Merck, Darmstadt, Nr. 6512) in 1000 ml Aqua dest. lösen.

7. Lösungen für die Immunhistochemie**7.1. 1%ige Wasserstoffperoxidlösung**

6 ml 30%ige H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) mit 174 ml Aqua dest. mischen.

7.2. 0,05 M Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7,6

60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab,

Heidelberg, Nr. 5670) in 700 ml Aqua dest. lösen und mit 2 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 5150) den pH-Wert 7,6 einstellen. Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH-Wert überprüfen. 90 g NaCl darin lösen und pH-Wert überprüfen.

Für die Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen und pH-Wert 7,6 einstellen.

7.3. Tris/EDTA-Puffer pH 9,0

2,42 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670) und 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. E-5134) in 2000 ml Aqua dest. lösen. Mit 1 N HCl den pH-Wert 9,0 einstellen.

7.4. 10 mM Citratpuffer pH 6,0

4,2 g Citronensäure-Monohydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4345) in 2000 ml Aqua dest. lösen. Mit 2 N NaOH (neoLab, Heidelberg, Nr. 5630) pH-Wert 6,0 einstellen.

7.5. H₂O₂-DAB-Gebrauchslösung

10 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Dihydrat-Tablette (Biotrend, Köln, Nr. 4170) in 10 ml Aqua dest. geben und im Dunkeln lösen lassen. Anschließend filtrieren.

Vor Gebrauch mit 1 µl 30%iger H₂O₂-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) pro 1 ml DAB-Lösung versetzen.

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Immunhistochemisch dargestellte Antigene bestimmter Zellpopulationen im BALT.	32
Tab. 2: Vorbehandlungen im IHC-Protokoll.	33
Tab. 3: Behandlung der Schnitte mit Normalserum im IHC-Protokoll.	34
Tab. 4: Verwendete Primärantikörper im IHC-Protokoll.	34
Tab. 5: Verwendete Sekundärantikörper im IHC-Protokoll.	35
Tab. 6: Durchführung der ABC-Methode bei CD3 und CD20.	35
Tab. 7: Definitionen der Anbildungsgrade des BALT (0 bis +++).	42
Tab. 8: Die beobachteten Merkmale der vier Komponenten des BALT (Lymphoepithel, Follikel-assoziierte Lamina propria, Follikel, T-Zellareal mit HEV) in den verschiedenen Anbildungsgraden. Die aufgeführten Anbildungsgrade entsprechen den definierten Graden der Tab. 7. Für die Beurteilung der Komponenten wurde eine BALT-Anbildung nur ausgewählt, wenn Lymphozyteninfiltrate mindestens in den Komponenten Follikel, Follikel-assoziiertes Lamina propria und Lymphoepithel zu sehen waren. + = Komponentenmerkmal ausgeprägt, - = Komponentenmerkmal nicht ausgeprägt, +/- = Komponentenmerkmal sowohl ausgeprägt als auch nicht ausgeprägt beobachtet. Ep. Modifikation = Epitheliale Modifikation, Lz. Infiltration = Lymphozytäre Infiltration, Follikel-ass. L. propria = Follikel-assoziierte Lamina propria, HEV = hochendothelisierte Venole.	77
Tab. 9: Befunddokumentation zur BALT-Untersuchung in 47 Lungen von Mastschweinen mit typischen mikroskopischen Läsionen einer Enzootischen Pneumonie. BALT = Bronchiolus-assoziiertes lymphatisches Gewebe; ELG = Ektopisches lymphatisches Gewebe; E-Nr. = Tagebuchnummer; x = positiv, 0 = negativ, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig; * Es wurden keine antimikrobiellen Substanzen innerhalb der letzten 15 Tage vor der Schlachtung verabreicht; M. = Mycoplasma; - = Ergebnis nicht vorhanden.	116
Tab. 10: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe und Gerätetyp, sortiert nach ihrer fortlaufenden Nummerierung im Material- und Methodenteil.	120

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung eines humanen Schleimhaut-Immunsystems:

Das Induktions-Kompartiment für T- und B-Lymphozyten wird durch das MALT verschiedener Schleimhautlokalisationen präsentiert (links in der Abb.). Über die M-Zellen (M) im Follikel-assoziierten Epithel erfolgt ein aktiver Transport von exogenen Antigenen zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APC): den Dendritischen Zellen (DC), Makrophagen, B-Zellen und Follikulären dendritischen Zellen (FDC). Naive T- und B-Lymphozyten gelangen über hochendothelisierte Venolen (HEV) in das MALT. Nachdem sie im Rahmen der Antigenpräsentation zu T- und B-Gedächtniszellen geprägt wurden, wandern sie aus dem MALT über das Lymphgefäßsystem ins periphere Blut. Die Gedächtniszellen gelangen mittels Extravasation, die durch spezielle Endothelzelloberflächenprofile gesteuert wird, in das Effektor-Kompartiment des Schleimhaut-Immunsystems (hier am Beispiel der Darmschleimhaut rechts in der Abb.). Als sogenannte Effektorzellen agieren aus der Gruppe der T-Gedächtniszellen die T-Helfer-Zellen (CD4) und zytotoxischen T-Zellen (CD8) und aus der Gruppe der B-Gedächtniszellen die Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen (IgM, IgA und IgG). Außerdem werden SIgA und SIgM produziert, die selektiv über den sogenannten Polymer-Ig-Rezeptor (sekretorische Komponente) (pIgR/SC) durch das Epithel auf die Lumenseite transportiert werden können. Modifiziert nach BRANDTZAEG & PABST (2004). 7

Abb. 2: Die Lokalisationen für die Entnahme von Lungengewebe am Schlachthof: *Lobus cranialis sinister* (1), *Lobus medius* (2), *Lobus caudalis sinister* (3) und *Lobus caudalis dexter* (4). Schweinelunge in Dorsalansicht, modifiziert nach NICKEL UND MITARBEITERN (1999)..... 24

Abb. 3: Mit der Lupe ist ein kleinerer Bronchus (\varnothing ca. 2 mm) noch deutlich mit seinem knorpeligen Gerüst und einem weitleumigen Anschnitt erkennbar (1), die kleineren Atemwegslumina (≤ 1 mm) der Bronchioli (2) sind dagegen kaum im Lungenparenchym erkennbar (oben); in der

- Histologie bestätigt sich der makroskopisch identifizierte Bronchus durch Spangen von hyalinem Knorpel (3), die Bronchioli sind zahlreich im Parenchym zu erkennen (4)..... 38
- Abb. 4: BALT-Anbildung (1) an einem distalen *Bronchiolus*; die Muskelschicht besteht noch etwa aus 2 Zelllagen (Pfeil) und das Flimmerepithel (Pfeilkopf) ist einfach hochprismatisch; HE-Färbung 39
- Abb. 5: Die Wand des *Bronchiolus respiratorius* (1) hat nur noch vereinzelte Muskelzellen, die keine durchgehende Muskelschicht mehr bilden (Pfeil); die epitheliale Auskleidung ohne Kinozilien ist zunächst noch isoprismatisch (Pfeilkopf) und wird in Richtung des *Ductus alveolaris* zunehmend flacher (2); BALT-Anbildung kann an diesem Bronchiolus-Typ nicht beobachtet werden; HE-Färbung. 39
- Abb. 6: Histologische Darstellung der Grade einer BALT-Anbildung 0 bis +++..... 42
- Abb. 7: Häufigkeit der BALT-Anbildungsgrade in den untersuchten Lungenlokalisationen (n=188). 43
- Abb. 8: Anzahl der Lungen (n=47) mit der jeweils pro Lunge ermittelten Differenz (0, 1, 2, 3) ihrer BALT-Anbildungsgrade. Die Differenz wird anhand des höchsten und niedrigsten BALT-Anbildungsgrades in 4 verschiedenen Lokalisationen innerhalb der einzelnen Lunge ermittelt. .. 44
- Abb. 9: Prozentuale Verteilung der BALT-Anbildungsgrade negativ (neg.) bis hochgradig (hgr.), die jeweils in den Lokalisationen 1 (kranial) bis 4 (kaudal) in 47 Lungen ermittelt wurden (neg.=negativ, ggr.=geringgradig, mgr.=mittelgradig, hgr.=hochgradig)..... 45
- Abb. 10: Schematische Darstellung der Komponenten eines vollständig angebildeten BALT des Schweines: Lymphoepithel (1); Follikel-assoziierte Lamina propria (2); Follikel mit Keimzentrum (3), in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen (a, b); T-Zellareal mit HEV (4)..... 47
- Abb. 11: Histologie des vollständig angebildeten BALT des Schweines: Lymphoepithel (1); Follikel-assoziierte Lamina propria (2); Follikel mit Keimzentrum (3), in Nachbarschaft von Lymph- und Blutgefäßen (a, b); T-Zellareal mit HEV (4); HE-Färbung. 47
- Abb. 12: Epitheliale Auskleidung eines normalen Bronchiolus (*Bronchiolus terminalis*), bestehend aus Flimmerepithelzellen und Becherzellen (1);

- weiterhin sind die *Lamina propria* (2), die zirkuläre Muskelschicht (3) und das Peribronchiolum (4) zu erkennen, an das ein Lymphgefäß (5) grenzt; HE-Färbung. 49
- Abb. 13: Übersicht über das normale Epithel eines Bronchiolus: zwischen den Flimmerepithelzellen (1) liegen die PAS-positiven Becherzellen (2), außerdem treten vereinzelte intraepitheliale Lymphozyten (3) auf; PAS-Reaktion. 49
- Abb. 14: Normale Epithelzellen ruhen auf einer versilberbaren Basalmembran (Pfeile); Versilberung nach AVALLONE. 50
- Abb. 15: Übersicht über das Lymphoepithel, von den Epithelzellen ist vor allem ein lumennaher Zytoplasmasaum (Pfeile) zu erkennen, die Abgrenzung zu der basal liegenden Follikel-assoziierten *Lamina propria* (1) ist nicht möglich; die gegenüberliegende Seite des Bronchiolus weist eine normale, zur *Lamina propria* hin gut abgrenzbare Epithelzellauskleidung mit gut erkennbaren Zilien auf; HE-Färbung. 51
- Abb. 16: Das Zytoplasma der Epithelzellen ist häufig auf einen schmalen Streifen reduziert (1), die basale Begrenzung der Zellen ist nur abschnittsweise zu erahnen (2), lediglich der apikale Anteil der Zellen verbindet sich zu einem durchgehenden Saum (3); die Zellkerne der Epithelzellen liegen teils apikal, teils in schlanken Zytoplasmastreifen (Pfeile); HE-Färbung. 51
- Abb. 17: Übersicht eines Bronchiolus, neben dem normalen Epithel (1) ist das aufgelockerte Lymphoepithel mit schmalen Zytoplasmastreifen der Epithelzellen zu erkennen (2), die basale Begrenzung der Epithelzellen ist teilweise weniger deutlich zu erkennen (Pfeile). 52
- Abb. 18: Der Vergleich von normalem Epithel (oben) mit dem Lymphoepithel (unten) zeigt die Lückenhaftigkeit des Lymphoepithels und die damit verbundene kaum erkennbare basale Begrenzung (Pfeile). 52
- Abb. 19: Das normale Epithel (oben) ruht auf einer Basalmembran (Pfeile), im Bereich des Lymphoepithels (unten) ist keine Basalmembran zu erkennen; Versilberung nach AVALLONE. 53
- Abb. 20: Das normale Epithel (oben) zeigt in regelmäßigen Abständen die PAS-positiven Granula der Becherzellen, im Lymphoepithel (unten) sind sie nur ganz vereinzelt zu erkennen (Pfeil); PAS-Reaktion. 54

- Abb. 21: Neben einem normalen Bronchiolusepithelzellverband (1) liegt ein lymphoepithelialer Schleimhautabschnitt (2), in dem freie Zellen hauptsächlich als Lymphozyten zu erkennen sind; es sind sowohl kleine Lymphozyten (Pfeile) als auch mittelgroße Lymphozyten (Pfeilköpfe) vertreten; Färbung nach Giemsa..... 55
- Abb. 22: Neben kleinen Lymphozyten finden sich in geringer Anzahl Plasmazellen im Lymphoepithel (1), außerdem neben intakten Lymphozyten auch zahlreiche Kerntrümmer (2) sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten (3); Färbung nach Giemsa. 55
- Abb. 23: Zahlreich liegen die CD20-positiven B-Lymphozyten zwischen den Epithelzellen des Lymphoepithels (unten), im normalen Epithel (oben) sind sehr vereinzelt positive Zellen zu finden; außerdem ist eine basale Begrenzung des Lymphoepithels, wie sie im normalen Epithel zu sehen ist, nicht erkennbar. 57
- Abb. 24: Vereinzelt liegen die CD3-positiven T-Lymphozyten im Lymphoepithel (unten), auch zwischen den Zellen des normalen Epithels (oben) liegen vereinzelt CD3-positive T-Lymphozyten, die Zelldichte scheint annähernd gleich. 57
- Abb. 25: An das basal undeutlich abgegrenzte Lymphoepithel (1) schließt sich die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) an, im Vergleich zur gegenüberliegenden normalen Lamina propria (oben) ist die Follikel-assoziierte Lamina propria verdickt und scheint zu der beetartigen Vorwölbung des Lymphoepithels in das Lumen beizutragen; HE-Färbung..... 59
- Abb. 26: Bei hochgradiger BALT-Anbildung mit mehreren Follikeln (1) überwiegt der Anteil der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) gegenüber normaler Lamina propria (3), das Lumen des Bronchiolus ist sichtlich eingengt und bei Vorliegen einer katarrhalisch-eitriger Bronchopneumonie außerdem mit eitrigem Schleim gefüllt (4); HE-Färbung..... 59
- Abb. 27: Die Follikel-assoziierte Lamina propria (1) enthält wie das Lymphoepithel (2) zahlreiche Lymphozyten, es sind Lymphozyten mit einem kleinen dunklen Zellkern (Pfeile) und solche mit einem mittelgroßen Zellkern und deutlichem Nukleolus (Pfeilköpfe); HE-Färbung..... 60

- Abb. 28: In Lymphoepithel (1), Follikel-assoziiertes Lamina propria (2) und Follikel (3) sind in der immunhistochemischen Darstellung gleichermaßen zahlreiche CD20-positive B-Lymphozyten (links) und vereinzelt CD3-positive T-Lymphozyten vertreten (rechts)..... 60
- Abb. 29: Zwischen Lymphoepithel (1) und Follikel (3) ist die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) deutlich an den zahlreichen Plasmazellen mit ihrem dunkelblauen (stark basophilen) Zytoplasma zu erkennen; Färbung nach Giemsa..... 62
- Abb. 30: Basal des Lymphoepithels (1) sind die Plasmazellen der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) zu einem Bogen verdichtet, der angrenzende Follikel (3) ist lumenwärts durch die Muskelschicht (4) hindurch gedrungen; Färbung nach Giemsa. 62
- Abb. 31: Ein oder mehrere Follikel (1) sind des Öfteren die einzige Komponente des BALT, die in einem histologischen Zufallsschnitt eines Lungengewebes mit BALT-Anbildung erkennbar wird; eine Follikel-assoziierte Lamina propria oder ein Lymphoepithel sind nicht zu sehen; im Bild ist außer dem Bronchiolus (2) ein benachbartes Peribronchium mit Knorpel eines Bronchus abgebildet (3); HE-Färbung. 64
- Abb. 32: Das Lymphoepithel (1) sowie die Follikel-assoziierte Lamina propria (2) sind auch bei noch undeutlicher Follikelformation (3) der geringgradigen BALT-Anbildung schon sicher zu erkennen, jedoch sind die drei Komponenten weniger häufig gemeinsam angeschnitten; HE-Färbung. 64
- Abb. 33: Das Peribronchiolum ist multifokal mit Lymphozyten infiltriert (Pfeile). Eine Lymphozytenansammlung (1) ist einer von Endothel ausgekleideten Lymphgefäßspalte benachbart (2), in unmittelbarer Nachbarschaft befindet sich auch ein Blutgefäß (3); HE-Färbung..... 66
- Abb. 34: Basal und seitlich des deutlich angebildeten Follikels (1) ist meistens mindestens ein benachbartes Gefäß angeschnitten, das kann ein Lymphgefäß (2) und / oder Blutgefäß sein (3); HE-Färbung. 66
- Abb. 35: Der Follikel zeigt ab mittelgradiger BALT-Anbildung im Inneren ein helles Keimzentrum (1), außen eine dunklere halbmondförmige Mantelzone (2), die abgewandt vom Bronchiolusepithel liegt (3); HE-Färbung. 67

- Abb. 36: Der reaktive Follikel im BALT zeigt ein deutliches rund-ovales Keimzentrum (1a), basal umgeben von einer dunklen halbmondförmigen Mantelzone (1b); lumenwärts liegen das Plasmazellband der Follikel-assoziierten Lamina propria (2) und das Lymphoepithel (3); Färbung nach Giemsa..... 68
- Abb. 37: Im hellen Keimzentrum (1a) kommen überwiegend große lymphatische Zellen vor, es sind Zentroblasten (Pfeil) und Zentrozyten (Pfeilkopf) zu erkennen; in der dunklen Mantelzone hingegen sind vor allem kleine und mittelgroße Lymphozyten zu sehen; Färbung nach Giemsa..... 68
- Abb. 38: Immunhistochemisch betrachtet ist der Follikel (1) ein CD20-positives B-Zellareal (links), gering fällt der Anteil an CD3-positiven T-Lymphozyten im Follikel aus (rechts); die meisten T-Lymphozyten sind in der Hälfte des Follikels zu sehen, die näher am Lumen liegt..... 69
- Abb. 39: In den Übersichtsfärbungen Giemsa und HE fallen im Follikel besonders die Sternhimmel-Makrophagen durch ihre großen Vakuolen und darin enthaltenem phagozytierten Material auf (Pfeilköpfe). 70
- Abb. 40: In der immunhistochemischen Darstellung von Vimentin reagieren im Follikel vor allem Zellelemente, die wie ein Maschenwerk zwischen den Zellkernen Vimentin-negativer Zellen liegen (1); im benachbarten T-Zellareal ist ein ähnliches positives Muster zu sehen (2), außerdem reagiert ein Gefäß mit ins Lumen ragenden Endothelzellkernen positiv (3). 70
- Abb. 41: Die natürliche Begrenzung des BALT bzw. des Follikels (Pfeile) ist ebenso Zytokeratin-positiv wie das Alveolarepithel (1) und das Lymphoepithel (2)..... 71
- Abb. 42: Zwischen mehreren Follikeln mit hellerem Zentrum (1) kann man ein Areal erkennen (2), das aus gleichförmigen, kleinen Lymphozyten aufgebaut ist; es kann in dieser Lage als ein interfollikuläres Zellareal angesprochen werden; HE-Färbung. 72
- Abb. 43: Am Bronchiolus sind vereinzelt deutliche Follikel angebildet (1), darüber hinaus kann man weitere lymphatische Zellareale (2) außerhalb der Muskelschicht (3) in parafollikulärer Lage erkennen; die beiden parafollikulären Zellareale sind basal um den Follikel herum durch einen schmalen Saum von Lymphozyten verbunden (Pfeile); HE-

- Färbung 72
- Abb. 44: Die meisten CD3-positiven Zellen sind außerhalb der Muskelschicht (1) und neben dem Follikel (2) zu finden und können als T-Zellareal parafollikulärer Ausprägung angesprochen werden; basal um den Follikel ist eine CD3-positive Saumbildung (3) zum linksseitigen T-Zellareal zu erkennen, welches durch einen weiteren benachbarten Follikel ein interfollikuläres T-Zellareal darstellt (4); nur vereinzelt sind weitere CD3-positive Zellen im Follikel (5), in der Follikel-assoziierten Lamina propria (6) und dem Lymphoepithel (7) zu erkennen..... 74
- Abb. 45: In der Färbung nach Giemsa kann das T-Zellareal anhand kleiner und mittelgroßer Lymphozyten (1) neben einem Follikel (2) außerhalb der Muskelschicht (3) angesprochen werden; das T-Zellareal kann sich parafollikulär (links) und interfollikulär (rechts) zeigen. 74
- Abb. 46: Im CD3-positiven T-Zellareal (links) sind in der Vimentin-Darstellung (rechts) hochendothelisierte Venolen (HEV) zu finden (1), der Follikel (2) hingegen ist frei von solchen Venolen. 75
- Abb. 47: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); zwei Follikelbildungen (1) wölben sich in einen Lymphgefäßspalt (2) unter der Pleura (3), es handelt sich um das subpleural gelegene ELG; ein Bezug der Follikel zu Atemwegen ist nicht erkennbar, sie grenzen direkt an ödematisiertes Alveolargewebe (4), HE-Färbung..... 79
- Abb. 48: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); ein typischer Sekundärfollikel mit einem helleren zentralen Zellareal (1) ragt in das Lymphgefäß (2) eines bindegewebigen Septums (3), es handelt sich um ein septales ELG zwischen zwei benachbarten Lungenläppchen; die Alveolarräume sind ödematisiert, das ELG grenzt basal an Alveolargewebe (4), oberhalb der Follikels wölbt es sich in den Lymphgefäßspalt; HE-Färbung. 79
- Abb. 49: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); in den zwei Follikeln ohne erkennbares Keimzentrum kommen vorwiegend kleine und mittelgroße Lymphozyten vor (1), im Follikel sind auch mehrere Sternhimmel-Makrophagen zu sehen (Pfeile); im basalen Randbereich des Follikels kann man Plasmazellen mit ihrem dunkelblauen Zytoplasma erkennen (Pfeilköpfe); Färbung nach Giemsa. 80

- Abb. 50: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); durch die immunhistochemische Darstellung von CD20 kann der Follikel deutlich als B-Zellareal angesprochen werden (1); vereinzelt sind CD20-positive B-Lymphozyten auch im Alveolargewebe vertreten (2). . 81
- Abb. 51: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); CD3-positive T-Lymphozyten sind vereinzelt sowohl im Follikel (1) als auch außerhalb im angrenzenden Alveolargewebe zu beobachten (2), sodass von ihnen kein deutliches T-Zellareal gebildet wird..... 81
- Abb. 52: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); im Follikel (1) zeigen sich Vimentin-positive Sternhimmel-Makrophagen (Pfeil); vor allem im Randbereich des Follikels reagieren Zellausläufer zwischen den lymphatischen Zellkernen (Pfeilköpfe), ebenfalls reagieren die Alveolarmakrophagen positiv (2); Blutgefäße, deren Endothelzellen einer HEV entsprechen könnten, sind nicht erkennbar. 82
- Abb. 53: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); feine Kapillaren liegen zwischen den lymphatischen Zellen des ELG (1), ein größeres Blutgefäß ist nicht in Nachbarschaft des Follikels zu sehen; des Weiteren sind die basal angrenzenden Alveolen (2) teils von breiten bindegewebigen Septen umgeben (Pfeile), die Innenauskleidung besteht vorwiegend aus kleinen kubischen Alveolarepithelzellen (Pneumozyten Typ II) (Pfeilköpfe), die Alveolen sind mit Ödemflüssigkeit gefüllt, teils sind darin ebenfalls extravasale Erythrozyten und neutrophile Granulozyten zu sehen; HE-Färbung. 83
- Abb. 54: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); der prominente Follikel (1) ragt weit in ein subpleurales Lymphgefäß (2) hinein; Färbung nach Giemsa..... 84
- Abb. 55: Ektopisches lymphatisches Gewebe (ELG); der sich anbildende Follikel (1) ist einerseits von flachen, langgestreckten Endothelzellen (Pfeile) des benachbarten Lymphgefäßes (2) bedeckt und grenzt andererseits direkt an Alveolarepithelzellen, deren Zytokeratin immunhistochemisch dargestellt ist (Pfeilköpfe). 84

XII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermanns für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftliche Betreuung sowie anregende Gespräche bei der Erstellung dieser Arbeit. Herrn Prof. Ritzmann danke ich ebenfalls herzlich für die Ermöglichung und freundliche Unterstützung des Projektes.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Tierpathologie danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft, aufmunternden Worte und humorvollen Gedanken an allen Tagen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Miriam Leipig und Alexandra Rieger.

Im Labor wurde ich jederzeit freundlich und selbstverständlich unterstützt von H. Sperling, D. Merl, M. Nützel, D. Argiriu und N. M'Bengue. Herzlichen Dank.

Ich danke der CEESA (Centre Européen d'Etudes pour la Santé Animale), für die freundliche Überlassung von bakteriologischen Ergebnissen für diese Arbeit.

Meinen Eltern und Schwestern danke ich, dass sie trotz großer räumlicher Distanz und weniger gemeinsamer Tage im Jahr die Entwicklung der Promotionsarbeit immer mit großem Interesse verfolgt haben. Eure emotionale Unterstützung, Liebe und euer Verständnis waren wichtige Säulen für das Anfertigen dieser Arbeit.

Erwähnen möchte ich ebenfalls meine lieben Freundinnen und Martina als wichtige Begleiterinnen auf diesem spannenden Weg. Ihr habt in vielerlei Hinsicht einen großen Anteil meines Dankes.

Mein besonderer Dank gilt dir, Martin, dass du nie müde wurdest, die Verwirklichung dieses Zieles zu unterstützen. Du standest mir liebevoll, geduldig und mit sachlich gutem Rat zur Seite.