

Aus dem  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

---

**CHARAKTERISIERUNG DER VIRULENZFAKTOREN  
*INVC* UND *SSED*  
DES TYP III-SEKRETIONSSYSTEMS VON  
*SALMONELLA* TYPHIMURIUM DT104 MITTELS  
*EX VIVO* ZYTOKIN-EXPRESSION IM  
EXPERIMENTELL INFIZIERTEN SCHWEIN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Steffi Brumme  
aus Zittau

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Uwe Truyen

Gutacher:

1. Gutachter: Professor Dr. Uwe Truyen,  
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
  
2. Gutachter: Professor Dr. Gottfried Alber,  
Institut für Immunologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
  
3. Gutachter: Professor Dr. Hans-Joachim Selbitz,  
Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, Roßlau

Tag der Verteidigung: 25.04.2006

**Meiner Mutter  
und  
meinem Vater  
gewidmet**

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	4
<b>2.1</b>	<b>Salmonella</b> .....	4
2.1.1	Taxonomie .....	4
2.1.2	Epidemiologie.....	7
2.1.2.1	Salmonellose des Menschen.....	9
2.1.2.2	Salmonelleninfektion des Schweins .....	11
2.1.3	Virulenzfaktoren .....	15
2.1.3.1	Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren .....	15
2.1.3.2	Plasmid kodierte Virulenzfaktoren.....	19
2.1.3.3	Intrazelluläre Persistenz und Replikation von <i>Salmonella</i> .....	21
2.1.3.4	Auswirkung von <i>Salmonella</i> sp. auf die infizierte Wirtszelle.....	23
2.1.4	Mutationen.....	23
<b>2.2</b>	<b>Immunologie</b> .....	25
2.2.1	Zelluläre Immunitätsmechanismen.....	26
2.2.2	Interleukine .....	28
2.2.2.1	Interleukin-2 .....	29
2.2.2.2	Interleukin-4 .....	30
2.2.3	Interferone .....	31
2.2.3.1	Interferon $\gamma$ .....	31
2.2.4	Nachweis von Zytokinen .....	32
<b>2.3</b>	<b>PCR</b> .....	35
2.3.1	Amplifikationskinetik.....	35
2.3.2	Real-time PCR.....	35
<b>3</b>	<b>Tiere, Material und Methoden</b> .....	40
<b>3.1</b>	<b>Allgemeiner Versuchsaufbau</b> .....	40
<b>3.2</b>	<b>Tiere und Material</b> .....	42
3.2.1	Bakterienstämme .....	42
3.2.2	Probenmaterial aus experimentell infizierten Schweinen .....	43
3.2.3	Voranreicherungsmedien und Nährböden für die kulturelle Diagnostik .....	43
3.2.4	Oligonukleotide zum Nachweis von <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	44
3.2.5	Oligonukleotide und Sonden zur Zytokin-Quantifizierung.....	44
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b> .....	46
3.3.1	Infektionsversuche.....	46
3.3.2	Diagnostik von <i>Salmonella</i> sp. ....	47
3.3.2.1	Kulturelle Diagnostik .....	47
3.3.2.2	Qualitative PCR.....	47
3.3.2.3	Serologische Diagnostik .....	49
3.3.3	Quantifizierung der Zytokinantwort.....	50
3.3.3.1	Lymphozytenpräparation.....	50
3.3.3.2	RNA-Extraktion .....	50
3.3.3.3	Reverse Transkription (RT).....	51
3.3.3.4	Real-time PCR.....	52

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	55
<b>4.1</b>	<b>Klinik</b> .....	55
4.1.1	Befunde der klinischen Untersuchung.....	55
4.1.2	Körpergewicht .....	57
<b>4.2</b>	<b>Diagnostik <i>Salmonella</i></b> .....	59
4.2.1	Kultureller Nachweis .....	59
4.2.1.1	Kultureller Nachweis in Gewebeproben.....	59
4.2.1.2	Kultureller Nachweis in Faecesproben.....	60
4.2.2	Erreger-Nachweis mittels qualitativer PCR .....	61
4.2.3	Serologischer Nachweis .....	62
<b>4.3</b>	<b>Zytokin-Expression</b> .....	69
4.3.1	Optimierung der quantitativen Real-time PCR zur Detektion von Zytokinen.....	69
4.3.2	Berechnung der Zytokin-Expression.....	73
4.3.3	Analyse der Zytokin-Expression .....	75
4.3.3.1	Expressionsanalyse der <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 Wildtyp- Infektionsgruppe .....	77
4.3.3.2	Expressionsanalyse der <i>S. Typhimurium</i> DT104 Deletionsmutanten <i>invC::aphT</i> -Infektionsgruppe .....	78
4.3.3.3	Expressionsanalyse der <i>S. Typhimurium</i> DT104 Deletionsmutanten <i>sseD::aphT</i> -Infektionsgruppe .....	80
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	82
<b>5.1</b>	<b>Klinik</b> .....	83
5.1.1	Vergleich der klinischen Befunde .....	83
5.1.2	Vergleich der Körpergewichtsentwicklung .....	84
<b>5.2</b>	<b>Diagnostik <i>Salmonella</i></b> .....	84
5.2.1	Kultureller Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 .....	84
5.2.1.1	Vergleich der Ausscheidungsrate in Faeces zwischen den Infektionsgruppen .....	84
5.2.1.2	Vergleich der Invasivität und intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate zwischen den Infektionsstämmen .....	85
5.2.2	Serologische Untersuchungen .....	87
<b>5.3</b>	<b>Untersuchungen zur zellulären Immunantwort</b> .....	90
5.3.1	Etablierung der quantitativen Real-time PCR .....	90
5.3.2	Vergleich der relativen Zytokin-Expression.....	91
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	96
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	98
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	100

<b>Anhang</b> .....	115
I    Abbildungen .....	115
II   Tabellen .....	124
III  Chemikalien und Reagenzien .....	131
<b>Danksagung</b> .....	132

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AB-Mix	ABsolute™ QPCR Mix
<i>aphT</i>	Aminoglykosid 3`-Phosphotransferase
AS	Aminosäure
ASP	acid shock proteins
ATR	acid tolerance response
BPLS-Medium	Brilliantgrün-Phenolrot-Sucrose-Agarmedium
ca	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-3,5-monophosphat
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Choleratoxin
C <sub>T</sub>	Threshold cycle
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Amplifikationseffizienz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EU	Elisa - Unit
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FAM	5-Carboxy-Fluorescein
FKS	fötales Kälberserum
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G	Guanin
HEX	Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
HKG	Housekeeping-Gen
ID	Infektionsdosis
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-12	Interleukin 12
IFN-γ	Interferon gamma
invC	Invasin C
i.p.	intra peritoneal
ISO	International Organisation for Standardization, Genf, Schweiz
i.v.	intra venös
kb	Kilobasen
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
LB-Boullion	Luria-Bertani-Boullion
LD	Lethaldosis
LPS	Lipopolysaccharid

---

LT	hitzelabile Form
MHC	Major Histokompatibilitäts-Komplexe
<i>mig</i>	macrophage inducible gene
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nM	Nanomol
OMP	Outer membrane protein
PAI	Pathogenitätsinsel
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pef	plasmid encoded fimbriae
Pg	Pikogramm
PG	Prostaglandin
rck	resistance to complement killing
RKI	Robert Koch-Institut
<i>p. inf.</i>	<i>post infectionem</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation per minute
rsk	reduced serum killing
RT	Reverse Transkription
RV-Medium	Rappaport-Vassiliadis-Medium
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>S. Tm.</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
sap	sensitive to antimikrobiell peptides
ser.	Serovar
SGI	<i>Salmonella</i> Genomische Insel
sp.	Spezies
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
spv	<i>Salmonella</i> plasmid virulence
ssa	Secretion System Apparatus
ssc	Secretion System Chaperone
sse	Secretion System Effector
ssr	Secretion System Regulator
ST	hitzestabile Form
subsp.	Subspezies
s. S.	siehe Seite
T	Thymin
TAMRA	Rhodamin
Taq	<i>Thermus aquatus</i>
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	3,3` ; 5,5` -Tetramethylbenzidin
TZR	T-Zellrezeptor
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
(v/v)	Volumenprozent
XLD-Agarmedium	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agarmedium
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter



---

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. Übersicht über die in den Infektionsversuchen eingesetzten Infektionsstämme.....	42
Tabelle 2. Untersuchte Organ- und Gewebeproben. ....	43
Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide für die Salmonellen-Diagnostik des eingesetzten <i>S.Tm</i> Wildtyps und die zwei Deletionsmutanten in Gewebeproben vom persistent infizierten Schwein. ....	44
Tabelle 4. Oligonukleotidsequenzen zur Zytokin-Quantifizierung beim Schwein. ....	44
Tabelle 5. TaqMan™-Sonden zur Zytokin-Quantifizierung beim Schwein .....	45
Tabelle 6. Temperaturprofil der Qualitativen PCR. ....	48
Tabelle 7. Zusammensetzung des Einfriermediums zur Lymphozytenlagerung. ....	50
Tabelle 8. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription.....	51
Tabelle 9. Temperaturprofil der Reversen Transkription.....	51
Tabelle 10. Quantitative Echtzeit-PCR-Mastermix für IL-2.....	53
Tabelle 11. Quantitative Echtzeit-PCR-Mastermix für IL-4 und IFN- $\gamma$ . ....	53
Tabelle 12. Temperaturprofil der Quantitativen Echtzeit-PCR.....	53
Tabelle 13. Produktgrößen des jeweiligen Infektionsstamms in der qualitativen PCR. ....	62
Tabelle 14. Die Signifikanzen der Unterschiede der IgM Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test. ....	64
Tabelle 15. Signifikanzen der Unterschiede der IgA Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test. ....	65
Tabelle 16. Signifikanzen der Unterschiede der IgG Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test. ....	67
Tabelle 17. Die Schmelztemperaturen für die Zytokine: IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ und das HKG GAPDH.....	70
Tabelle 18. Eingesetzte Primer-Konzentrationen für die quantitative Real-time PCR. .	73
Tabelle 19. Eingesetzte Sonden-Konzentrationen für die quantitative Real-time PCR. ....	73
Tabelle 20. C <sub>T</sub> -Mittelwerte von einem mit <i>S.Typhimurium</i> DT104 infizierten Hybridschwein.....	74
Tabelle 21. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit <i>S.Typhimurium</i> DT104-Wildtyp infizierten Hybridschweine.....	78
Tabelle 22. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit <i>S.Typhimurium</i> DT104- <i>invC::aphT</i> infizierten Hybridschweine. ....	79

---

Tabelle 23. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit <i>S. Typhimurium</i> DT104 <i>sseD::aphT</i> infizierten Hybridschweine.....	81
Tabelle 24. Die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung des Körpergewichts der jeweiligen Infektionsgruppe im Verlauf der Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT 104 und den beiden Deletionsmutanten.....	124
Tabelle 25. Die prozentuale Nachweisrate von <i>S. Typhimurium</i> DT 104 und der beiden Deletionsmutanten in Gewebeproben von experimentell infizierten Hybridschweinen..	124
Tabelle 26. Die prozentuale Ausscheidungsrate von <i>S. Typhimurium</i> DT104 und der beiden Deletionsmutanten in den Verlaufs-Kotproben der experimentell infizierten Hybridschweine.....	125
Tabelle 27. Gewebeproben aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 möglich war. ....	126
Tabelle 28. Gewebeproben aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104- <i>invC::aphT</i> möglich war. ....	127
Tabelle 29. Gewebeproben aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104- <i>sseD::aphT</i> möglich war.....	128
Tabelle 30. Die errechneten $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interleukin 2 Expressionsrate verwendet wurden.....	129
Tabelle 31. Die errechneten $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interleukin 2 verwendet wurden. ....	129
Tabelle 32. Die errechneten $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interleukin 4 Expressionsrate verwendet wurden.....	129
Tabelle 33. Die errechneten $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interleukin 4 verwendet wurden. ....	130
Tabelle 34. Die errechneten $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interferon $\gamma$ Expressionsrate verwendet wurden.....	130
Tabelle 35. Die errechneten $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interferon $\gamma$ verwendet wurden.....	130

---

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1. Einteilung des Genus <i>Salmonella</i> in Spezies und Subspezies.....	4
Abbildung 2. Die Entwicklung der Salmonellen-bedingter <i>Enteritis infectiosa</i> bei Menschen in Deutschland von 1991 bis 2002. ....	10
Abbildung 3. Das Vorkommen von <i>Salmonella</i> -Serovaren beim Schwein in Europa im Jahr 2002.....	14
Abbildung 4. Schematische Darstellung der T-Zellreifung in Abhängigkeit zum vorhandenen Zytokinmilieu. ....	27
Abbildung 5. Funktionsprinzip der TaqMan™-Sonden.....	39
Abbildung 6. Allgemeiner Aufbau der Infektionsversuche am Schwein mit <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	41
Abbildung 7. Pipettierschema für die Real-time PCR.....	54
Abbildung 8. Körpertemperatur der drei Infektionsgruppen im Verlauf der Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT104.....	57
Abbildung 9. Körpergewicht der Infektionsgruppen im Verlauf der Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT104 und der Deletionsmutanten. ....	58
Abbildung 10. Prozentuale Darstellung der Nachweisrate von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Gewebeproben. ....	60
Abbildung 11. Prozentuelle Darstellung der Nachweisrate von <i>S. Typhimurium</i> in Kotproben. ....	61
Abbildung 12. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104, <i>invC</i> -Deletionsmutante und <i>sseD</i> -Deletionsmutante in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen. ....	62
Abbildung 13. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgM im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein. ....	64
Abbildung 14. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgA im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein. ....	66
Abbildung 15. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgG im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein. ....	68
Abbildung 16. Spezifitätskontrolle der Multiplex quantitativen Real-time PCR für GAPDH, IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4.....	70
Abbildung 17. Primeroptimierung von GAPDH und Interleukin 2 dargestellt im Agarose-Gel zur qualitativen Kontrolle.....	71

---

Abbildung 18. Amplifikationsplot der verschiedenen GAPDH-Primer-Konzentrationen zur Optimierung der quantitativen Real-time PCR.....	72
Abbildung 19. Amplifikationsplot der verschiedenen GAPDH-Sonden-Konzentrationen zur Optimierung der quantitativen Real-time PCR. ....	72
Abbildung 20. Amplifikationsplot anhand eines Probanden, exemplarisch abgebildet für Interleukin 2. ....	75
Abbildung 21. Relative Quantifizierung anhand eines Tieres, exemplarisch dargestellt für Interleukin 2. ....	76
Abbildung 22. Zytokin-Expressionsunterschiede der mit <i>S. Typhimurium</i> DT104-Wildtyp infizierten Hybridschweine. ....	77
Abbildung 23. Zytokin-Expressionsunterschiede der mit <i>S. Tm</i> DT104- <i>invC::aphT</i> infizierten Hybridschweine. ....	79
Abbildung 24. Darstellung der Zytokin-Expressionsrate der mit <i>S. Typhimurium</i> DT104- <i>sseD::aphT</i> infizierten Hybridschweine. ....	80
Abbildung 25. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Organproben von einem infizierten Hybridschwein.....	115
Abbildung 26. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 in Organproben von einem infizierten Hybridschwein.....	116
Abbildung 27. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104- <i>invC::aphT</i> und - <i>sseD::aphT</i> im Kot von infizierten Hybridschweinen. ....	116
Abbildung 28. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 <i>sseD::aphT</i> in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen.....	117
Abbildung 29. Nachweis von <i>S. Typhimurium</i> DT104 <i>invC::aphT</i> in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen.	
Abbildung 30. Effizienzbestimmung von Interleukin 2 und GAPDH. ....	118
Abbildung 31. Effizienzbestimmung für Interleukin 4. . ....	118
Abbildung 32. Effizienzbestimmung für Interferon $\gamma$ . ....	119
Abbildung 33. Dissoziationsprotokoll für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interleukin 2.....	119
Abbildung 34. Dissoziationsprotokoll für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interleukin 4.....	120
Abbildung 35. Dissoziationsprotokoll für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interferon- $\gamma$ .....	120

Abbildung 36. Relative Zytokin-Expressionsrate am 7. Tag nach Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT104. ....	121
Abbildung 37. Relative Zytokin-Expressionsrate am 14. Tag nach Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT104. ....	122
Abbildung 38. Relative Zytokin-Expressionsrate am 21. Tag nach Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> DT104. ....	123

## 1 Einleitung

Durch Lebensmittel bedingte Infektionen verursachen weltweit erheblichen Schaden und ihre Zahl ist in den letzten Jahrzehnten weiter gestiegen. Veränderte Bedingungen für das Auftreten von Pathogenen, veränderte Eigenschaften der pathogenen Erreger und veränderte Überwachungssysteme gelten als Ursache. Ebenfalls die intensive Tierhaltung birgt neue Gefahren, weil der Infektionsdruck in einem Bestand enorm höher liegt und Futtermittelimporte notwendig geworden sind, welche als Risikofaktoren für eine Salmonellose gelten. Durch den vielfältigen Einsatz von Antibiotika entstehen Multiresistenzen bei Bakterienstämmen, von denen viele ein Tierreservoir haben. Als Beispiel sei der erstmals 1999 in den USA aufgetretene *Salmonella* Newport-Stamm genannt, der sich seitdem ausgebreitet hat (ROCOURT et al. 2003). Mit Zoonoseerregern kontaminierte Lebensmittel sind weiterhin als mögliche Ätiologie für infektiöse Gastroenteritiden des Menschen im Mittelpunkt der Öffentlichkeit. Salmonellen gelten als die Hauptverursacher fieberhafter Infektionskrankheiten des Verdauungssystems, besonders *Salmonella* Typhimurium ist als zweithäufigster bakterieller Erreger der humanen Gastroenteritis von immenser Bedeutung. In Deutschland gilt die Salmonellose als die häufigste von Bakterien hervorgerufene Lebensmittelinfektion und hat damit eine große sozioökonomische Bedeutung.

Von der Gattung *Salmonella* sind weit über 2000 Serovare bekannt, davon gelten über 50 als anerkannte Salmonelloseverursacher bei Menschen und Tieren. Die Krankheitsbilder reichen dabei von einer mild verlaufenden, selbstlimitierenden Diarrhoe bis zu schweren systemischen Infektionen. An akuten Gastroenteritiden sind weltweit jährlich 1,3 Milliarden Fälle zu verzeichnen. Drei Millionen verlaufen tödlich (PANG et al. 1998). Die maßgeblichen Übertragungs- und Infektionsquellen sind kontaminiertes Wasser und kontaminierte Lebensmittel. Dabei sind 70 % der Erkrankungen auf Nahrungsmittel zurückzuführen, wobei davon 20 % vom Schwein ausgehen. *Salmonella* (*S.*) Typhimurium ist beim Schwein der häufigste Vertreter (STEINBACH u. HARTUNG 1999; LINDNER et al. 2002). Seit 1994 wird vorherrschend *S.* Typhimurium DT104 beim Schwein isoliert, dabei handelt es sich um eine ursprünglich vom Rind stammende Serovar. Der prozentuale Anteil vom Phagentyp DT104 von allen *S.* Typhimurium-Isolaten ist durch einen kontinuierlichen

Prävalenzanstieg gekennzeichnet. So konnte im Jahr 2002 ein Anteil von 55,2 % konstatiert werden. Ein besonderes Problem stellen die *S. Typhimurium*-Isolate mit einer chromosomal kodierten Fünf- bzw. Mehrfachresistenz dar, die beim Schwein 95,7 % betragen (HELMUTH R. et al. 2003).

Eine *S. Typhimurium*-Infektion verläuft beim Schwein überwiegend symptomlos, dadurch ist erklärbar, dass trotz aller bisher getroffenen Maßnahmen diese Zoonose immer noch so häufig auftritt. Das persistent infizierte Schlachtschwein ist in dieser Infektionskette das bedeutendste Reservoir.

Da eine exakte Identifizierung von asymptomatisch infizierten Tieren schwierig ist, besteht ein dringender Bedarf nach schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweismethoden. Ebenso bedeutsam sind exakte Kenntnisse über die Pathogenese einer Salmonelleninfektion beim Schwein. Neben dem Erkennen und Selektieren der betreffenden Tiere sollte jedoch das Hauptaugenmerk auf Bekämpfungs- und Prophylaxestrategien gerichtet sein. Hier gewinnt die aktive Immunisierung immer mehr an Bedeutung (ZHANG-BARBER et al. 1999). In zahlreichen *in vivo*-Versuchen war die Überlegenheit in der Wirksamkeit von *Salmonella*-Lebendvakzinen gegenüber den Inaktiv- und den Subunitvakzinen deutlich erkennbar (MARTIN 1992). Die gegenwärtigen Lebendimpfstoffe basieren auf vermehrungsfähigen und stabil attenuierten *Salmonella*-Stämmen. Da Salmonellen fakultativ intrazellulär parasitieren, erfordert dies eine breite Stimulation der Immunantwort unter Einbezug der zellvermittelnden Mechanismen (SELBITZ 2002b). Deshalb sind die Pathogeneseschritte Adhäsion, Invasion und das Überleben und Replizieren in Wirtszellen eine Voraussetzung für eine wirksame Lebendvakzine (MITOV et al. 1992). Denn ein effektiver Schutz gegen intrazelluläre Bakterien ist T-zellabhängig, an dem CD4- und CD8-T-Zellen beteiligt sind (HEESEMAN et al. 2003). Solch ein Impfstamm muss außerdem durch eine sichere Differenzierbarkeit von Feldstämmen gekennzeichnet sein (SELBITZ 2002b).

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von klinischen, kulturellen, serologischen sowie molekularbiologischen Parametern die zellulären und humoralen Immunitätsmechanismen beim Schwein im Rahmen einer *S. Typhimurium* DT104-Infektion zu untersuchen.

Zur Identifizierung von Virulenzfaktoren und bedeutsamen Mechanismen für die Pathogenese kommen vergleichend neben dem *S. Typhimurium* DT104 Wildtypstamm zwei attenuierte Mutanten zum Einsatz, wobei die eine in ihrem Invasionsvermögen und die andere in ihrer intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate beeinträchtigt ist.

Hierbei ist der Schwerpunkt auf die Expressionsanalyse verschiedener Zytokine, nämlich Interleukin-2, Interleukin-4 und Interferon  $\gamma$ , gelegt, da sie als wichtige Regulatoren der Immunantwort agieren. Generell ist die Expressionsrate von Zytokinen sehr gering, deshalb besteht die Notwendigkeit für präzise und verlässliche Nachweismethoden. Eine Methode, welche diese Anforderungen erfüllt, ist die quantitative Real-time PCR (GIULIETTI et al. 2001). Gegenstand dieser Arbeit ist deshalb die Etablierung dieser PCR zum *in vivo*-Zytokinnachweis beim Schwein.

Die ermittelten Daten bringen erweiterte Kenntnisse über die Pathogenese einer *S. Typhimurium*-Infektion in der gesundheitlich und wirtschaftlich bedeutsamen Zielspezies Schwein. Des Weiteren stellt *Salmonella* wegen der guten molekularbiologischen Manipulierbarkeit einen idealen Modellorganismus zur Studie zwischen Erreger- und Wirtbeziehung dar. Erkenntnisse molekularer Untersuchungen der Pathogenität bringen für Salmonellen neue Nutzungsgebiete: Effektorproteine als Werkzeuge für die Zellbiologie, Herstellung attenuierter Erreger als Lebendimpfstoffe und mikrobielle Antigen-Injektionen in antigenpräsentierende Zellen (HEESEMANN et al. 2003). Diese Arbeit soll aufgrund der ermittelten Daten ein weiterer Beitrag zur Entwicklung einer geeigneten Immunprophylaxe auf Basis einer *Salmonella*-Lebendvakzine sein.



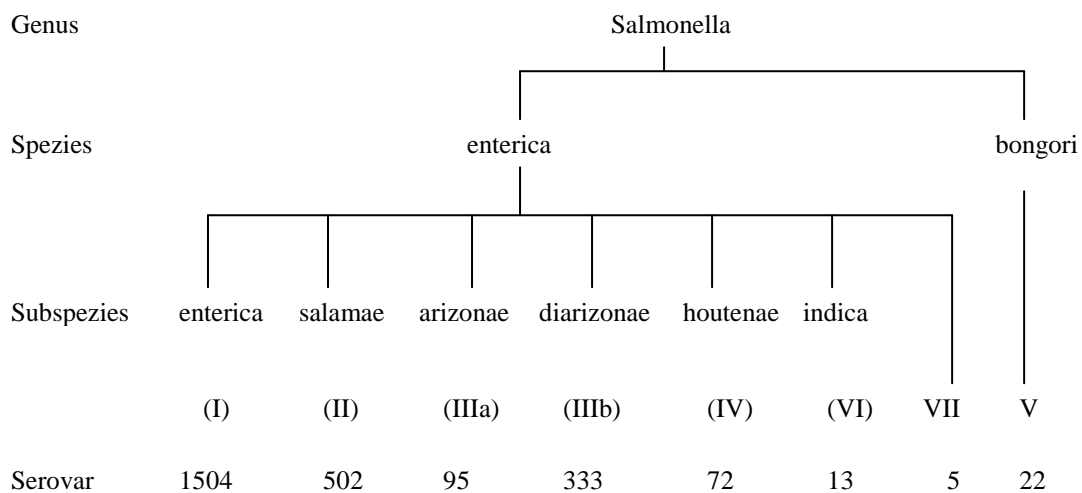
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Salmonella*

#### 2.1.1 Taxonomie

Die Gattung *Salmonella* gehört zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und zählt zu den wichtigsten Vertretern dieser Familie. Salmonellen sind gramnegative gerade Stäbchenbakterien mit einer Größe von 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm. Es handelt sich um fakultative Anaerobier, die bis auf wenige Ausnahmen beweglich sind. Die Gruppe der Salmonellen umfasst ca. 2541 Serotypen, die meist aus Vertebraten isoliert werden konnten (POPOFF et al. 2004).

Die Gattung *Salmonella* gliedert sich in zwei Spezies: zum einen *Salmonella bongori*, zum anderen *Salmonella enterica*, wobei die Spezies *S. enterica* nochmals in sieben Subspezies unterteilt wird: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* und Subspezies VII (POPOFF et al. 2004).



**Abbildung 1. Einteilung des Genus *Salmonella* in Spezies und Subspezies.**

nach Popoff et.al. (2004)

Mit der Erkenntnis der weltweiten Verbreitung von Salmonellen und ihrer großen Bedeutung für Mensch und Tier stieg die Zahl der durchgeführten *Salmonella*-Diagnostika und Typendifferenzierungen. Dies führte dazu, dass immer mehr neue Spezies aufgespürt wurden. Von 1881 bis 1914 waren lediglich 12 Spezies bekannt, doch stieg bereits in den nächsten 13 Jahren die Zahl auf 24 Spezies an. Im ersten Kauffmann-White-Schema, welches 1934 erschien, waren dann schon 44 Vertreter gelistet (KELTERBORN 1967).

Der permanente Anstieg von neu entdeckten Salmonellen-Typen machte ein zuverlässiges Identifizierungsschema notwendig. 1926 beschäftigte sich White mit der Antigenanalyse, die sich Kauffmann zunutze machte. Basierend auf diesen Arbeiten entwickelte Kauffmann die Antigentabellen, die noch heute die Grundlage für das jetzt gültige Kauffmann-White-Schema bilden (SELBITZ et al. 1995).

Es ergeben sich so die für bestimmte Serovare repräsentativen Antigenformeln aus den Merkmalskombinationen der mit Gruppen- und Faktorensereen nachweisbaren O- und H-Antigene. In der Subspezies *enterica* vereinen sich alle Serovare, die Bedeutung für den Menschen und homoiotherme Tiere haben (CLARKE u. GYLES 1993).

Bei den O-Antigenen handelt es sich um die somatischen Antigene von *Salmonella* sp.. Dies sind formaldehydunbeständige, thermolabile Lipopolysaccharid-Proteinkomplexe, welche in der bakteriellen Zellwand lokalisiert sind. Der Träger der serologischen Spezifität ist die Polysaccharid-Komponente. H-Antigene sind die so genannten Geißelantigene. Ihre Charakteristika sind Formaldehydbeständigkeit und Thermostabilität. Durch die am Aufbau beteiligten Aminosäuren wird die Spezifität dieser H-Antigene bestimmt (SELBITZ 2002a). Dabei ist der Phasenwechsel zwischen spezifischer und unspezifischer Phase, dem die H-Antigene unterliegen, bedeutsam (BISPING u. AMTSBERG 1988).

Der Vollständigkeit halber ist hier zu erwähnen, dass bei den menschenpathogenen Serovaren *S. Typhi* und *S. Paratyphi* ein zusätzliches Vi-Antigen vorhanden ist, das so genannte Kapselantigen, welches der Zellwand aufgelagert ist. Es besitzt eine eigene serologische Spezifität und kann die O-Agglutination stören (SELBITZ 2002a). Von allen bisher bekannten Serovaren sind die Antigenformeln im Kauffmann-White-Schema aufgeführt. Die O-Antigene werden mit arabischen Ziffern bezeichnet. Durch die Existenz von Haupt-O-Antigenen können Gruppen gebildet werden. Bei Isolaten mit identischen O- und H-Antigenen erfolgt eine Zuteilung zum selben Serovar.

Bei serologisch definierten Serovaren kann mit Hilfe der so genannten Lysotypie eine weitere Differenzierung vorgenommen werden, die auf der Empfänglichkeit bestimmter Bakteriophagen beruht (GRIMONT et al. 2000).

So erfolgt zum Beispiel bei *S. Typhimurium* die Bestimmung der Phagovare anhand des modifizierten Schemas von FELIX und CALLOW (1943). Die Unterscheidung der einzelnen Phagentypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften ist von besonderer Bedeutung. So handelt es sich bei dem Phagentyp DT104 um einen gegen Antibiotika multiresistenten Keim, der in Europa weit verbreitet ist (LIESEGANG et al. 1997).

Salmonellenserovare der Subspezies *enterica*, die von medizinischer Bedeutung sind, werden üblicherweise nicht durch Antigenformeln bezeichnet, so dass die Kennzeichnung des Serovarcharakters mit der Großschreibung des Anfangsbuchstabens, z.B. *S. Typhimurium*, erfolgt (SELBITZ et al. 1995; GAREIS 1995).

### 2.1.2 Epidemiologie

Salmonellen sind weltweit in der belebten und unbelebten Umwelt verbreitet. Sie zählen zu den bedeutendsten Infektionserregern bei Mensch und Tier. Generell spricht man heute bei allen Salmonellen von potentiellen Krankheitserregern, wobei ihr Potential als Zoonoseerreger von besonderem Interesse ist (DINJUS et al. 1998).

In Ländern mit intensiver Tierhaltung haben Salmonellen eine immer größere Bedeutung, da die Verbreitung dieses Erregers im engen Zusammenhang mit der Haltung und Fütterung der Tiere sowie mit der Lebensmittelhygiene und Umwelthygiene steht. Unter natürlichen Bedingungen ist ihr Lebensraum der Darm von Mensch und Tier. Es ergibt sich somit ein Infektionskreislauf von der Ausscheidung mit dem Kot und der damit verbundenen Kontamination von Wasser, Boden und Luft bis zur Neuinfektion oder Reinfektion. Bemerkenswert ist, dass Salmonellen in einer kontaminierten Umwelt für Wochen, Monate und gar Jahre überleben und infektiös bleiben können. Ermöglicht wird dies durch spezielle Resistenzmechanismen. Sind bestimmte Voraussetzungen wie Wärme, Feuchtigkeit und Verfügbarkeit von Nährstoffen gegeben, so führt dies zu einer exzessiven Vermehrung des Erregers (PIETZSCH 1981). Untersuchungen an verschiedenen Salmonellen zeigten, dass einzelne Vertreter selbst unter nicht optimalen Bedingungen noch in der Lage sind, sich zu replizieren. *S. Typhimurium* z.B. genügt ein minimales Nährstoffangebot von ca. 60 mg Protein/l, Temperaturen von +7°C bis +47°C werden toleriert (BÖHM 1993).

Die Vertreter des Genus *Salmonella* weisen dabei große Unterschiede in ihrer Anpassung an verschiedene Wirte auf. Daher kann man Salmonellen nach ihrem Infektionsspektrum in verschiedene Gruppen unterteilen (SELBITZ u. BISPING 1995). So trennt man zwischen wirtsadaptierten und nicht-adaptierten Serovaren.

1. Nicht-wirtsadaptierte, hochvirulente Serovaren:

Zu dieser Gruppe gehören *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* als die Haupterreger von Zoonosen. Sie sind charakterisiert durch eine hohe Virulenz. Dies kann bei den betroffenen Individuen zu schweren klinischen Salmonellosen, die sogar letal enden können führen.

2. Nicht-wirtsadaptierte, schwachvirulente Serovaren:

Bei dieser handelt es sich um die größte Gruppe mit über 2000 Serovaren. Ihre Vertreter kommen sporadisch vor und weisen eine geringe Virulenz auf, die meist zu inapparenten Infektionen führt. Sie sind in der Lage, bei allen Tierarten Enteritiden auszulösen. Beim Menschen sind sie als Verursacher von Lebensmittelinfektionen von Bedeutung. Beispiele für diese Gruppe sind *S. Agona* und *S. Infantis*.

3. Tier-adaptierte Serovaren:

Zu dieser Gruppe zählen Serovaren, die an eine Tierspezies angepasst sind und bei dieser ein typhöses Krankheitsbild erzeugen, jedoch bei anderen Tierarten und beim Menschen aufgrund ihrer geringen Virulenz bedeutungslos sind. Beispiele hierfür sind *S. Cholerasuis* beim Schwein, *S. Gallinarumpullorum* beim Huhn und *S. Dublin* beim Rind.

4. Menschen-adaptierte Serovaren:

Es existieren hier die zwei Serovaren *S. Typhi* und *S. Paratyphi*, die beim Menschen eine primäre Salmonellose, die so genannte typhöse Form, auslösen.

Die Ursachen für eine solche Wirtsanpassung sind bisher noch ungeklärt (PASCOPELLA et al. 1995). Die Unterschiede in der Adaptation bei den einzelnen Serovaren sollten in Bezug auf Bekämpfungsstrategien und Infektionsvermeidung jedoch beachtet werden, da ein Zurückdrängen bei adaptierten im Gegensatz zu nicht-adaptierten Serovaren möglich ist (SELBITZ 1992).

### 2.1.2.1 Salmonellose des Menschen

Aufgrund der Schwierigkeit, diese Erkrankung bei fleischliefernden Tieren zu eliminieren, zählt die Salmonellose des Menschen in den industrialisierten Ländern zu den wichtigsten Infektionserkrankungen des Gastrointestinaltrakts. Damit ist die Salmonellen-bedingte *Enteritis infectiosa* eine der häufigsten Zoonosen, vorwiegend verursacht von Serovaren der Subspezies 1 von *Salmonella enterica* (RASCH u. SCHRADER 1996).

Generell sind jedoch alle Salmonellen für den Menschen als totipotent und klinisch einheitlich potent anzusehen. Die beim Menschen auftretenden Krankheitsbilder können in zwei Gruppen gegliedert werden: Zum einen die typhoide Form, hervorgerufen durch die humanadaptierten Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi*, zum anderen die enterische Form, ausgelöst durch tieradaptierte und nicht-wirtsadaptierte Salmonellen.

Eine Infektion erfolgt vorwiegend oral über Lebensmittel, die primär oder sekundär kontaminiert sind (SANDER 1993). Von geringerer Bedeutung ist die Infektion durch direkten Kontakt mit Tieren, die mit Salmonellen infiziert sind, z.B. auf Schlachthöfen oder über Heimtiere (KRAUSS et al. 1997). Die dritte Möglichkeit einer Infektion kann eine Übertragung von Mensch zu Mensch sein, wobei diese nur in 10 % der Fälle ursächlich für eine Erkrankung ist (RASCH u. SCHRADER 1996). Die minimale ID<sub>50</sub> liegt bei  $\geq 10^5$  Keimen für *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Die Klinik des Salmonellen-bedingten Durchfallgeschehens ist geprägt von Brechdurchfall, kolikartigen Bauchschmerzen und häufig begleitendem Fieber, wobei die Symptome oft bereits nach wenigen Stunden auftreten. Bei der *Enteritis infectiosa* handelt es sich um eine lokal beschränkte und selbstlimitierende Erkrankung, die jedoch im Falle von immunsupprimierten Menschen sowie Senioren und Kleinkindern durch Organbesiedelung, Septikämie und Arthritis, auch zu einem typhoiden Verlauf führen kann (HOF et al. 2000). Bei dem oben genannten Personenkreis führt potentiell bereits eine Anzahl von unter 100 Keimen zu einer Erkrankung. Für solch einen typhoiden Krankheitsverlauf ergeben sich therapeutisch weitere Komplikationen, wenn es sich um einen Erreger wie *S. Typhimurium* DT104 mit seiner breiten Antibiotika-Mehrfachresistenz handelt.

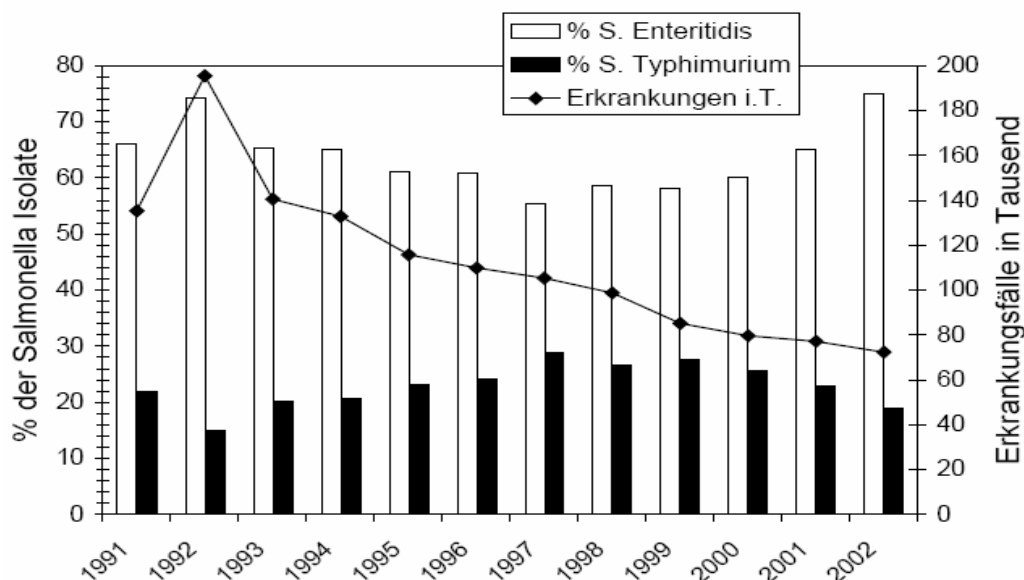
Die humane Salmonellose stellt sich generell als ein Hygieneproblem dar, da kontaminierte Lebensmittel die Hauptinfektionsquelle sind. In diesen Lebensmitteln können die Erreger in einen Ruhezustand übergehen oder subletal vorliegen, so dass sie

kaum kultivierbar oder nachweisbar sind und damit oft unerkannt bleiben. Infolgedessen ist die Verbraucheraufklärung hinsichtlich einer ausreichenden Küchenhygiene eine der wichtigsten Präventivmassnahmen.

Die Epidemiologie der humanen Salmonelleninfektion ist durch „Hochs und Tiefs“ geprägt. Diese Schwankungen begründen sich in der Abhängigkeit von der *Salmonella*-Prävalenz in den Tierbeständen, den Überlebens- und Vermehrungsbedingungen in der Lebensmittelindustrie, der Virulenz des Erregers und dem jeweiligen Immunstatus der Bevölkerung. Somit erklärt sich auch die Häufung von Salmonelosen in den wärmeren Monaten (KRAUSE 2001).

Dabei ist ein unterschiedliches epidemiologisches Verhalten der einzelnen Vertreter von *Salmonella* sp. zu verzeichnen. Der sporadisch auftretende Typ ist mit 85 % in Deutschland der hauptsächlich vorkommende. Salmonellen können aber auch epidemisch ständig auftreten, wie z.B. *S. Typhimurium*. Allerdings sind die Ursachen für diese verschiedenen Epidemietypen noch nicht erklärbar.

In Europa musste bis 1980 ein stetiger Anstieg der Salmonellosefälle verzeichnet werden, woraufhin die Zahlen bis 1985 kontinuierlich zurückgingen. Diesem Abfall folgte dann ein erneuter Anstieg bis 1992. Nach diesem Peak schloss sich wiederum eine Senkung der Fälle an, die seit 1995 verlangsamt verläuft.



**Abbildung 2. Die Entwicklung der Salmonellen-bedingter *Enteritis infectiosa* bei Menschen in Deutschland von 1991 bis 2002.** (nach Robert Koch Institut; die Serovar-Zahlen bis 2000 beruhen auf Mitteilungen aus den Neuen Bundesländern und Berlin, ab 2001 nach IfSG))

Erst mit Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) werden Daten zentral erfasst. Dies ist bedeutungsvoll bei diffusen Ausbrüchen ist und ermöglicht exaktere statistische Aussagen. Die Salmonellose ist demnach mit ca. 65 000 Erkrankungen pro Jahr die am häufigsten registrierte lebensmittelbedingte Infektionskrankheit (ANONYMUS 2004). Tatsächlich sollte man von einer zehn- bis hundertfachen Dunkelziffer ausgehen, da vermutlich nur 1 % bis 10 % der Erkrankungen amtlich gemeldet werden (SELBITZ u. BISPING 1995). Der Vergleich mit Studien in anderen Industrieländern bestätigt die Annahme der beträchtlich höheren Dunkelziffer (VOETSCH et al. 2004).

Epidemiologisch sind die beiden Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* die derzeit häufigsten Verursacher der humanen *Enteritis infectiosa*, die Anfang der 90-er Jahre zu 81 % durch Salmonellen bedingt war (ZASTROW u. SCHONEBERG 1993). Derzeit beträgt der Anteil von *Salmonella* sp. ca. die Hälfte aller *Enteritis infectiosa*-Fälle (HARTUNG 1999; ANONYMUS 2004). Dabei hat der Phagentyp DT104 von *S. Typhimurium* mit 39 % bereits die zweite Position hinter *S. Enteritidis* PT 4 mit 69 % eingenommen. Dies ist aufgrund der chromosomal fixierten Multiresistenz von *S. Typhimurium* DT104 von großer Bedeutung (LIESEGANG et al. 1997).

#### 2.1.2.2 Salmonelleninfektion des Schweins

Wie auch bei der humanen Salmonellose können die Infektionen beim Schwein ihrer Ausprägung entsprechend in Abhängigkeit zum jeweiligen Serovar in zwei Krankheitsbilder gegliedert werden. So werden die primären Salmonellosen durch schweineadaptierte Serovaren, zu denen *S. Cholerasuis* und *S. Typhisuis* zählen, ausgelöst. Die Verursacher der sekundären Salmonellosen sind *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, aber auch zahlreiche andere Serovaren, die jedoch nur von geringer Bedeutung sind. Die sekundäre Salmonellose des Menschen ist vor allem ein Problem der Fleischhygiene. Dabei handelt es sich vor allem um die latente Form der Salmonellose, die betroffenen Tiere zeigen keine klinischen Symptome, sind jedoch Ausscheider und erleichtern somit im Schlachtprozess eine Kontamination von Produkten (GAREIS 1995).

Die speziesadaptierten Serovaren verursachen die primäre Salmonellose, die in die enterische, die lokal begrenzte und abszedierende sowie in die septikämische Form zu unterteilen ist. Der Verlauf der primären Salmonellose ist abhängig von der Abwehrlage des Tieres, die durch verschiedene Stressoren, den Manifestationsort und das



Infektionsserovar geprägt wird (MARG et al. 2001). Es kommt hauptsächlich auf dem fäkal-oralen Weg zu einer Infektion. Das Reservoir stellen hier ebenfalls vorwiegend latent infizierte Tiere dar (FEDORKA-CRAY 1997). Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bis zu mehreren Wochen erkranken im Bestand vor allem Schweine in einem Alter von zwei bis vier Monaten an einer perakuten bis chronischen Form. Es steht meist die Septikämie im Vordergrund, in deren Verlauf gehäuft Todesfälle auftreten. In den betroffenen Beständen sind Fieber, Erbrechen, Diarrhoe und Zyanosen zu beobachten.

Handelt es sich um ein akutes Geschehen, so sind die Hauptsymptome von pneumonischer Art (SELBITZ 1992). Entwickelt sich daraus eine subakute und chronische Salmonellose, so folgt der zuerst vorherrschenden Obstipation Durchfall mit wechselnder Kotkonsistenz. Die typische Färbung des Kotes ist gelbgrau, teilweise mit Blutbeimengungen. Die betroffenen Tiere kümmern (DEDIE et al. 1993).

Erreger der sekundären Salmonellose sind nicht an das Schwein adaptierte *Salmonella*-Serovaren. In Deutschland wird *S. Typhimurium* in über 50 % der Fälle als Infektionskeim der sekundären Salmonellose des Schweins festgestellt (SELBITZ 1992). Wie bereits erwähnt, können sich je nach Abwehrlage und Infektionsdosis auch bei sekundären Salmonellosen perakute und akute Verläufe herausbilden. Jedoch neigen diese enterischen Salmonellosen eher zur Chronizität, die in ein Dauerausscheidertum münden (GAREIS 1995). Bei sekundären Salmonellosen erfolgt der Erreger-Eintrag zum großen Teil über kontaminiertes Futter, wobei bei *S. Typhimurium* auch belebte Vektoren als Infektionsquelle nicht zu vernachlässigen sind (ROLLE u. MAYR 1993). So zeigten Henzler und Opitz, dass Nagerkot eine durchschnittliche Keimbelastung von  $10^5$  KBE/g aufweist (1992).

Die besonders schweren Verlaufsformen der sekundären Salmonellose des Schweines werden überwiegend durch *S. Typhimurium* DT104 hervorgerufen. So kann man bei einem perakuten oder akut-septikämischen Verlauf als pathologisch-anatomisches Bild eine akut katarrhalische bis hämorrhagisch-fibrinöse Gastroenteritis, generalisierte petechiale Blutungen in den serösen Häuten, Milzhyperplasie und ödematöse Lymphknotenschwellungen feststellen. Bei dem subakuten bis chronischen Verlauf entwickelt sich eine diphteroide-nekrotisierende Typhlokolitis, sowohl Hyperplasien von Milz und Lymphknoten. Miliare Nekrosen in Mesenteriallymphknoten, Milz, Leber, Knochenmark, Lunge und Nieren sind auffindbar. Manche Tiere können von eitrigen Bronchopneumonien, serofibrinösen Polyserositiden, Polyarthritiden,

Tendovaginitiden, Peri- und Myokarditiden und Nabelentzündungen betroffen sein (DEDIE et al. 1993). Typisch für eine *S. Typhimurium*-Infektion ist eine mit einer Thrombophlebitis vergesellschaftete, ulzerierende Proktitis, die aufgrund von Thrombosen zu einer ischämischen Proktitis wird. Weitere Folgen sind daher narbige Rektumstrikturen, gefolgt von Obstipationen, Tympanie und Abmagerung (WALDMANN u. PLONAIT 1997).

1996 wurde eine bundesweite Pilotstudie in Deutschland über das Vorkommen von Salmonellen durchgeführt. So wurden insgesamt 28 Serotypen von 11 942 Schlachtkörpern mit mikrobiologischen und serologischen Methoden isoliert, bei 72 % handelte es sich um *S. Typhimurium*. Bei der anschließenden Phagentypisierung konnten 23 Phagentypen identifiziert werden, mehrheitlich die Phagentypen DT104 und DT193.

Der Phagentyp DT104 ist ein kontinuierlicher Prävalenzanstieg zu beobachten. 1992 lag die Isolierungsrate beim Schwein lediglich bei 3,9 %, 1995 war sie bereits auf 14,8 % angestiegen und 1996 wurde der Anteil von DT104 mit 30,8 % konstatiert (WALDMANN u. PLONAIT 1997; RABSCH et al. 1998). Im Jahr 2002 betrug der prozentuale Anteil von DT104 an allen *S. Typhimurium*-Isolaten beim Schwein 55,2 %. Die vom Nationalen Referenzlabor für Salmonellen 2002 getesteten Salmonellen-Isolate wiesen zu 45,2 % eine Einfach- bzw. Mehrfachresistenz auf, wobei die Isolate vom Schwein bei einer Resistenz von 83,3 % erheblich dazu beitrugen. Bedeutungsvoll ist der hochresistente Lysotyp DT104 mit seiner chromosomal kodierten Fünf- bzw. Mehrfachresistenz, der einen Anteil von 39 % ausmacht. Beim Schwein sind 95,7 % der *S. Typhimurium* DT104 Isolate mindestens fünffach resistent (HELMUTH R. et al. 2003).

Die Bekämpfung der Salmonelleninfektion in den Beständen gestaltet sich aufgrund der schwer zu überblickenden Infektionsketten sehr kompliziert. Diese Komplexität ergibt sich durch die Fähigkeit der Salmonellen, zwischen verschiedenen Tierarten und dem Menschen zu zirkulieren, aus der epidemiologischen Verflechtung ihrer Wirte, aus der geringen oder fehlenden Wirtsspezifität der meisten Serovare, ihrer hohen Tenazität und der Möglichkeit, latente Infektionen auszulösen, die auch direkt durch eine Manifestation zu einem Keimträgertum führen können (KRAUSS et al. 1997). Daher stützen sich die Bekämpfungsstrategien vor allem auf zielgerichtete Hygienemaßnahmen (ROLLE u. MAYR 1993).

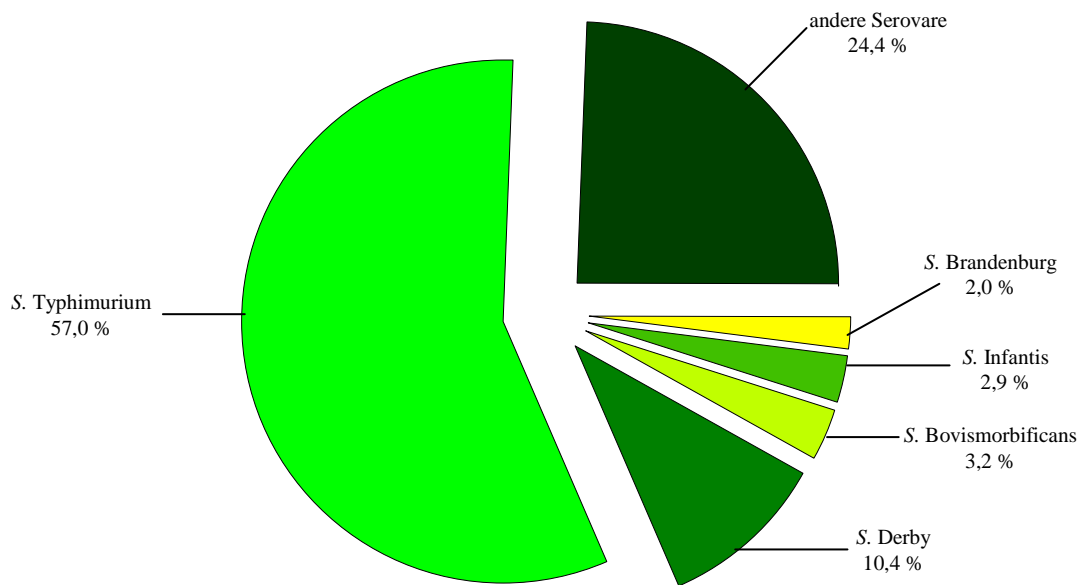


Abbildung 3. Das Vorkommen von *Salmonella*-Serovaren beim Schwein in Europa im Jahr 2002.

### 2.1.3 Virulenzfaktoren

Generell sind beide Spezies *S. enterica* und *S. bongori* als pathogen für den Menschen und das Tier anzusehen. Demnach gilt jede vom Tier isolierte *Salmonella*-Serovar als potentieller Zoonoseerreger. Eine Einstufung als avirulente Serovar oder avirulenter Stamm darf erst nach entsprechender Prüfung erfolgen. Die Virulenz des Isolates wird durch verschiedene Faktoren bzw. Mechanismen wie der Adhäsivität, Invasivität, dem intrazellulären Parasitismus und der Toxinbildung definiert. In der Gattung *Salmonella* lassen sich keine Gruppen mit voneinander abgrenzbaren Virulenzeigenschaften bilden, wie es z.B. bei *E. coli*, ebenfalls einem Vertreter der *Enterobacteriaceae*, der Fall ist (SELBITZ 2002a). Es wird vermutet, dass Salmonellen über ca. 200 Virulenzfaktoren verfügen. Zahlreiche Pathogenitätsfaktoren der Salmonellen konnten bereits identifiziert werden. Zum größten Teil wurden die Untersuchungen zur Pathogenität jedoch im Mausmodell durchgeführt. Die so gewonnenen Ergebnisse kann man jedoch nur begrenzt auf andere Wirtsspezies übertragen (FEDORKA-CRAY et al. 2000).

Zwei komplexe Virulenzmodule befähigen die Salmonelle zu ihrer Pathogenese. Durch diese kann der Erreger mit der Wirtszelle interagieren und Wirtszellfunktionen modifizieren.

#### 2.1.3.1 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Man vermutet, dass allein 4 % des *Salmonella*-Chromosoms ausschließlich für Virulenzfaktoren kodieren (BOWE et al. 1998). Diese Gene formieren sich zu Pathogenitätsinseln (PAI), kleineren Genklustern oder sie liegen einzeln vor (MCCLELLAND et al. 2001). Der Erstbeschreiber dieser PAI ist HACKER, der diese 1990 in *E. coli* entdeckte. Sie stellen meist große Insertionen im Genom mit über 30 kBp dar. Aufgrund ihres hohen G+C-Gehaltes kann man sie deutlich vom restlichen Genom abgrenzen. Sie dienen als mobile genetische Einheiten, weswegen sie oft von direkten Wiederholungssequenzen flankiert sind und häufig an tRNA-Genen liegen (HACKER et al. 1997). Bisher konnten in der Gattung *Salmonella* fünf Pathogenitätsinseln identifiziert werden, wobei die *Salmonella*-Pathogenitätsinseln SPI 1 und 5 die Gene für die Invasion der Erreger in die Darmepithelzellen beinhalten. Die SPI 2, SPI 3 und SPI 4 sind für das Überleben und Replizieren der Salmonellen innerhalb der Wirtszelle verantwortlich, was zu einer systemischen Ausbreitung im

Organismus führt (FIELDS et al. 1986). Bevor der Prozess der Invasion vonstatten gehen kann, muss eine Anheftung an das Darmepithel erfolgen. Durch fimbrielle Adhäsine vermittelt ist dies der erste spezifische Kontakt, der je nach Wirtsspezies an Enterozyten oder M-Zellen innerhalb der Peyerschen-Platte erfolgt (BAUMLER et al. 1997; FROST et al. 1997). Der Vorgang der Invasion ermöglicht es den Salmonellen, auch in nicht-phagozytierende Zellen einzudringen. Die Mehrzahl dieser Gene wurde identifiziert; wie bereits erwähnt, befinden sie sich auf der SPI 1. Dies ist ein 40 kB großer Abschnitt in der Centisom-63-Region des Chromosoms. In einem Mäusemodell zeigten GALAN und CURTIS (1989), dass bei einer oralen Infektion mit SPI 1-Mutanten die LD<sub>50</sub> im Vergleich zum Wildtypstamm 50-fach erhöht ist. Ebenfalls war die Kolonisierung der Peyerschen-Platten, der Darmepithelien und der Milz deutlich herabgesetzt. Dagegen ergaben sich nach parenteraler Infektion keine Unterschiede in der Virulenz zwischen Mutante und Wildtyp. Somit ließ sich der Schluss ziehen, dass sich die Bedeutung von SPI 1 vor allem auf den Vorgang der Invasion beschränkt.

Die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben und Replizieren in den Wirtszellen ist der zweite wichtige Aspekt in der Pathogenese der Salmonellen. Die Gene, die dies ermöglichen, sind auf der SPI 2 lokalisiert. Diese Pathogenitätsinsel kann man funktionell in zwei Abschnitte unterteilen. Bei Centisom 30,5 auf einem 15 kBp großen Fragment befinden sich Gene für ein Tetrathionatreduktase-System. Dieses System ermöglicht es *Salmonella*, Tetrathionat als Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung zu nutzen. Der Abschnitt, der für die Virulenz von Bedeutung ist, ist ein 25 kBp großes Fragment bei Centisom 31. Es trägt die Gene, die für den Typ III-Sekretionsapparat und für zahlreiche Effektorproteine kodieren, deren Funktion jedoch noch weitgehend ungeklärt ist (HENSEL et al. 1999). Mit Hilfe des Mausmodells konnte aber bei SPI 2-Mutanten eine Verminderung der Virulenz in Form des Unvermögens, sich in Leber und Milz zu vermehren, und der gesenkten Fähigkeit, systemische Infektionen auszulösen, gezeigt werden. In *in vitro*-Studien wiesen die Deletionsmutanten geringere Überlebensfähigkeit in Makrophagen und einen Replikationsdefekt in monozytären Zellen auf (HENSEL 2000).

Von Bedeutung ist außerdem, dass Gene auf der SPI 1 und SPI 2 lokalisiert sind, welche für zwei Typ III-Sekretionsapparate kodieren. Generell kann man die Komponenten eines Typ III-Sekretionsapparates in vier Hauptgruppen unterteilen. Es handelt sich um die strukturellen Proteine, die akzessorischen Proteine, die Regulatorproteine und die sezernierten Proteine (GALAN u. BLISKA 1996).

Durch diese Sekretionssysteme wird dem Mikroorganismus die Einschleusung von Effektorproteinen in die Wirtszelle ermöglicht (HUECK 1998). Diese Proteine beeinflussen die wirtseigenen Signaltransduktionswege, wodurch eine Reihe zellulärer Antworten ausgelöst wird. So wird die zentrale Rolle des Typ III-Sekretionsapparates in der Manipulation des Wirtes deutlich (GALAN 1999; GALAN u. ZHOU 2000).

Zu der strukturellen Komponente des SPI 1-kodierten Typ III-Sekretionssystems zählt das bereits 1989 entdeckte *invC*-Gen (GALAN u. CURTISS ). Es ist sequenzhomolog zu Vertretern der  $F_0F_1$ -ATPase-Proteinfamilie. Durch seine signifikante ATPase-Aktivität kann man davon ausgehen, dass es zur Versorgung des Protein-Export-Apparates mit Energie beiträgt (EICHEMBERG et al. 1994). Man nimmt an, dass dieses 47 kDa große Polypeptid aus drei diskreten Domänen aufgebaut ist. Bei der ersten Domäne handelt es sich um eine Amino-terminale Domäne, die wahrscheinlich die Verbindung von *invC* mit der Membran vermittelt. Bei der zweiten handelt es sich um eine zentrale katalytische Domäne. Die dritte, eine carboxylterminale Domäne, ist mitverantwortlich für Protein-Protein-Interaktionen, die für die Funktion des Typ III-Sekretionssystems bedeutend sind. Es zeigte sich bei gereinigtem rekombinanten *invC*, dass es in monomerer sowie multimerer Form, vermutlich als Hexamer, vorliegen kann.

Generell ist jedoch wenig über die Mechanismen dieser funktionellen Einheit bekannt (AKEDA u. GALAN 2004).

Wie bereits erwähnt, stellt das Überleben und sich Replizieren von *Salmonella* in eukaryontischen Zellen, genauer gesagt in Makrophagen, ein weiteres wichtiges Kennzeichen der Pathogenese dar. Realisiert wird dieser Phänotyp durch den auf SPI 2 kodierten Typ III-Sekretionsapparat (SHEA et al. 1999). Ziel ist es, den Abtötungsmechanismen der Zelle zu entkommen. So wird der Kontakt der Salmonellen-haltigen Vesikel in den Makrophagen mit tödlicher NADPH-Oxidase verhindert (VAZQUEZ-TORRES et al. 2000).

Auch der Schutzmechanismus der eukaryontischen Zelle in Gestalt reaktiver Sauerstoff-Intermediate kann durch die Funktion von SPI 2 unterbunden werden, indem die Stickstoffoxid-Synthase gehemmt wird und es zu keiner Bildung reaktiver Sauerstoff-Intermediate kommt (CHAKRAVORTTY et al. 2002). Der Unterschied zu anderen Typ III-Sekretionsapparaten besteht darin, dass seine Effektorproteine nicht durch die Wirtszellmembran, sondern durch die Vakuolenmembran transloziert werden (HOLDEN 2002).

SseB, SseC und SseD stellen Strukturproteine des SPI 2-kodierten Typ III-Sekretionsapparates dar. Sie bilden eine auf der Bakterienoberfläche lokalisierte Translokatorstruktur, wobei SseC und SseD eine in der Wirtszellmembran befindliche Translokator-Poren-Untereinheit bilden. SseB ist eine scheidenartige Untereinheit mit der Aufgabe, den Translokator in der Bakterienmembran mit der Porenuntereinheit in der Wirtszellmembran zu verbinden. Außerdem existiert im SseD-Protein eine zentrale Domäne, die die Fähigkeit besitzt, Bindungen zu modifizieren (ZURAWSKI u. STEIN 2004). In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Sekretion dieser Proteine im sauren Milieu erfolgt (BEUZON et al. 1999; NIKOLAUS et al. 2001). Neben diesen Translokatorproteinen kodiert SPI 2 noch für eine Reihe von Effektorproteinen. Als Beispiel seien *sseF* und *sseG* erwähnt. Ihnen wird eine Beteiligung an der Ausbildung von eukaryontischen *Salmonella*-induzierten Filamenten in infizierten Epithelzellen zugeschrieben (GUY et al. 2000). Bisher kann keinem der *Salmonella*-translozierten Effektoren von SPI 2 ein Virulenz-Phänotyp beigemessen werden.

Abgesehen von den bereits aufgeführten Virulenzfaktoren, werden mit Salmonelleninfektionen weitere verschiedene potentielle Virulenzfaktoren in Verbindung gebracht. Diese sind Geißeln, Fimbrien, Enterotoxin, Cytotoxin, Hitzeschockprotein, Lipopolysaccharide und Siderophore.

Beim Lipopolysaccharid (LPS), einem essentiellen Bestandteil der äußeren Membran von Salmonellen, handelt es sich um ein Makromolekül mit amphiphilem Charakter. LPS gilt als ein Hauptvirulenzfaktor. Es besteht aus einem in die äußere Membran eingebetteten Lipid A, einer Core-Region und einer O-Antigen-Zone, welche aus sich wiederholenden Oligosacchariden besteht (KRÜGER 2002).

CLARKE und GYLES zeigten, dass bei Mutanten, die einen Defekt im LPS tragen, die Virulenz stark gesenkt war. Bei diesen Mutanten fehlt das O-Antigen und es bildet sich die so genannte rauhe-Form (R-Form) aus. Diese Stämme sind empfänglicher für Phagozytose und lysosomale Angriffe (1993). Die durch Endotoxin hervorgerufenen vaskulären Schäden und Thrombosen führen zu einem Anfluten von Entzündungsmediatoren und Zytokinen, ebenso fördern sie zusätzlich den degenerativen Prozess der intestinalen Epithelzellen. Systemische Wirkungen können Fieber, disseminierte intravasale Koagulation und kollabierende Zirkulation, resultierend im Schockgeschehen, sein (CLARKE u. GYLES 1993).

Ein bisher noch unzureichend charakterisiertes Enterotoxin wurde bei verschiedenen Serovaren beschrieben. *S. Typhimurium* bildet ein Choleratoxin-ähnliches Enterotoxin, das in Struktur und Funktion dem hitzelabilen (LT) Enterotoxin von *E. coli* und dem Choleratoxin von *Vibrio (V.) cholerae* ähnelt (PRASAD et al. 1992). Aufgrund dieser Ähnlichkeit geht man davon aus, dass die B-Untereinheit (Bindungsprotein) sich an die Membran der intestinalen Zellen bindet und die A-Untereinheit (toxische Komponente) internalisiert wird, was zur Aktivierung von intrazellulärem cAMP und PGE<sub>2</sub> führt. Folglich kommt es zu einer gesteigerten Sekretion von Elektrolyten mit einem daraus resultierenden Wassereinstrom ins Darmlumen. Die bei verschiedenen Serovaren beschriebenen Zytotoxine verursachen eine Schädigung der intestinalen Epithelzellen, einem typischem Befund bei der Salmonellen-Enteritis. Werden Salmonellen Stress ausgesetzt, sind sie in der Lage, Hitzeschockproteine zu bilden. Es zeigte sich, dass diese Fähigkeit auch für das Überleben in Makrophagen von Bedeutung ist, so dass Deletionsmutanten eine geringere Überlebensrate aufweisen (CLARKE u. GYLES 1993). 1985 wurde das Enterobactin, ein Siderophor, bei *S. Typhimurium* identifiziert. Es ist essentiell für die Eisenversorgung der Salmonelle (BENJAMIN et al. 1985).

#### 2.1.3.2 Plasmid kodierte Virulenzfaktoren

Seit den 80er Jahren ist bekannt, dass Salmonellen Virulenzplasmide tragen können. Man findet sie bei allen wirtsadaptierten Serovaren außer bei *S. Typhisuis*, *S. Typhi* und *S. Paratyphi*. Ausnahmen bei den nicht-wirtsadaptierten Serovaren, die sonst generell keine Plasmide tragen, bilden *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Bovismorficans*. Infolgedessen findet man bei den meisten *S. Typhimurium*-Isolaten ein 90 kBp großes Plasmid (SPRATT et al. 1973; POPOFF et al. 1984; BOYD u. HARTL 1998).

Es handelt sich bei den *Salmonella*-Virulenzplasmiden, auch als „Low-Copy“-Plasmide bezeichnet, um relativ große, doppelsträngige, zirkuläre DNA-Moleküle, die in bis zu drei Kopien in einer Salmonelle vorkommen können (TINGE u. CURTISS, III 1990). Alle Plasmide haben eine Größe von 50 bis 140 kBp, die für das jeweilige Serovar typisch ist. Ein Charakteristikum ist das Auftreten des „*Salmonella* plasmid virulence“-Locus (*spv*-Locus), der stets in Aufbau und Sequenz gleich ist. Dieser 7,8 kBp umfassende Abschnitt beinhaltet fünf Strukturgene, *spvR*, -A, -B, -C und -D, die als Operon organisiert sind (GUINEY et al. 1994). Das *SpvR* Protein (33,9 kDa) ist



essentiell für die *spv*-kodierte Virulenz, denn es fungiert als Hauptregulator der *spv*-Transkription. Folglich zeigte sich im Mäuseinfektionsmodell bei *spvR*-Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* eine reduzierte Virulenz. Nach oraler Infektion konnte in der Milz eine 13 500 fach höhere Keimzahl beim Wildtyp nachgewiesen werden. Die mit den Mutanten infizierten Mäuse verendeten im Gegensatz zur Wildtypgruppe nicht (LIBBY et al. 2000). Des Weiteren konnte in einem Kälberinfektionsversuch mit einer *S. Dublin spvR*-Deletionsmutante eine deutliche Attenuierung festgestellt werden. Die mit der Deletionsmutante infizierten Tiere entwickelten lediglich eine leichte Diarrhoe, wohingegen die Infektion mit dem Wildtyp zu einer hochgradigen, wässrigen Diarrhoe sowie Bakteriämie führte (LIBBY et al. 1997). Für das in der äußeren Membran lokalisierte 28,2 kDa große *SpvA* Protein ist bisher kein Beleg virulenter Eigenschaften erbracht worden (VALONE et al. 1993). Das *SpvB* Protein (65,6 kDa) befindet sich im Zytoplasma und in der Zytoplasmamembran des Mikroorganismus. Es ist für die plasmidvermittelte Virulenz wichtig, da im Infektionsversuch mit *spvB*-Deletionsmutanten eine geringere Besiedelung von Milz und Peyerschen-Plaques augenscheinlich wurde (GULIG et al. 1992). Die beiden weiteren Proteine *SpvC* (27,6 kDa) und *SpvD* (24,8 kDa), die im Zytoplasma der Salmonelle zu finden sind, tragen ebenfalls zur Virulenz bei. Darüber hinaus zeigten sich die gleichen Konsequenzen wie bei den bereits besprochenen *spv*-Deletionsmutanten (ROUDIER et al. 1992).

Des Weiteren befindet sich auf dem Virulenzplasmid ein *mig-5*-Gen (macrophage inducible gene), welches für ein Lipoprotein kodiert. Dieses fungiert als Carboanhydrase.

Bei einer *i.p.* Infektion von Mäusen mit einer *mig-5*-Gen-Deletionsmutante wurde nur eine 15 %ige Besiedlung der Milz im Vergleich zum Wildtyp erlangt. Die genaue Wirkungsweise dieses Enzyms ist jedoch noch ungeklärt (VALDIVIA u. FALKOW 1997).

Bei *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* besitzt das Virulenzplasmid außerdem noch die Genloci (7kbp) *pefA*, -B, -C, -D und -I, die für die Pef-Fimbrien (plasmid encoded fimbriae) kodieren. Es ist wahrscheinlich, dass diese Fimbrien der Salmonelle als Kolonisationsfaktor dienen, indem sie die Anheftung an die Dünndarmschleimhaut ermöglichen (VAN DER VELDEN et al. 1998).

Einfluss auf die Komplementresistenz haben die drei Loci *rsk* (reduced serum killing), *rck* (resistance to complement killing) und *traT* (HEFFERNAN et al. 1992).

### 2.1.3.3 Intrazelluläre Persistenz und Replikation von *Salmonella*

Intrazelluläre Persistenz und Replikation in Wirtszellen sind von eminenter Wichtigkeit für die Pathogenese von *Salmonella*. Durch diese Fähigkeiten ist es dem Erreger möglich, sich im Körper auszubreiten und der effektiven Wirtsabwehr zu entgehen (LINDGREN et al. 1996).

Diese Befähigungen scheinen allerdings an eine Wirtsadaptation des Erregers gekoppelt zu sein. Denn bei einem Vergleich zwischen *S. Typhimurium* und *S. Typhi* ist die Überlebenszeit in murinen und humanen Makrophagen in den jeweils wirtsspezifischen Zellen deutlich erhöht (SCHWAN u. KOPECKO 1997).

Ist die Salmonelle in den Makrophagen invadiert, befindet sie sich in weitlumigen Phagosomen, den so genannten „spacious phagosomes“ (SP). Diese SP's persistieren im Zytoplasma und sind in der Lage, ihr Lumen weiter zu vergrößern, indem sie miteinander oder mit „Makrospinosomen“ verschmelzen (ALPUCHE-ARANDA et al. 1994). Salmonellenhaltige Phagosomen unterliegen nicht dem üblichen degradativen Weg, sondern verschmelzen mit lysosomalen, glykoproteinhaltigen Vesikeln. Dabei handelt es sich ebenfalls um Lysosomen, die jedoch einen deutlichen Unterschied zu ausgereiften Lysosomen aufweisen. Sie besitzen keine Manose-6-Phosphat Rezeptoren. Durch die Abwesenheit dieser Rezeptoren ist der Transport von bestimmten Enzymen, zum Beispiel Kathepsin, aus dem Golgi-Apparat in die endosomalen Kompartimente unterbunden. Es entwickelt sich somit ein Phagolysosom mit einem deutlich anderen Enzymmuster (RATHMAN et al. 1997).

Die Salmonelle ist verschiedenen Abwehrmechanismen der Wirtszelle ausgesetzt. Um zu überleben, unterliegt sie einer Stoffwechsellumstellung, so dass eine Reihe von Proteinen vermehrt synthetisiert und andere reprimiert werden. Je nach Wirtszelltyp tritt daher ein bestimmtes neues Proteinmuster in Erscheinung (ABSHIRE u. NEIDHARDT 1993; BURNS-KELIHER et al. 1998).

Dadurch wird eine Resistenz gegen Defensine, reaktive Sauerstoffmetabolite und einen niedrigen pH-Wert vermittelt. Der Schutz vor Defensinen wird durch zwei Zwei-Komponenten-Regulatorsysteme gewährleistet. Diese sind das *phoP/phoQ*-System und das *pmrA/pmrB*-System. Bisher hat man 11 Gene identifizieren können, die so genannten *sap* (sensitive to antimikrobiell peptides) – Gene. Diese exprimieren für zwei Transportsysteme, die ihre Energie zum einen aus ATP und zum anderen aus NADH beziehen. So besteht die Vermutung, dass mit Hilfe

dieser Transporter die Defensine aus dem Periplasma in das Zytoplasma geschleust werden, wo sie durch zelluläre Proteasen abgebaut werden (GROISMAN 1994).

Gegen die reaktiven Sauerstoffmetabolite (Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid, oxidierte Halogene) schützt sich *Salmonella* durch drei Mechanismen. Die Rekombinationsgene *recA* und *recBC* sorgen für Reparaturen an der DNA, die durch oxidative Reagentien geschädigt wurde (BUCHMEIER et al. 1993). *SlyA* und *RpoS* stellen transkriptionale Regulatoren dar, die für das Überleben im Makrophagen notwendig sind (LIBBY et al. 1994). Der transkriptionale Aktivator *OxyR* kontrolliert eine Reihe von Genen, die das Bakterium vor Wasserstoffperoxideinfluß schützen. Diese Gene kodieren zum Beispiel für eine Katalase und eine Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, so dass die Verstoffwechslung des Wasserstoffperoxids erfolgt (FRANCIS et al. 1997).

Wie bereits erwähnt, ist die Ansäuerung des Phagolysosoms gleichermaßen ein stark limitierender Faktor für das Überleben und die Vermehrung der Salmonelle im Makrophagen. *Salmonella* schützt sich mit drei Säuretoleranzsystemen. Beim ersten handelt es sich um das „log-phase acidtolerance response“-System (log-phase ATR“). Es ermöglicht eine langsame Anpassung an den verringerten pH-Wert. Gesteuert wird dieses zweiphasige System durch ein Fur-Protein (ferric uptake regulator), das vermutlich direkt auf den pH-Wert reagiert. Sinkt der pH-Wert auf 6,0, beginnt die „pre-shock“ Phase (FOSTER 1993).

Hier findet eine Alkalisierung des Zytoplasmas der Salmonellenzelle statt. Verwirklicht wird dies durch Aminosäure-Decarboxylase-Systeme wie zum Beispiel das CadA/CadB-System, welches Lysin zu Cadaverin decarboxyliert und dabei ein H<sup>+</sup>-Atom bindet (BEARSON et al. 1997). Fällt der pH-Wert unter 4,5, schließt sich die „Säureschock“ Phase an. Die Salmonelle beginnt mit der Produktion von mehreren „acid shock proteins“ (ASP). Sie verhindern und reparieren makromolekuläre Schäden (FOSTER 1993; BEARSON et al. 1997).

Des Weiteren kann *Salmonella* auf zwei weitere voneinander unabhängige Säuretoleranzsysteme zurückgreifen, die beide in der stationären Phase aktiv sind. Durch das „stationary-phase-ATR“, welches unabhängig von RpoS agiert, werden über einen längeren Zeitraum 15 ASP`s synthetisiert (LEE et al. 1994). Das RpoS-abhängige Säuretoleranzsystem führt ebenfalls zu einer langanhaltenden Säuretoleranz. RpoS ist ein ASP, das acht weitere ASP`s kontrolliert. Noch zu erwähnen bleibt, dass das

RpoS-abhängige System den Mikroorganismus überdies vor anderen exogenen Noxen schützt (Hitze, Wasserstoffperoxid, hohe Osmolarität) (LEE et al. 1995).

#### 2.1.3.4 Auswirkung von *Salmonella* sp. auf die infizierte Wirtszelle

Bereits 4 bis 8 Stunden nachdem die Salmonelle den Makrophagen besiedelt hat, kann sie seine Apoptose induzieren. Dadurch umgeht sie einer effektiven Abwehr und kann nun extrazelluläre Räume und benachbarte Zellen befallen (LINDGREN u. HEFFRON 1997). Ermöglicht wird dies durch SipB, ein Effektorprotein, welches auf der SPI 1 kodiert ist. Direkt nach der Infektion des Makrophagen ist dieses Protein in seinem Zytoplasma nachweisbar. SipB aktiviert Caspase1. Die Aktivierung der Cystein-Protease ist für die Apoptose erforderlich (HERSH et al. 1999).

#### 2.1.4 Mutationen

Eine Mutation ist eine Veränderung der DNA-Basen-Sequenz gegenüber dem ursprünglichen Genotyp. Die sich unter antimikrobieller Exposition herausgebildeten Mutanten weisen gegenüber dem Wildtyp deutliche Selektionsvorteile auf (RUIZ et al. 1999). Werden einzelne Nukleotidbasen ausgetauscht, spricht man von einer Punktmutation. Dreht es sich um größere Veränderungen in Form von Insertionen (Hinzufügen von Basenpaaren), Deletionen (Verlust von Basenpaaren) und Inversionen (Herausschneiden und Einsetzen eines DNA-Moleküls in umgekehrter Reihenfolge), liegt eine Rastermutation vor (HUTCHINSON 1996; HUTCHINSON u. DONNELLAN 1996). Von großer Bedeutung sind Mutationen, wenn es zur Weitergabe von Resistenzen kommt. Diese können spontanen oder adaptiven Charakters sein. Eine Spontanmutation ist zufällig und findet während der Zellteilung statt. Man zählt null bis fünf Mutanten pro  $10^8$  Keime. Durch Selektionsdruck entwickeln sich adaptive Mutationen, die aber auf eine Spezies beschränkt bleiben und nur zu räumlich begrenzten Resistenzen führen. LeClerc beschreibt bei pathogenen *E. coli*- und *S. enterica*-Stämmen hohe Mutationsraten ( $> 1\%$ ), wobei diese Mutanten eine 1000-fach höhere Rifampicin-Resistenz gegenüber dem Wildtyp besitzen (1996).

Zur Charakterisierung möglicher Gen- und Proteinfunktionen sind gentechnisch erzeugte Deletionsmutanten, bei denen ein Ausschalten definierter Gene eintritt,

Erkenntnis verschaffend. Da die Pathogenese von *Salmonella* von mehreren Virulenzfaktoren vermittelt wird, sind für das Verständnis selbiger vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Deletionsmutanten notwendig.

In dieser Arbeit finden zwei Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* DT104, die durch P22-Transduktion konstruiert wurden, Anwendung. Bei der Mutante 810 liegt eine Deletion von *invC* in der SPI 1 vor. Bei der Mutante 809 wurde das Gen *sseD*, das auf der SPI 2 lokalisiert ist, deletiert. In beiden Fällen wurde eine Kanamycin-Resistenz-Kassette (*invC::aphT*; *sseD::aphT*) eingebaut (EICHEMBERG et al. 1994). Aufgrund dieser künstlich erzeugten Resistenz wird eine Differenzierung zwischen dem Klon und dem Wildtyp-Stamm ermöglicht. Genkassetten sind kleine mobile genetische Einheiten, die in den meisten Fällen nur ein Resistenzgen und eine spezifische Rekombinationsstelle beinhalten (RECCHIA u. HALL 1995). Das Einfügen in Integrons ermöglicht ihre Mobilität und die Lage zum Promotor des Integrons beeinflusst ihre Expressionsrate (PARTRIDGE et al. 2001).

Wie bereits in Kapitel 2.1.3.1 näher erläutert, führen Mutationen in SPI 1 und SPI 2 in der Regel zu einer Attenuierung von *Salmonella*.

In zahlreichen Untersuchungen am Mäusemodell konnte eine verminderte klinische Belastung der mit diesen Mutanten infizierten Tiere nachgewiesen werden (HEESEMANN u. HENSEL 2000). An Henle-407-Zellen konnte die Invasionsunfähigkeit der *invC*-Mutante dargestellt werden. Zwar war sie in der Lage sich anzuheften, jedoch konnten keine Signale an die Wirtszelle übermittelt werden, so dass die notwendigen Zytoskelettveränderungen ausblieben (GINOCCHIO et al. 1994). Beide Gene kodieren für Proteine, die deutliche Sequenzhomologien zu anderen *Enterobacteriaceae* aufweisen. Als Beispiele seien die Ähnlichkeiten von *invC* zu Spa47 der *Shigella* spp. und zu YscN von *Yersinia* genannt (VENKATESAN et al. 1992; WOESTYN et al. 1994). Homologien der Proteinsequenz von *sseD* sind bei den Sekretionsapparat-Proteinen EspB und EspD von *E.coli* und bei YopB und YopD von *Yersinia* nachgewiesen (KLEIN u. JONES 2001). Unter Berücksichtigung dieser bestehenden Sequenzhomologien kann man von einer hohen Konserviertheit dieser Gene sprechen.

## 2.2 Immunologie

Das komplex aufgebaute Immunsystem, bestehend aus einem zellulären und einem humoralen Anteil, hat die größte Bedeutung für die Abwehr von Infektionserregern. Es lässt sich in einen antigenunspezifischen Teil und einen antigenspezifischen Teil untergliedern. Zu einer sofortigen Immunantwort führt die unspezifische Komponente mittels Makrophagen, NK-Zellen, dendritischen Zellen (zellulärer Anteil) und Zytokinen (humoraler Anteil). Der antigenspezifische Teil reagiert zeitlich verzögert auf ein Antigen, d. h. in Form der zellulären Immunantwort durch T-Lymphozyten nach 5 bis 7 Tagen, in Form der humoralen Immunantwort durch B-Lymphozyten nach 14 bis 21 Tagen (MAYR 2002).

Die Reaktion des Immunsystems steht in Abhängigkeit zur Beschaffenheit des bakteriellen Erregers. So verursachen intrazelluläre Erreger wie Salmonellen eine langsamer einsetzende und nicht immer wirksame Immunreaktion. Durch ihren Aufenthaltsort sind sie vor Antikörpern geschützt. Daher sind die Hauptträger der Immunantwort die T-Lymphozyten.

Die wichtigsten Merkmale der meisten intrazellulären Erreger sind der T-Zell-vermittelte Schutz sowie das Induzieren einer verzögerten allergischen Reaktion und einer granulomatösen Gewebereaktion. Zusätzliche optionale Eigenschaften dieser Erreger stellen die geringe Eigentoxizität/Immunpathologie, das labile Gleichgewicht zwischen Infektion und schützender Immunität, die langwierige Inkubationszeit und der chronische Krankheitsverlauf dar (KAUFMANN 1997).

Wie schon erörtert, handelt es sich bei *Salmonella* um ein fakultativ intrazelluläres Pathogen, das sich in der Wirtszelle von einer Membran umhüllt befindet. Untersuchungen zu zellvermittelten Abwehrmechanismen im Rahmen einer Salmonellose wurden bisher vorwiegend an Mäusen durchgeführt. Hervorzuheben ist, dass Salmonellen in der Lage sind, sowohl die humorale wie auch die zellvermittelte Immunantwort auszulösen (JONES u. FALKOW 1996; LALMANACH u. LANTIER 1999).

### 2.2.1 Zelluläre Immunitätsmechanismen

Gelangt ein Pathogen in den Organismus, wird es von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen) erkannt, phagozytiert, verarbeitet und durch die auf ihrer Oberfläche befindlichen „Major Histokompatibilitäts-Komplexe“ (MHC) den T-Lymphozyten präsentiert (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Lymphozyten werden in T- und B-Lymphozyten unterteilt, wobei die B-Lymphozyten durch die Bildung von Immunglobulinen, welche direkt auf den Erreger wirken, als Basis der humoralen Immunantwort anzusehen sind. T-Zellen werden durch eine Antigenpräsentation von infizierten Zellen aktiviert. Die Antigenerkennung erfolgt über die T-Zellrezeptoren (TZR). Die Population der T-Zellen läßt sich anhand von Oberflächenmolekülen, den so genannten CD-Markern (clusters of differentiation) untergliedern. Von besonderem Interesse sind die CD4- und CD8-T-Lymphozyten, da sie zur antigenspezifischen T-Zellaktivierung beitragen. CD8-T-Zellen werden von Antigenen stimuliert, die von Klasse-I-Molekülen des „Major Histokompatibilitäts-Komplexes“ (MHC) präsentiert werden, und führen vor allem bei viralen Infektionen zu einer zytotoxischen Immunantwort. Dagegen werden die bei bakteriellen Infektionen wichtigen CD4-T-Zellen von Antigenen, welche von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, aktiviert. Sie werden als T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) bezeichnet, denn ihre Funktion ist die Produktion von Botenstoffen, die wiederum andere Zellen aktivieren. Th-Zellen reifen zu Th1-Zellen oder Th2-Zellen.

Welche Form der Th-Zellen entsteht, ist abhängig vom vorhandenen Zytokinmilieu, dargestellt in Abbildung 4. Sie zeichnen sich durch ein jeweils eigenes Zytokinmuster aus, was schließlich in einer unterschiedlichen Qualität der Immunantwort resultiert. Th2-Zellen beeinflussen die B-Zellantwort. Th1-Zellen führen zu einer Aktivierung der Makrophagen (MOSMANN et al. 1986; BOUWER et al. 1997; KAUFMANN 1997). Beim Schwein ist das zwischen 8 bis 60 % anteilige Vorkommen von doppelt positiven CD4/CD8 T-Zellen im Blut als Besonderheit anzusehen. Dabei handelt es sich um antigen-spezifische Memory T-Helferzellen, da sie durch erneuten Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden und mittels der ihnen eigenen MHC-Klasse-II-Moleküle das Antigen präsentieren (ZUCKERMANN u. HUSMANN 1996; SAALMULLER et al. 2002).

Welche der T-Zell-Subpopulation aktiviert wird, entscheidet sich nach dem Aufenthaltsort des intrazellulären Erregers. CD8-T-Zellen werden durch zytosolische

Erreger stimuliert. Geht man von vesikulären (Phagosom, Phagolysosom) Erregern wie *Salmonella* aus, kommt es zu Aktivierung der CD4-T-Zellen. Allerdings werden in den häufigsten Fällen sowohl der endogene als auch der exogene Präsentationsweg durchlaufen.

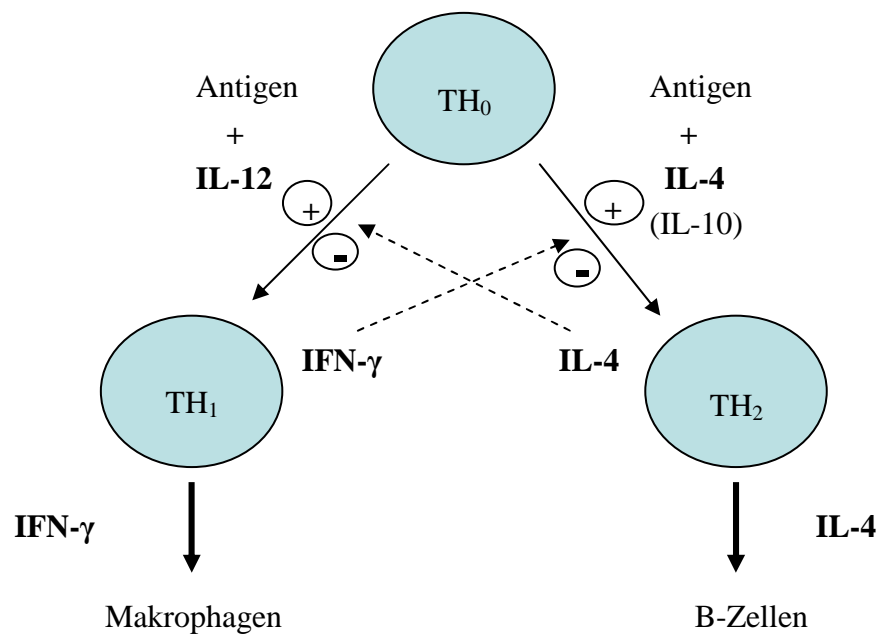


Abbildung 4. Schematische Darstellung der T-Zellreifung in Abhängigkeit zum vorhandenen Zytokinmilieu. (COBBOLD 2000)



### 2.2.2 Interleukine

Zytokine sind Peptide bzw. Glykopeptide mit einem Molekulargewicht von 15 bis 25 kDa. Sie sind die löslichen Mediatoren beim Zusammenspiel der verschiedenen Zellen im Rahmen der Immunantwort. Ihre Wirkung entfalten sie parakrin, autokrin und endokrin bereits in femtomolaren Konzentrationen, indem die Zytokine an hochaffine Oberflächenrezeptoren der Zellen binden und die Proteinsynthese modifizieren. Sie bilden ein eng miteinander verknüpftes Netzwerk und steuern somit die Stärke und Dauer der Immun- und Entzündungsantwort (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Zytokine werden in mehrere Gruppen gegliedert: Interleukine (IL1-IL23), Interferone, „colony-stimulating factors“, Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Chemokine (MCP-1, MIP-1) (GIULIETTI et al. 2001).

Verschiedene Strukturen (OMP's, Flagellen, LPS) von *Salmonella* sind in der Lage, die Zytokin-Expression von Immunzellen auszulösen (HENDERSON et al. 1996; CIACCI-WOOLWINE et al. 1998). Die ersten immunkompetenten Zellen, die durch das bakterielle Antigen stimuliert werden, sind die dendritischen Zellen und Makrophagen. Beide produzieren Interleukin-12 (IL-12). Dieses Interleukin wirkt auf die natürlichen Killerzellen, welche das „frühe“ Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sekretieren. IFN- $\gamma$  verstärkt die Bildung von IL-12 und induziert die Bildung von TNF- $\alpha$  in den Makrophagen, das jene autokrin aktiviert. IL-12 stellt ein Differenzierungszytokin dar, da es eine dominierende zellvermittelte Immunität auf Basis der Th1-Zellen auslöst (SCHAIBLE et al. 1999). Deshalb kann in Versuchen mit IL-12-Knockoutmäusen eine stark verminderte Fähigkeit zur IFN- $\gamma$ -Bildung aufgezeigt werden. Nach einer Infektion mit intrazellulären Erregern entsteht eine polarisierte, immunpathologische Th2-Antwort, die der Infektion nicht entgegenwirken kann (MAGRAM et al. 1996).

IL-4 ist ebenfalls ein Differenzierungszytokin und fungiert als Gegenspieler des IL-12. Denn mutmaßlich von primitiven T-Zellen (NKT-Zellen) gebildet, bewirkt es eine Differenzierung der Th-Zellen zu Th2-Zellen, was in eine dominierende humorale Immunität mündet (MOSMANN u. COFFMAN 1989; SEDER et al. 1992). Nach neueren Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass eine Th2-Zell-Antwort eher schädlich ist. Die dafür ursächliche frühe IL-4 Produktion geht vermutlich von einer in der Leber befindlichen T-Zellpopulation mit dem Phänotyp CD4 NK1.1 aus. Dieser Vorgang wird allerdings physiologisch durch IL-12 gehemmt (EMOTO et al. 1995).

Versuche an IL-4 defizienten Mäusen zeigen im Vergleich mit normal beschaffenen Mäusen eine deutlich effektivere Kontrolle der Salmonelleninfektion. Es besteht zudem die Annahme, dass IL-4 in der Granulom-Pathogenese eine Rolle spielt (EVEREST et al. 1997).

#### 2.2.2.1 Interleukin-2

IL-2 ist ein aus 133 Aminosäuren bestehendes Monomer. Dieses Zytokin wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, welches von den T-Zellen selbst gebildet wird. IL-2 steuert die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und nimmt somit eine zentrale Rolle bei der Auslösung erworbener Immunreaktionen ein. Es gilt bei Menschen und bei Mäusen als essentiell für die Induktion der zellulären Immunität gegen intrazelluläre Bakterien, Viren und tumorös entartete Zellen (LUCY et al. 1996). Die ruhenden naiven T-Zellen werden mit einem spezifischen Antigen konfrontiert, worauf sie in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus treten und IL-2 sowie den IL-2-Rezeptor synthetisieren. Aufgrund der IL-2-Wirkung durchlaufen die Zellen nun den gesamten Zellzyklus. Sie teilen sich mehrere Tage lang zwei- bis dreimal täglich. Auf diese Weise entsteht eine Vielzahl von Tochterzellen mit einem identischen Antigenrezeptor (JANEWAY u. TRAVERS 2002). Untersuchungen ergaben, dass 4 bis 12 Stunden nach einer Stimulation durch Antigene oder Mitogene die T-Helfer-Zellen mit der Expression von IL-2 und dessen Rezeptor beginnen. Wenn IL-2 bindet, resultiert dies nicht nur in einer Proliferation von aktivierten T-Zellen, sondern es erhöht auch die Sekretion von Th1-Zytokinen (STASNY et al. 2001). Im Rahmen einer Salmonellose entwickeln sich aus den T-Effektorzellen überwiegend Th1-Zellen. Diese produzieren neben IFN- $\gamma$  ebenfalls IL-2. Beide Zytokine dienen der Makrophagenaktivierung (KAUFMANN 1997). In einer *in vitro*-Studie konnte der hemmende Effekt von IL-4 und IL-10 auf die Ausreifung von Th1-Zellen und die damit gekoppelte, stark reduzierte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion gezeigt werden (SEDER et al. 1992).

Die beim Schwein als Besonderheit vorkommenden Antigen-spezifischen-Memory-T-Helfer-Zellen (CD4/CD8) reagieren nach Konfrontation mit einem Antigen auch mit Proliferation und IL-2 Sekretion (ZUCKERMANN u. HUSMANN 1996).

Um die Bedeutsamkeit der IL-2-Produktion für die humorale und zelluläre Immunität und die damit verbundene Fähigkeit zur Induktion der primären und sekundären

Immunantwort zu verdeutlichen, ist nicht zu vernachlässigen, dass neben den T-Lymphozyten genauso B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen IL-2-Rezeptoren besitzen (ZELUS et al. 2000).

#### 2.2.2.2 Interleukin-4

Dieses aus 129 AS bestehende Zytokin gilt als der wichtigste Effektor der Th2-Zellen. Die Ausschüttung erfolgt stets direkt an der Kontaktstelle zur Zielzelle (ARAI et al. 1990). Die Produzenten sind T-Zellen und Mastzellen. IL-4 entfaltet seine Wirkung vielschichtig, da es sowohl in der humoralen als auch in der zellulären Abwehr eine Rolle spielt (NUNTAPRASERT et al. 2005).

Wie bereits beschrieben, ist es ein Differenzierungszytokin der CD4-T-Zellen. Zusammen mit IL-6 fördert es die Bildung von Th2-Zellen und in Kooperation mit IL-10 wird die Th1-Zellproliferation gehemmt. Bei der Differenzierung ist nicht nur die Lebensweise des Krankheitserregers prägend, sondern auch die jeweilige Präsentation des Antigens. Folglich führt eine feste Bindung zwischen Antigen und Rezeptor sowie eine hohe Sequenz des Antigens zu einer Th1-Antwort. Dagegen überwiegen Th2-Zellen bei schwacher Bindung und geringer Sequenz. Hier stammt demzufolge das IL-4 aus einer spezialisierten Untergruppe der CD4-Zellen, den NK 1.1-Zellen (EMOTO et al. 1995; JANEWAY u. TRAVERS 2002).

Der humorale Einfluss von IL-4 kommt zur Geltung, indem Th2-Zellen IL-4 ausschütten und dieses die klonale Vermehrung und die Antikörperproduktion der B-Zellen hervorruft. Das geschieht aber erst, wenn das Effektormolekül der T-Zelle, der CD40-Ligand, an das CD40-Oberflächenmolekül der B-Zelle angedockt hat und die B-Zelle somit in den aktiven Zustand übergeht. In mehreren Proliferationszyklen reifen die B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen heran, wobei sie im späten Stadium von IL-5 und IL-6 aktiviert werden (JANEWAY u. TRAVERS 2002). An dieser Stelle kann IL-4 dergestalt eingreifen, dass es einen Isotypenwechsel zu Immunglobulin E verursacht. In diesem Fall stammt es jedoch von spezialisierten Granulozyten, den Mastzellen (KAUFMANN 1997).

### 2.2.3 Interferone

Die Interferone sind ein wichtiger Abwehrmechanismus bei viralen Infektionen und ein erster Schritt des Immunsystems gegen eindringende Bakterien. Sie sind Zytokine mit einer Vielzahl von biologischen Eigenschaften. Ihre frühere Einteilung, basierend auf dem Bildungsort (Leukozyten-IFN, Fibroblasten-IFN, Immun-IFN), ist heute ersetzt durch die Einordnung in zwei Gruppen. Zur ersten Gruppe IFN-I gehören IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$ . IFN- $\gamma$  zählt zur Gruppe IFN-II (PESTKA et al. 1987).

#### 2.2.3.1 Interferon $\gamma$

IFN- $\gamma$  unterscheidet sich von den anderen Interferonen durch seine vorwiegend immunmodulatorische Wirkung. Seine aktive Form ist ein Homodimer aus zwei ineinander verdrehten Molekülen. Es wird nur von einem Gen kodiert, welches 4 kb umfasst (HIMMLER et al. 1986).

Wie zuvor schon erläutert, ist es das Hauptzytokin der Th1-Zellen-Antwort. Produktionsorte sind die NK-Zellen und die T-Lymphozyten (RODRIGUEZ-CARRENO et al. 2002). IFN- $\gamma$  hemmt die Proliferation der Th2-Zellen, da es eine hohe Rezeptordichte für IL-12 auf den T-Zellen gewährleistet (FARRAR u. SCHREIBER 1993). Weiterhin bindet es an Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche und induziert auf diesem Wege die Synthese von Sauerstoffradikalen, antimikrobiellen Enzymen und Stickstoffmonoxid. Der Makrophage ist somit in die Lage versetzt, extra- und intrazelluläre Erreger zu eliminieren. Ein weiterer Effekt der Makrophagenaktivierung ist die gesteigerte Antigenpräsentation, da eine höhere Anzahl von MHC-Klasse-II-Molekülen exprimiert wird (KAGAYA et al. 1989).

Da die Produktionszellen von IFN- $\gamma$  während der Infektion keinen direkten Kontakt zu *Salmonella* haben, ist die Bildung des Zytokins im Wesentlichen von der Kommunikation mit anderen Zellen abhängig. Dies geschieht, wie bereits erwähnt, mittels der Differenzierungszytokine IL-12 und IL-18, welche im Makrophagen gebildet werden (ECKMANN u. KAGNOFF 2001). In einem Infektionsversuch mit zwei *S. Typhimurium*-Stämmen an Gnotobioten-Schweinen konnte ein rapider IFN- $\gamma$  Anstieg im Plasma nach 24 Stunden *post infectionem* gezeigt werden, welcher bei TNF- $\alpha$  ausblieb.

Die ebenso untersuchte Ileum-Lavage offenbarte einen Anstieg von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  lediglich bei einem vollvirulenten *S. Typhimurium*-Stamm (SPLICHAL et al. 2002). Ist nach einer Infektion nur ein niedriger Wert an IFN- $\gamma$  zu verzeichnen, spricht dies für ein Fehlen von Zellschädigungen (TREBICHAVSKY et al. 2001).

#### 2.2.4 Nachweis von Zytokinen

Es bestehen mehrere Möglichkeiten Zytokine nachzuweisen. Die erste Variante basiert auf dem molekulargenetischen Nachweis der mRNA. Der zweite Ansatz ist der Proteinnachweis an sich, wobei mittels immunologischer Reaktionen (Antigen-Antikörper-Reaktion) ein qualitativer und quantitativer Nachweis geführt werden kann. Als dritte Option besteht die Nutzung des biologischen Effekts, um ein Zytokin zu detektieren.

Zur Erfassung des biologischen Effekts setzt man die Proliferations-Messung ein. Ein Ansatz ist zum Beispiel der Thymidintest. Das Prinzip beruht auf dem Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA von sich teilenden Zellen. Durch Messung der Radioaktivität kann man das Maß der Zellproliferation erfassen. Das Verfahren wird häufig zur Messung der Aktivität von IL-1, IL-2 und IL-6 verwandt (CARON et al. 1965; OSAWA 1990).

Beim Nachweis auf Proteinebene findet der Sandwich-ELISA Anwendung, der eine quantitative Bestimmung ermöglicht. Es können bereits Konzentrationen im pg-Bereich ermittelt werden. Aus dieser Methode entwickelte sich der ELISPOT-assay (enzyme-linked immunospot), der generell der Bestimmung der Häufigkeit von T-Zell-Reaktionen dient (CZERKINSKY et al. 1988). Dabei sind auf einer Kunststoffoberfläche zytokinspezifische Antikörper (capture antibody) fixiert, die das Zytokin binden, welches dann mit einem zweiten zytokinspezifischen Antikörper (detecting antibody) markiert und durch eine Farbreaktion visualisiert wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass nur einzelne Zytokine und keine Gemische bestimmt werden können (TANGUAY u. KILLION 1994; FAVRE et al. 1997).

Der Nachteil der Zytokin-Einzelbestimmung hat aber keine Relevanz für eine Bestimmung an Einzelzellen, was die Durchflusszytometrie ermöglicht. Ein Durchflusszytometer sortiert und zählt Lymphozyten, die in einem Strom durch einen Laserstrahl wandern.

Ein Gerät, das gleichzeitig noch in der Lage ist, die Zellen aufzutrennen, ist ein „fluoreszenzaktivierter Zellsorter“ (FACS). Wird dieses Verfahren mit Techniken wie der intrazellulären Zytokinfärbung oder dem Zytokin-Einfangen (cytokine capture) kombiniert, ermöglicht dies eine exakte Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen mit ihrem typischen Zytokinmuster. Bei der intrazellulären Zytokinfärbung kommen Stoffwechselgifte zum Einsatz, die den Proteintransport hemmen, wodurch die Zytokine im endoplasmatischen Retikulum und in Vesikeln der Zelle verbleiben. Nach der Zellfixierung und der Behandlung mit Detergentien werden die Zytokine mittels markierter spezifischer Antikörper detektiert und im FACS analysiert. Für das Zytokin-Einfangen ist ein Abtöten der Zellen nicht erforderlich. Ein Hybrid-Antikörper, der eine Antigenbindungsstelle für einen Oberflächenmarker der T-Zellen und eine zytokinspezifische Bindungsstelle aufweist, kommt zum Einsatz. Der Hybrid-Antikörper heftet sich zuerst an die zu untersuchenden T-Zellen. Sobald die Zytokinsekretion erfolgt, fängt er das zu analysierende Zytokin ab. Durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers, der ebenfalls spezifisch für das Zytokin ist, kann nun die FACS-Analyse erfolgen (LIU et al. 2000; JANEWAY u. TRAVERS 2002).

Beim Nachweis auf mRNA-Ebene stehen mehrere Techniken zur Verfügung, zum Beispiel der Northern blot, der RNA protection assay, die *in situ*-Hybridisierung und die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion. Die Wahl der verschiedenen Methoden ist abhängig von der jeweiligen Fragestellung. Infolgedessen verwendet man bei qualitativen Untersuchungen vorzugsweise die *in situ*-Hybridisierung, wobei der Nachweis der mRNA in der Zelle mit Hilfe von Oligonukleotidsonden erfolgt, die radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (SWIDSINSKI et al. 2005). Für einen quantitativen Nachweis eignet sich der RNA protection assay. Hierbei wird die RNA mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde hybridisiert und nicht-hybridisierte RNA durch einen RNase-Verdau eliminiert, so dass durch eine Mengenbestimmung an den verbleibenden Sonden die ursprüngliche mRNA-Menge ermittelt werden kann (PLITNICK et al. 2002; LIM et al. 2003).

Bei der Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion wird nicht die RNA, sondern die complementary-DNA (c-DNA) nachgewiesen. Das Umschreiben der RNA erfolgt durch die Reverse Transkriptase.

Zwei Formen dieses Enzyms stehen zur Verfügung: die reverse Transkriptase des aviären Myeloblastosevirus und des Moloney-Mausleukämievirus, die sich im Optimum der Arbeitstemperatur und der Umschreib-Effizienz unterscheiden (BYRNE et al. 1988;

FROHMAN et al. 1988). Die reverse Transkriptase benötigt wie auch die DNA-Polymerase einen Primer in Form eines kurzen, an die RNA angelagerten Oligonukleotids.

Die 6 bis 20 Nukleotide langen Primer können spezifisch (Oligo-dT-Primer) oder unspezifisch (random hexamers) sein. Handelt es sich um lange mRNAs (bis zu 10 kb), sind vorzugsweise Hexamerprimer einzusetzen, da sie zufällig an mehreren Stellen hybridisieren und somit gewährleistet ist, dass alle Sequenzen der RNA umgeschrieben werden (FREEMAN et al. 1999; GIULIETTI et al. 2001). Die schließlich vorliegende cDNA kann dann in der Echtzeit-PCR, auf die in Kapitel (Real-time PCR) 2.3.2 näher eingegangen wird, quantifiziert werden.

## 2.3 PCR

### 2.3.1 Amplifikationskinetik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1986 entwickelt (MULLIS et al. ). Bei dieser DNA-Vervielfältigungsreaktion findet theoretisch in jedem Zyklus eine Verdoppelung der gesuchten Sequenzen statt. Die PCR stellt somit ein exponentielles Geschehen dar, das mit der Formel  $N=N_02^n$  beschrieben werden kann. Dabei ist N die Anzahl der vervielfältigten Abschnitte,  $N_0$  die Ausgangszahl an Molekülen und n die Anzahl der Zyklen. In der Praxis können keine idealen Bedingungen geschaffen werden, so dass eine Einbeziehung der Amplifikationseffizienz (E) von Nöten ist. E ist der Anteil von Molekülen, der in einem Zyklus tatsächlich amplifiziert wird. Dabei nimmt E Werte zwischen 0 und 1 ein, wobei 0 bedeutet, dass kein Molekül verdoppelt wurde, und 1, dass alle Moleküle vervielfältigt wurden. So ergibt sich die Formel  $N= N_0(1+E)^n$ . Die PCR-Reaktion geht von der exponentiellen Phase in eine Plateauphase über. Die Ursachen dafür sind die steigende Molekülzahl, das Absinken der Polymeraseaktivität und der Verbrauch von Reaktionskomponenten. Demnach ergibt sich auch ein Abfall der Amplifikationseffizienz (WATERFALL et al. 2002; PFAFFL 2004). Die PCR-Effizienz kann mit verschiedenen Methoden ermittelt werden. Die gängigste Methode ist die aus verschiedenen Verdünnungsstufen erstellte Standardkurve, in welcher die eingesetzte Menge an DNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zykluszahl dargestellt wird. Die Formel ist  $E=10^{(-1/Steigung)}$  (RASMUSSEN R. 2001).

### 2.3.2 Real-time PCR

Die Real-time quantitative PCR (RT-q PCR) oder auch quantitative Echtzeit-PCR bedeutet eine Weiterentwicklung der von MULLIS (1987) entwickelten Polymerase-Kettenreaktion. Sie ist inzwischen zu einer unentbehrlichen Technologie sowohl für Sequenzanalysen, Genklonierungs- und Genexpressionsstudien als auch in der Diagnostik (Viruserkrankungen, Mutationsanalysen) geworden (ZAMORANO et al. 1996; HESSNER et al. 1999).



Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte lediglich qualitativ nachgewiesen werden können, kann man mittels der RT-q PCR Aussagen über die Ausgangs-DNA-Menge treffen. 1990 konnten erste Erfolge der Quantifizierung durch die quantitative kompetitive PCR verzeichnet werden. Es werden dabei gleichzeitig zwei Templates eingesetzt, wobei es sich bei einem Template um das Untersuchungsmaterial und beim anderen um einen internen Standard bekannter Kopienzahl und fast identischer Nukleotidsequenz handelt. Mittels Densitometer bzw. Szintillationszählung werden die Nukleotidmengen verglichen und so kann die DNA-Menge der unbekannt Probe bestimmt werden (GILLILAND et al. 1990).

1992 wurden grundlegende Neuerungen geschaffen. Die PCR-Maschine wurde mit einer UV-Lampe und CCD-Kamera versehen. Ethidiumbromid (EtBr) wurde dem PCR-Reaktionsansatz zugefügt, da es fluoresziert, wenn es in doppelsträngige DNA eingebaut und durch das UV-Licht angeregt wird (HIGUCHI et al. 1992). Anhand der Fluoreszenzmessung kann daher die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden (HIGUCHI et al. 1993). Dadurch ist eine revolutionäre Methode mit einer hohen Sensitivität, einer reduzierten Kontaminationsgefahr und einem gesenkten Arbeitsaufwand bei gleichzeitig höherer Durchflussrate entwickelt worden (ORLANDO et al. 1998; MARTELL et al. 1999).

Die PCR-Produktbildung wird durch Fluoreszenzsignale während oder nach jedem einzelnen Zyklus gemessen. Diese Signale sind entweder sequenzunspezifisch mit Interkalatoren oder sequenzspezifisch durch Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Verwendete interkalierende Farbstoffe sind EtBr und SYBR®-Green. Gegenwärtig kommt nur noch SYBR®-Green aufgrund seines besseren Signal-Hintergrund-Verhältnisses zum Einsatz. Er lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein, wodurch mit Zunahme der PCR-Produkte ein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen ist. Die Messung erfolgt in jedem Zyklus nach dem Elongationsschritt. Ein weiterer Vorteil dieses Farbstoffes ist seine universelle Verwendbarkeit. Eine spezifische Bindung an die Ziel-DNA ist jedoch nicht möglich (MORRISON et al. 1998). Daher ist eine anschließende Schmelzkurvenanalyse zur Unterscheidung von Ziel-DNA und Artefakten oder Primerdimeren unerlässlich. Diese Analyse basiert auf der Tatsache, dass jedes Amplikon einen spezifischen Schmelzpunkt aufweist, der von der Länge, dem Guanin- und Cytosin-Anteil und Basenfehlpaarungen abhängt.

So steigert man schrittweise die Temperatur von der Annealing-Temperatur bis 95°C und führt eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung durch. Beim Aufschmelzen der Doppelstränge beobachtet man ein abnehmendes Signal. Da Primerdimere und Artefakte geringere Schmelztemperaturen als das spezifische Produkt haben, ist eine Unterscheidung möglich (RIRIE et al. 1997).

Kommen Hybridisierungs sonden zum Einsatz, ist neben der hohen Sensitivität auch eine hohe Spezifität der Reaktion gewährleistet. Man differenziert zwischen TaqMan™-Sonden bzw. TaqMan™-Proben und FRET-Sonden. TaqMan™-Sonden enthalten zwei Fluoreszenzmarkierungen, den Reporter am 5'-Ende und den Quencher am 3'-Ende. Die Sonde hybridisiert während des kombinierten Primer-Annealing- und Elongationsschritts. Die Taq-Polymerase synthetisiert den Neustrang und hydrolysiert dadurch die Sonde vom 5'-Ende her, so dass es zur Freisetzung des Reporters kommt (siehe Abbildung 5). Der Quencher verliert seine unterdrückende Wirkung auf den Reporter und dieser entfaltet seine Fluoreszenz. Nach jedem Zyklus erfolgt eine Messung. Die Zunahme der Reporter-Fluoreszenz ist proportional zur Menge der DNA (GIBSON et al. 1996a). Eine Weiterentwicklung dieser Sonden stellen Molecular Beacons dar. Durch ihre Haarnadelstruktur wurde der Abstand zwischen Quencher und Reporter verringert. So wirkt man dem Problem entgegen, dass Proben teilweise ungünstige Strukturen bilden und der Abstand zwischen Reporter und Quencher zu groß wird, so dass die Fluoreszenzemission nicht mehr vollständig unterdrückt wird. Molecular Beacons zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus (BONNET et al. 1999). FRET (fluorescence resonance energy transfer)-Sonden sind zwei Oligonukleotide, wobei das eine am 3'-Ende mit einem Akzeptor, das andere am 5'-Ende mit einem Donor versehen ist. Beide Oligonukleotide binden an einen DNA-Strang mit einem Abstand von ein bis fünf Nukleotiden zwischen Akzeptor und Donor. Durch einen Laser wird der Donor angeregt und sendet eine bestimmte Wellenlänge aus, die wiederum den Akzeptor anregt. Dessen Emission wird gemessen, aber nur solange beide Oligonukleotide am Template binden (BERNARD u. WITTEWERT 2000).

Die Quantifizierung der Startmenge der Ziel-DNA erfolgt über die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold Cycle oder C<sub>T</sub>-Wert. Dieser Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die nötig sind, damit ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird und die PCR-Produktbildung exponentiell verläuft. Die Bestimmung muss in der exponentiellen Phase erfolgen, da hier keine limitierenden Faktoren wie Primer- oder Nukleotidmangel und nachlassende Enzymaktivität

vorliegen. Bei Erreichen des  $C_T$ -Wertes befindet sich genau die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA in jedem Reaktionsgefäß. Die Quantifizierung wird demnach nicht an der absoluten Menge an PCR-Produkt, sondern auf Basis der Kinetik der PCR-Reaktion durchgeführt (GIBSON et al. 1996; GIULIETTI et al. 2001).

Für die Auswertung existieren zwei grundsätzliche Strategien, die absolute und die relative Quantifizierung (PFAFFL 2001). Die absolute Quantifizierung wird durch eine Kalibrierungskurve basierend auf Verdünnungsreihen, die man aus Proben bekannter Konzentration erstellt, realisiert. Eine Eigenschaft der Proben sollte Ähnlichkeit zum Zielgen sein. Auch die Amplifikation mit den gleichen Primern ist erforderlich. Die  $C_T$ -Werte der Proben mit unbekannter Kopienzahl werden mit denen der Verdünnungsreihe interpoliert und so wird die absolute Zahl der Kopien ermittelt (FERRE 1992; FREEMAN et al. 1999). Der Nachteil dieser Methode ist die fehlende interne Überwachung, denn schon geringe Unterschiede in der Amplifikationseffizienz von Standard und Probe führen zu einer unkorrekten Quantifizierung. Um solche Effizienzunterschiede zu erfassen, kann die Quantifizierung mit einem internen Standard vollzogen werden, der so genannten Normalisierung der Expressionsergebnisse. Dabei handelt es sich um die relative Quantifizierung. Hierfür wird die Expression eines zu untersuchenden Gens im Verhältnis zu einem internen, stabil exprimierten Referenzgen, dem Housekeeping-Gen, ermittelt. In einer Multiplex-PCR werden die Proben auf mindestens zwei Sequenzen untersucht und auf diese Weise wird das Verhältnis der Relationen der Kopien des zu untersuchenden Gens zum Referenzgen bestimmt. Die Formel lautet:  $\text{Verhältnis} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  (THELLIN et al. 1999). Wie bereits diskutiert, kann man bei der PCR-Reaktion nicht von idealen Bedingungen ausgehen. Schwankungen der Effizienz sind deshalb zu berücksichtigen. Aus diesem Grund kommt das „effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell“ zum Einsatz. Die Berechnung erfolgt mit der Formel:  $\text{Verhältnis} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{\text{TZielgen}}(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}$  (PFAFFL 2004). Bei Genexpressionsstudien ist es erforderlich, ein internes Referenzgen einzusetzen, da die reverse Transkriptase einer schwankenden Effektivität unterliegt und unterschiedliche Ausgangsmengen an RNA vorliegen (VANDESOMPELE et al. 2002). Die Housekeeping-Gene sind aufgrund ihrer relativ stabilen Expressionsrate als interner Standard qualifiziert. Des Weiteren werden sie in verschiedenen Zellen unabhängig von äußeren Einflüssen auf gleichem Niveau exprimiert. Die am häufigsten verwendeten Normaliser sind die ribosomalen RNAs, Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und  $\beta$ -Aktin (BUSTIN 2000). In

dieser Arbeit wird GAPDH als internes Referenzgen genutzt. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse. Es ist allerdings auch an weiteren Reaktionen in der Zelle beteiligt, zum Beispiel DNA-Reparaturen, Transport von t-RNA und als Phosphotransferase (SIROVER 1999).

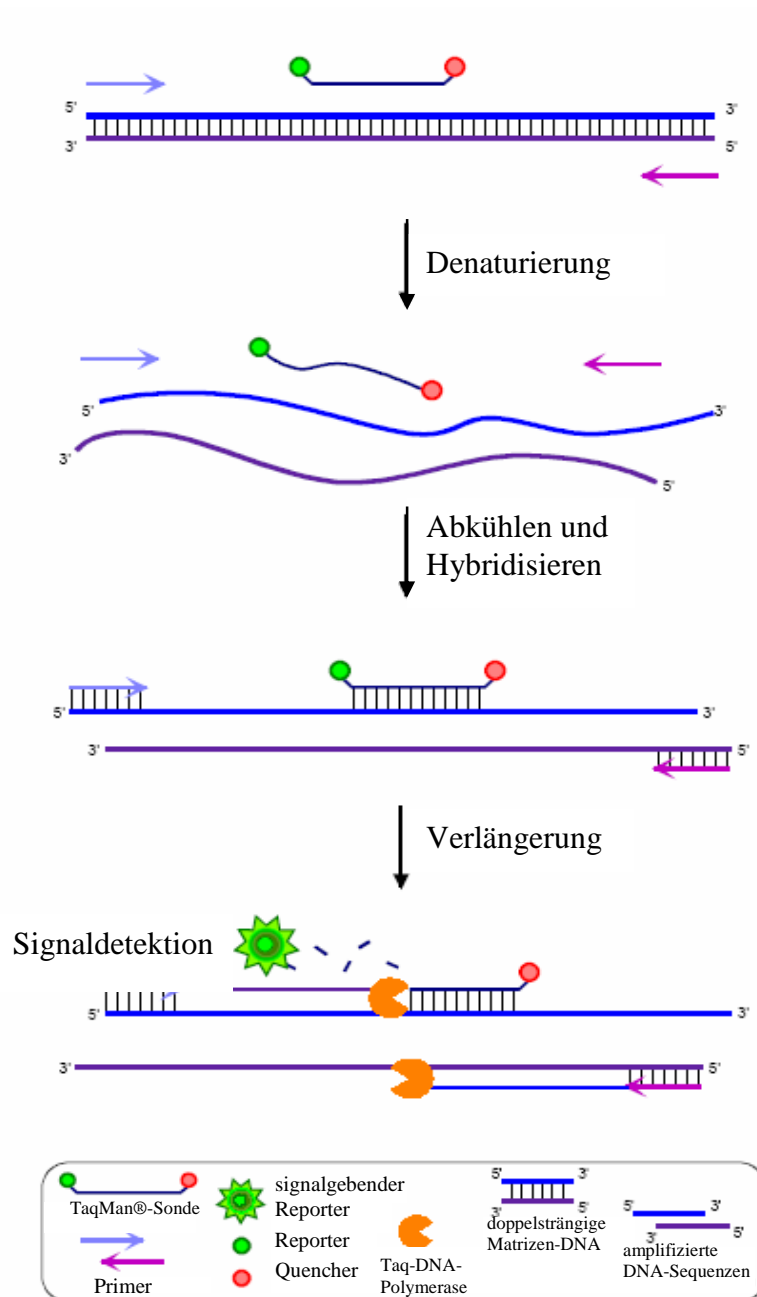


Abbildung 5. Funktionsprinzip der TaqMan™-Sonden.

### 3 Tiere, Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung einzelner Virulenzfaktoren von *S. Typhimurium* DT104 bei der Salmonelleninfektion des Schweins und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Immunsystem zu charakterisieren. Dabei kamen zwei Mutanten zum Einsatz, die Deletionen in der SPI 1 und SPI 2 aufwiesen. Durch vergleichende Untersuchungen sollen Rückschlüsse auf die einzelnen Virulenzfaktoren und ihre Wirkung auf den Wirtsorganismus gezogen werden. Bisherige Erkenntnisse hierzu wurden im Maus- und im Hühner-Modell erlangt. Eine Übertragung der Daten auf das Schwein ist jedoch nur begrenzt möglich. Daher sind diese Untersuchungen an der eigentlichen Zielspezies, dem Schwein, bedeutungsvoll, um dem Erreger in punkto Prophylaxe- und Behandlungsmaßnahmen entsprechend entgegenzutreten zu können.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche wurde ein bereits etabliertes Infektionsmodell mit *S. Typhimurium* DT104 beim Schwein angewandt (MARG et al. 2001). Im Anschluss daran erfolgten parallel zwei weitere Infektionsversuche mit den oben genannten zwei Deletionsmutanten, wobei die genauen Charakteristika der Infektionsstämme dem Kapitel 3.2.1. zu entnehmen sind.

Die Untersuchungen jeder Infektionsgruppe gliederten sich in drei Abschnitte. Zu Beginn umfasste dies die wichtigsten klinische Parameter, die Salmonellen-Ausscheidungsrate in Faeces und den Verlauf der spezifischen Antikörperbildung (IgA, IgG, IgM) in Blutseren. Zudem sollte die Fähigkeit der einzelnen *Salmonella*-Stämme zur Invasivität und deren intrazelluläre Überlebens- und Replikationsrate anhand der Organbesiedlung näher beleuchtet werden. Durch die quantitative Bestimmung der Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  sollte zudem die adaptive Immunität untersucht werden. Für diese Quantifizierung kam die Technik der quantitativen Real-time PCR zur Anwendung, die im Rahmen dieser Arbeit für den Nachweis der betreffenden Zytokine beim Schwein etabliert wurde. Es sollte hierbei beurteilt werden, welcher Weg der Abwehrmechanismen, der zelluläre oder humorale, dominiert bzw. wie sich ihr Wechselspiel gestaltet.

Durch die Zusammenfassung der gesamten Daten kann auf die Art der Attenuierung und somit die Virulenzfaktoren und die Wirkung des Erregers auf den Wirtsorganismus geschlossen werden.

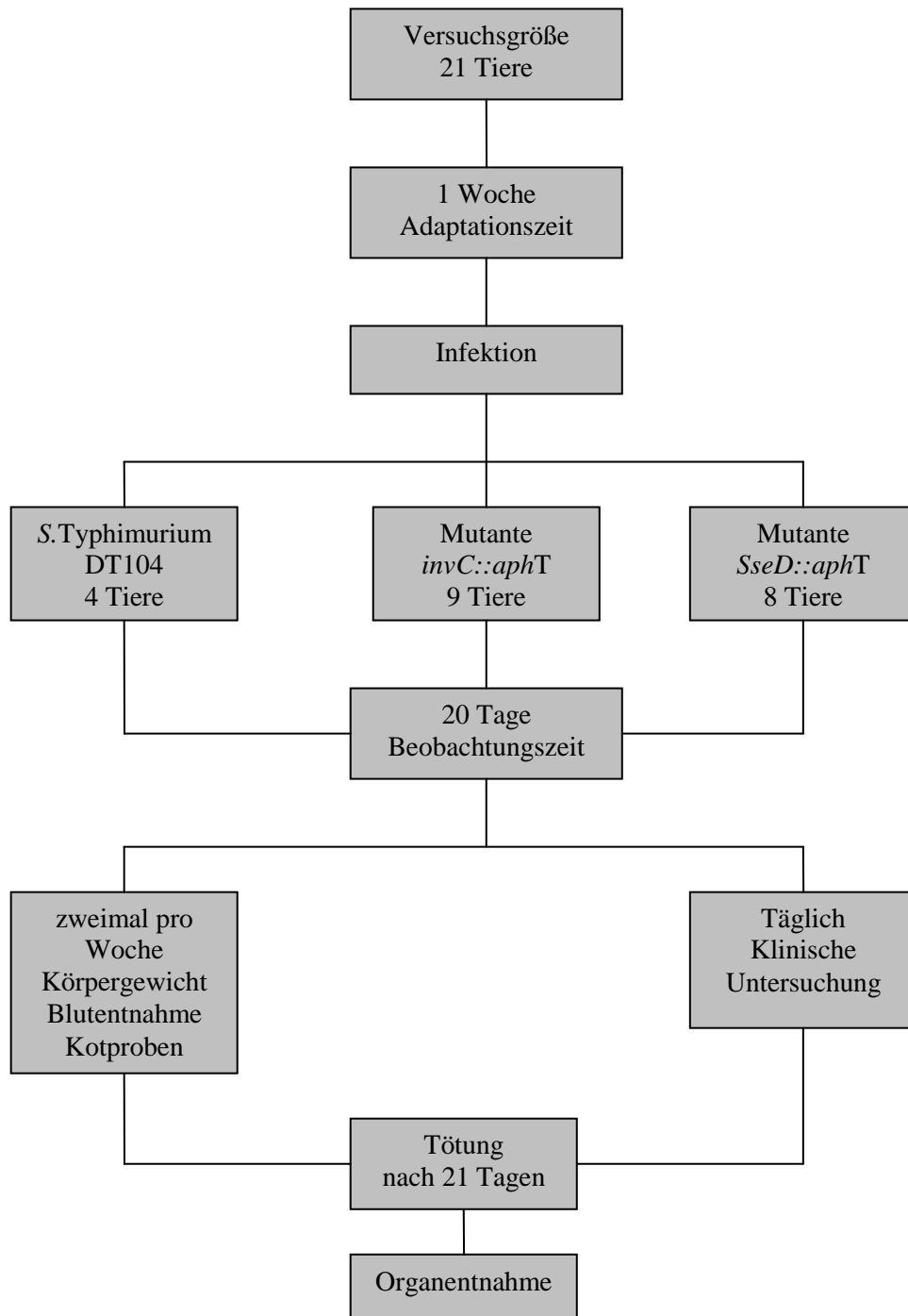


Abbildung 6. Allgemeiner Aufbau der Infektionsversuche am Schwein mit *S. Typhimurium* DT104.

## 3.2 Tiere und Material

### 3.2.1 Bakterienstämme

Die für die Infektionsversuche im Schwein verwendeten *Salmonella*-Stämme sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 1. Übersicht über die in den Infektionsversuchen eingesetzten Infektionsstämme.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Spezies/Charakteristika</b>
Feldisolat <b>S. Typhimurium</b> (Wildtyp)	Stammsammlung des Instituts für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig	<i>S. Typhimurium</i> DT104  (Isolat vom Schwein)
<b>SPI-1 Mutante</b> (M810)	Institut für Mikrobiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich  Prof. Wolf-Dietrich Hardt	Mutante ist durch P22- Transduktion der <i>invC::aphT</i> (Km-Resistenz) Kassette von SB566 in den obigen Wildtyp <i>S.Tm</i> DT104 Stamm konstruiert worden
<b>SPI-2 Mutante</b> (M809)	Institut für Mikrobiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich  Prof. Wolf-Dietrich Hardt	Mutante ist durch P22- Transduktion von <i>sseD::aphT</i> aus dem Stamm MvP101 in den obigen Wildtyp <i>S.Tm</i> DT104 Stamm erzeugt worden

### 3.2.2 Probenmaterial aus experimentell infizierten Schweinen

Für die vergleichende Untersuchung zur Invasivität und Infektionskinetik wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Organ- und Gewebeprobe nach Tötung der Tiere steril entnommen.

**Tabelle 2. Untersuchte Organ- und Gewebeprobe.**

<b>Gewebeprobe</b>	<b>Abkürzung</b>
Tonsille	To
Mandibularlymphknoten	MaLy
Lunge	Lu
Leber	Le
Milz	Mi
Jejunum (kaudaler Abschnitt)	Je
Ileum(distaler Abschnitt)	Il
Colon	Co
Caecum	Ca
Lungenlymphknoten	LuLy
Ileozökallymphknoten	IcLy
Jejunal-Lymphknoten	JeLy
Colon-Lymphknoten	CoLy
Muskulatur	Mu
Gallenflüssigkeit	Gf

### 3.2.3 Voranreicherungsmedien und Nährböden für die kulturelle Diagnostik

Der kulturelle Nachweis der applizierten *Salmonella*-Stämme erfolgte bei nicht selektiver Voranreicherung mit gepuffertem Pepton-Wasser (Fa. Merck, Darmstadt). Bei der anschließenden Selektivanreicherung wurde Rappaport-Vassiliadis (RV)-Medium (Fa. Merck, Darmstadt) verwandt. Bei den in dieser Arbeit parallel eingesetzten Selektivnährböden handelte es sich um Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agarmedium (Fa. Merck, Darmstadt) und Brilliantgrün-Phenolrot-Sucrose (BPLS)-Agarmedium (Fa. Merck, Darmstadt).



### 3.2.4 Oligonukleotide zum Nachweis von *Salmonella Typhimurium*

Die zur exakten Differenzierung der Infektionsstämme genutzten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide für die Salmonellen-Diagnostik des eingesetzten *S.Tm* Wildtyps und die zwei Deletionsmutanten in Gewebeproben vom persistent infizierten Schwein.**

<b>S.Tm-Stamm</b>	<b>Oligonukleotid</b>	<b>Oligonukleotid-Sequenz</b>
<i>sseD</i> -Mutante	<i>sseD</i> -f	5'-caa ccg agg gcg cca gtc aga-3'
	<i>sseD</i> -r	5'-tat ccc gcg taa aag tcc cag t-3'
<i>invC</i> -Mutante	<i>invC</i> -f	5'-gcc ggc gaa caa tag act gct t-3'
	<i>invC</i> -r	5'-tct cta ctg cct tga atg ggt ttt-3'

### 3.2.5 Oligonukleotide und Sonden zur Zytokin-Quantifizierung

Die im Rahmen der real time PCR zur Quantifizierung der Zytokinantwort eingesetzten Oligonukleotide (Fa. biomers.net, Ulm) und Hybridisierungs-Sonden (Fa. biomers.net, Ulm) sind den Tabellen Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen. Alle Sonden wurden am 5'-Ende mit dem Farbstoff Fluorescein (FAM; Reporter) und am 3'-Ende mit dem Farbstoff Rhodamin (TAMRA; Quencher) markiert.

**Tabelle 4. Oligonukleotidsequenzen zur Zytokin-Quantifizierung beim Schwein.**

<b>Target</b>	<b>Oligonukleotide</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>	<b>Amplikongröße</b>
GAPDH	GAPDH-f	ggg ctg ccc aga aca tca	171 kb
	GAPDH-r	tgt cat cat att ttg cag gtt tct c	
IL-2	IL-2-f	cag ctc ttg tgt tgc att gca	103 kb
	IL-2-r	gca gca atg gct cca gtt gt	
IL-4	IL-4-f	aga aca cga cgg aga agg aaa c	123 kb
	IL-4-r	ttg cca tgc tgc tca ggt t	
IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$ -f	gcg caa agc cat cag tga a	132 kb
	IFN- $\gamma$ -r	tgc agg cag gat gac aat tat t	

**Tabelle 5. TaqMan™-Sonden zur Zytokin-Quantifizierung beim Schwein**

<b>Sonde</b>	<b>Sequenz 5`-3`</b>
GAPDH	ccg gcg ctg cca agg ctg t
IL-2	taa ccc ttg cac tca tgg caa acg g
IL-4	ctt cgg cac aca cac g
IFN- $\gamma$	cag act atg tgc atc a

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Infektionsversuche

Die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche fanden im voll klimatisierten Versuchstierstall des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt (Tierversuchsvorhaben 02/03, Aktenzeichen 24-9168.11, Regierungspräsidium Leipzig).

Vor der Einnistung wurden die Hybridschweine (Landschwein x Edelschwein) serologisch mittels des kommerziellen ELISA SALMOTYPE<sup>®</sup> Pig STM-WCE (Fa. Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig) und bakteriologisch durch Kotuntersuchung gemäß ISO 6579 auf *Salmonella*-Freiheit getestet.

Die Infektion der sieben Wochen alten Läufer-Schweine erfolgte nach einer Woche Adaptationszeit mit einer Magenschlundsonde (Fa. Rüscher, Kernen). Jedes Inokulum wurde mit dem jeweiligen Infektionsstamm (siehe Tabelle 1) auf eine Gesamtkeimzahl von  $10^{11}$  KBE eingestellt und in einem Gesamtvolumen von 50 ml PBS verabreicht. Die Tiere wurden vor Applikation des jeweiligen Erregers mit 0,4 mg/kg Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>) sediert.

Bei jeder Infektionsgruppe wurde nach dem identischen Untersuchungs- und Probenentnahmeschema (s. S. 41) verfahren. Es erfolgte täglich eine klinische Untersuchung unter Erfassung folgender Parameter: Temperatur, Allgemeinbefinden, Atmung, Husten, Nahrungsaufnahme, Erbrechen und Durchfall. Das Körpergewicht wurde zweimal wöchentlich aufgezeichnet. Die Entnahme der Kotproben zur Ermittlung der Salmonellen-Ausscheidungsrate geschah in der ersten Woche nach der Infektion täglich und im Anschluss daran zweimal wöchentlich. Die Blutentnahmen aus der *V. cava* wurden ebenfalls zweimal in der Woche vollzogen. Nach 20 Tagen Beobachtungszeit wurde die Tötung der Tiere durch Bolzenschuss unter Anästhesie vorgenommen und ein definiertes Organspektrum, welches in Tabelle 2 aufgelistet ist, entnommen.

### 3.3.2 Diagnostik von *Salmonella* sp.

#### 3.3.2.1 Kulturelle Diagnostik

Als Grundlage für die bakterielle Untersuchung fungierte die ISO 6579. Das steril entnommene Organmaterial wurde in Spiritus getaucht und äußerlich mit einem Bunsenbrenner abgeflammt. Jeweils 5 g wurden in 45 ml Pepton-Wasser eingewogen und auf höchster Stufe für 2 Minuten im Stomacher 400 (Fa. Seward, London, UK) in einem Stomacherbeutel (Fa. Seward, London, UK) homogenisiert und anschließend bei 37°C für 24 Stunden aerob bebrütet. Aus der Pepton-Boullion-Voranreicherung wurden jeweils 100 µl als Doppelansatz in 9,9 ml Rappaport-Vassiliadis (RV)-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte 24 Stunden lang bei 42°C. Es folgte der Ausstrich von beiden RV-Ansätzen mittels Glasstab auf BPLS- und XLD-Agarmedium und eine Bebrütung bei 37°C für 24 Stunden. Mittels der Objektträgerschnellagglutination wurden anschließend verdächtig erscheinende Kolonien bestätigt (Agglutinationsseren von der Firma Sifin, Berlin) und deren Serotyp identifiziert.

Die kulturelle Untersuchung der Kotproben auf *Salmonella* wurde nach dem gleichen Schema ausgeführt. Lediglich beim Voranreicherungs-Ansatz lag eine Abweichung vor, indem je 1g Kot in 9 ml Pepton-Wasser überführt wurde.

#### 3.3.2.2 Qualitative PCR

Das Verfahren der qualitativen PCR wurde als Bestätigungsuntersuchung der Organproben auf *Salmonella* aus den drei Infektionsversuchen genutzt. Sie diente sowohl dem exakten Nachweis der jeweiligen Deletionsmutante, wie auch dem Nachweis des Wildtypes von *S. Typhimurium* DT104 in den drei Probandengruppen, da eine genaue Differenzierung der Infektionsstämme allein mit der kulturellen Diagnostik nicht hinreichend zuverlässig ist.

Die als PCR-Template dienende DNA wurde aus Salmonellen-Kolonien extrahiert. Nachdem die verdächtig erscheinenden Kolonien mit der Objektträgerschnellagglutination positiv bestätigt waren, erfolgte das Ausstreichen dieser auf Nähragarmedium (Fa. Merck, Darmstadt). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurden dann mit einem Glasstab mehrere Kolonien vorsichtig

aufgenommen und in 500 µl Lysis-Puffer mit Proteinkinase K überführt, gefolgt von gründlichem Vortexen. Danach wurde das Reaktionsgefäß bei 56°C für 1 Stunde inkubiert und im Anschluss zur Inaktivierung der Proteinkinase K im Wasserbad bei 94°C für 10 Minuten erhitzt. Der letzte Schritt der DNA-Extraktion war die Zentrifugation mit 13 000 rpm über eine Dauer von 5 Minuten. Die im Überstand enthaltene DNA wurde dann als Template in der jeweiligen Wildtyp- oder Mutantenspezifischen PCR eingesetzt.

Für die PCR wurde der Thermocycler „Tpersonal“ (Biometra-biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) verwendet. Der PCR-Ansatz umfasste jeweils 50 µl und bestand aus 43 µl Reddymix® (Fa. Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen), je 1 µl der jeweiligen Primer (s. S. 44 Tabelle 3), die in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt wurden, und 5 µl des zuvor aus der Salmonellenreinkultur präparierten Templates. Die PCR wurde mit folgendem Temperaturschema durchgeführt und währte 35 Zyklen.

**Tabelle 6. Temperaturprofil der Qualitativen PCR.**

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
Denaturierung	94°C	40 Sekunden
Annealing	60°C	40 Sekunden
Elongation	72°C	1 Minute und 30 Sekunden
finale Elongation	72°C	5 Minuten

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte fand anschließend in einem 2 %igen (v/v) Agarose-Gel statt. Die Gel-Herstellung erfolgte mit 2 g Agarose (Fa. Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) gelöst in 100 ml TBE-Puffer. Die Verifizierung der Amplifikatgröße erfolgte durch das Mitführen von 4 µl eines Markers (Leiter-Mix, Fa. Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen). In jede Geltasche wurden 10 µl des Amplifikats aufgetragen. Die Auftrennung wurde in einer Elektrophoresekammer (Fa. Biorad, München) bei 140 Volt über 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Agarose-Gel 20 Minuten in Ethidiumbromid (Fa. Amresco, Solon, Ohio, USA) gefärbt und kurz in Aqua-bidestilliert gewaschen. Die Detektion der PCR-

Produkte erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc 2000 (Fa. Biorad, München) durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

### 3.3.2.3 Serologische Diagnostik

Bei dieser Arbeit kam zur serologischen Diagnostik ein indirekter kompetitiver „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) der Firma „Labordiagnostik Leipzig GmbH“ zum Einsatz. Dieser Testkit ist kommerziell unter dem Namen SALMOTYPE® Pig STM-WCE erhältlich und basiert auf der „Referenzstandard-Methode“, wobei eine isotypspezifische Detektion von IgM-, IgG und IgA-Antikörper gegen *Salmonella* erfolgt. Der Test wurde anhand der Gebrauchsinformation des Herstellers durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mittels des löslichen Chromogens TMB. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Intensität des Farbsignals und der Menge an Salmonellen-Antikörpern des entsprechenden Isotyps. Die Messung der Farbreaktion erfolgte schließlich durch ein computergesteuertes Photometer (Typ „Multiscan MCC-340®“, Fa. Flow Lab Inc., McLean, USA) bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 410 nm. Die Berechnungen der Antikörperaktivitäten für die jeweiligen Isotypen wurden mit der speziell hierfür entwickelten Software SalmoSoft™ (Fa. Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig) durchgeführt.

Bei jedem Tier aller drei Infektionsgruppen wurden die Serumproben nach dem folgenden Schema untersucht. Stets wurde eine Probe vor der Infektion genommen, die so genannte Null-Probe. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten am 3., 7., 10., 14., 17. und 21. Tag nach der Infektion. Das Serum wurde durch Zentrifugation bei 4863xg über eine Dauer von 10 Minuten aus dem vorher entnommenen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubierten Blut gewonnen.

### 3.3.3 Quantifizierung der Zytokinantwort

#### 3.3.3.1 Lymphozytenpräparation

Das gewonnene Vollblut wurde auf das gleiche Volumen Bicolll Separating Solution (Fa. Biochrom AG, Berlin) geschichtet und anschließend bei 400xg für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die nun sichtbare Lymphozytenschicht wurde vorsichtig abpipettiert und in 10 ml PBS überführt. Einer 10 Minuten langen Zentrifugation bei 250xg folgten zwei Waschschrirte des Pellet in jeweils 5 ml PBS.

Darauf wurden die Lymphozyten in ein Einfriermedium (Tabelle 7) resuspendiert und zu jeweils 1ml aliquotiert. Die Lagerung fand in flüssigem Stickstoff statt.

**Tabelle 7. Zusammensetzung des Einfriermediums zur Lymphozytenlagerung.**

Einfriermedium	
FKS	10%
DMSO	10%
Zellmedium	80%

#### 3.3.3.2 RNA-Extraktion

Die Gewinnung der RNA erfolgte aus den zuvor gewonnenen peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit dem RNeasy RNA-Purification-Kit<sup>®</sup> (Fa. Qiagen, Hilden). Es wurde nach Angaben des “RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells” verfahren. Die so isolierte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nach Zugabe von 1 µl RNase-Inhibitor bei -80C° gelagert.

### 3.3.3.3 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription wurde mit dem Taq<sup>®</sup> Reverse Transkription Reagents (Fa. Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Der folgende Reaktionsansatz kam laut Herstellerangaben zum Einsatz:

**Tabelle 8. Reaktionsansatz für die Reverse Transkription.**

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Endkonzentration</b>
10x RT-Puffer	4,2	1x
MgCl <sub>2</sub>	8,8	5,5 mM
dNTP-Mix	8	500µM
random Hexamers	2	jedes dNTP 2,5 µM
Rnase-Inhibitor (10U/µl)	1	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1	1,25 U/µl
RNA-Template	15	variabel
<b>Gesamt</b>	<b>40</b>	

Das Temperaturprogramm der RT lautet:

**Tabelle 9. Temperaturprofil der Reversen Transkription.**

	<b>Zeit (min)</b>	<b>Temperatur (C°)</b>
<b>Präinkubation</b>	10	25
<b>Reverse Transkription</b>	30	48
<b>Inaktivierung der reversen Transkriptase</b>	5	95

Die so gewonnene cDNA wurde anschließend bis zu ihrem Einsatz in der quantitativen real-time PCR bei -20°C gelagert.



#### 3.3.3.4 Real-time PCR

Die in dieser Arbeit etablierte quantitative Real-time PCR diente der Quantifizierung der *in vivo* Zytokin-Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion beim Schwein. Als Verfahren wurde dabei die relative Quantifizierung, bei der ein Referenzgen zur Normalisierung eingesetzt wird, gewählt. Hierfür wurde das Housekeeping-Gen (HKG) Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen eingesetzt. Bei der Auswahl der für die Real-time PCR genutzten Methode zur Detektion der spezifischen Amplifikate fiel die Wahl auf den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-markierten TaqMan®-Sonden, die anders als bei der alternativen SYBR®-Green-Detektion nur spezifische Amplifikate detektieren und daher eine wesentlich höhere Spezifität aufweisen. Die eingesetzten Zytokin-spezifischen Sonden wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein (HEX) konjugiert, während für die GAPDH-spezifische Sonde der Farbstoff 5-Carboxy-Fluorescein (FAM) verwendet wurde. Als Quencher am anderen Ende der jeweiligen Sonde fungierte BHQ1.

Alle drei neu etablierten quantitativen Real-time PCRs für IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  wurden als Multiplex-PCR entwickelt und optimiert, das heißt sowohl die Menge an cDNA für das Zielgen (z.B. IL-2) als auch für das Housekeeping-Gen (GAPDH) wurde im selben Ansatz pipettiert, wodurch in diesem Ansatz insgesamt 4 Oligonukleotide und 2 Sonden als sequenzspezifische Reaktionskomponenten enthalten waren. Die verwendeten Oligonukleotid-Paare und die dazugehörigen Zytokin-spezifischen Sonden sind auf den Seiten 44 (Tabelle 4) und 45 (Tabelle 5) aufgeführt.

Jede Probe wurde grundsätzlich als Doppelansatz pipettiert und gemessen. In einem PCR-Lauf wurden alle Zytokine (IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ ) von jeweils einem Tier determiniert. Das entsprechende Pipettierschema ist der Abbildung 7 (s. S. 54) zu entnehmen. Nach der Optimierung wurden die Reaktionsansätze wie in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt pipettiert, wobei die Primer stets in einer 1:5 Verdünnung (s. S. 73, Tabelle 18) und die Sonden in einer 1:10 Verdünnung (s. S. 73, Tabelle 19) eingesetzt wurden. Bei jeder Reaktion wurde eine Negativkontrolle für alle Zytokine mitgeführt, um cDNA-Kontaminationen auszuschließen. Bei dieser „Non-Template-control“ (NTC) handelte es sich um den gleichen Reaktionsansatz, wobei aber statt des Templates 5  $\mu$ l DNA-freies Wasser eingesetzt wurde. Als PCR-Mastermix wurde der Absolute™ QPCR Mix (AB-Mix) (Fa. ABgene House, Epsom, UK) verwendet.

**Tabelle 10. Quantitative Echtzeit-PCR-Mastermix für IL-2.**

Mastermix IL-2	$\mu\text{l}$
AB-Mix	137,5
Primer-GAPDH-f	6,9
Primer-GAPDH-r	6,9
Primer-Target-f	6,9
Primer-Target-r	6,9
Sonde-GAPDH	8,25
Sonde-Target	8,25
Wasser	39
Template	5

**Tabelle 11. Quantitative Echtzeit-PCR-Mastermix für IL-4 und IFN- $\gamma$ .**

Mastermix IL-4 u. IFN- $\gamma$	$\mu\text{l}$
AB-Mix	137,5
Primer-GAPDH-f	6,9
Primer-GAPDH-r	6,9
Primer-Target-f	13,75
Primer-Target-r	13,75
Sonde-GAPDH	8,25
Sonde-Target	8,25
Wasser	25,3
Template	5

Die PCR wurde mit dem in der folgenden Tabelle aufgeführten Temperaturprofil durchgeführt und umfasste 42 Zyklen.

**Tabelle 12. Temperaturprofil der Quantitativen Echtzeit-PCR.**

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	15 Minuten
Denaturierung	95°C	30 Sekunden
Annealing	58°C	1 Minute

Die Detektion der bei erfolgreicher Amplifikation freigesetzten Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Real-time Thermocycler MX 3000P® (Fa. Stratagene, West Cedar Creek, USA). Mit der dazugehörigen Software wurde der Quotient aus den Fluoreszenzemissionen des Reporters (FAM oder HEX) und des passivem Referenzfarbstoffes (ROX) ermittelt. Dieser Quotient ist das normalisierte Reportersignal und wird als Rn-Wert bezeichnet. Durch Subtraktion des Rn-Wertes (Hintergrundfluoreszenz) der ersten PCR-Zyklen vom Rn+-Wert (relatives Reportersignal) wurde der  $\Delta Rn$ -Wert bestimmt. Der logarithmierte  $\Delta Rn$ -Wert wurde auf der Abszisse und die Anzahl der PCR-Zyklen auf der Ordinate in einem Koordinatensystem dargestellt, so dass sich der Amplification Plot ergab. Die von der Software errechnete Baseline als die Zyklenzahl, bei der noch kein Amplifikat messbar war, diente der Festlegung des Thresholds.

Jener Grenzwert legt die Phase fest, bei der die Reaktion noch nicht linear verläuft. Auf die Weise kann der Threshold Cycle ( $C_T$ -Wert) eruiert werden. Dabei handelt es sich um denjenigen Wert, an dem die Amplifikation des Zielgens den Grenzwert (Threshold) überschreitet. Mit den so errechneten  $C_T$ -Werten konnte nun die Quantifizierung vorgenommen werden (siehe auch unter Kapitel 2.3.2 und 4.3.2), indem durch Ermittlung des  $\Delta C_T$ -Quotienten für das Housekeeping-Gen und das Zielgen (Z.B. IL-2) die relative Menge an Zielgen, verglichen mit dem Housekeeping-Gen, ermittelt wurde.

**Abbildung 7. Pipettierschema für die Real-time PCR.**

Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator	Calibrator
IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
Probe 1	Probe 1	Probe 1	Probe 1	Probe 1	Probe 1
IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
Probe 2	Probe 2	Probe 2	Probe 2	Probe 2	Probe 2
IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
Probe 3	Probe 3	Probe 3	Probe 3	Probe 3	Probe 3
IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
Probe 4	Probe 4	Probe 4	Probe 4	Probe 4	Probe 4
IL-2	IL-2	IL-4	IL-4	IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$
NTC		NTC		NTC	
IL-2		IL-4		IFN- $\gamma$	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinik

#### 4.1.1 Befunde der klinischen Untersuchung

Die klinische Untersuchung der Probanden erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums täglich (s. S. 41). Die Parameter Allgemeinbefinden, Atmung, Husten, Nahrungsaufnahme, Erbrechen und Diarrhoe wurden dabei anhand eines Scores beurteilt. Hierbei fand eine Bewertung mit 0 (ohne Befund), 1 (geringgradig verschlechtert), 2 (mäßig verschlechtert) und 3 (hochgradig verschlechtert) statt.

Die Schweine, die mit dem Wildtyp von *S. Typhimurium* DT104 infiziert wurden, wiesen alle die typischen klinischen Symptome einer Salmonellose auf. Im Gegensatz dazu konnte dieses klinische Bild bei den mit den Deletionsmutanten infizierten Schweinen nicht beobachtet werden, da es sich hier lediglich um geringgradige Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten handelte.

In der Wildtyp-Infektionsgruppe trat bereits einen Tag nach Infektion eine geringgradige Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens ein, welche sich in den folgenden Tagen stärker ausprägte (Score 2). Am achten Tag *p. inf.* wurde bei nur noch einem Schwein dieser Gruppe ein geringgradig verschlechtertes Allgemeinbefinden dokumentiert.

Die Tiere, die mit den beiden Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* DT104 infiziert wurden, zeigten keine Reduktion ihres Allgemeinbefindens.

Der klinische Parameter Atmung bewegte sich bei allen drei Infektionsgruppen während des gesamten Versuchszeitraums im physiologischen Bereich. Für die Tiere der Deletionsmutanten-Infektionsgruppen traf dies auch für die Parameter Husten, Nahrungsaufnahme und Erbrechen zu.

Bei detaillierter Betrachtung der Wildtyp-Infektionsgruppe fielen ein Tier am 5. und 16. Tag nach Infektion mit geringgradigem Husten (Score 1) und zwei Tiere am ersten und zweiten Tag nach Infektion mit Erbrechen (Score 2) auf. Ebenso war die

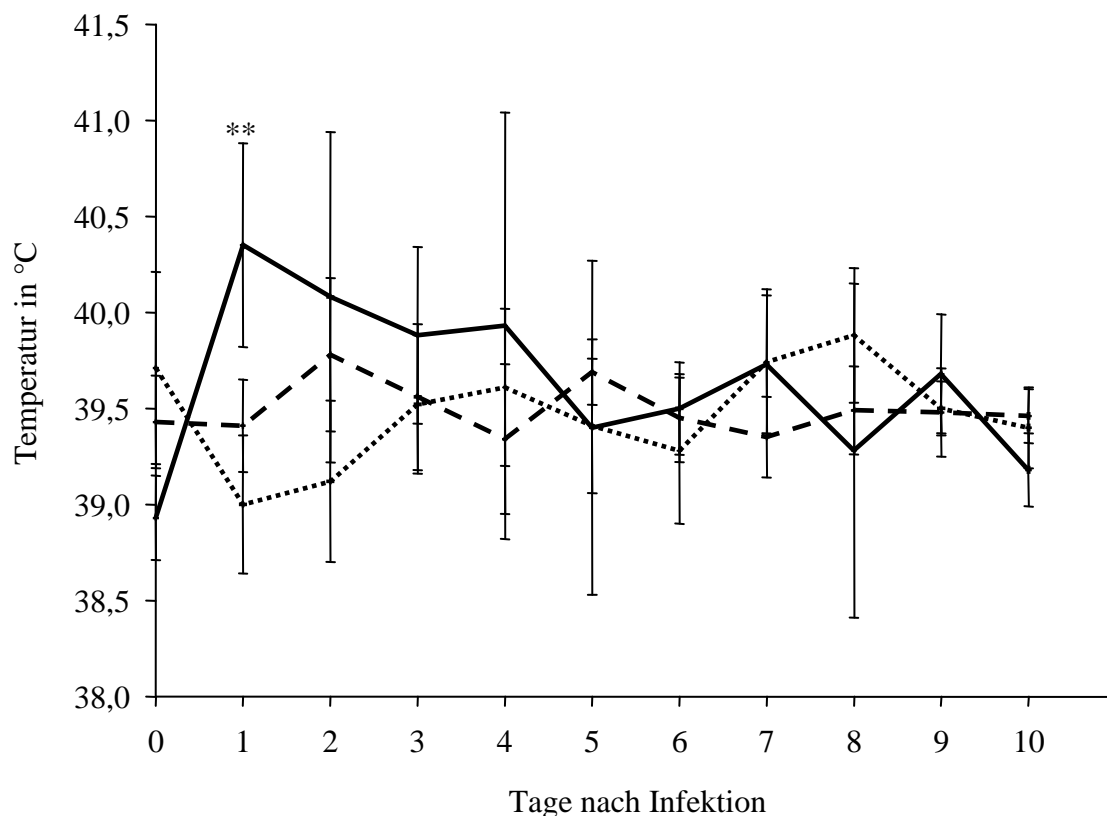
Nahrungsaufnahme am 2. Tag *p. inf.* bei 50 % und zwischen dem 3. und 5. Tag *p. inf.* bei bereits 75 % der Probanden vermindert, woraufhin sich nach einer Woche *p. inf.* wieder ein symptomfreier Zustand einstellte.

Alle Tiere der Wildtyp-Infektionsgruppe zeigten eine Diarrhoe-Symptomatik. Schon einen Tag nach Infektion zeigte ein Tier geringgradige Veränderungen der Kotkonsistenz. Am folgenden Tag war bei der gesamten Gruppe profuser Durchfall (Score 2-3) zu beobachten, was sich bis zum 6. Tag *p. inf.* hinzog. Anschließend entwickelte sich eine intermittierende geringgradige Symptomatik (Score 1). Ab dem 17. Tag *p. inf.* konnte bei allen Tieren eine physiologische Kotkonsistenz dokumentiert werden.

Nur zwei Tiere der *invC::aphT*-Infektionsgruppe wiesen zu verschiedenen Zeitpunkten eine geringgradig verminderte Kotkonsistenz (Score 1) auf, wobei sich dieses intermittierende Geschehen bei einem Tier vom 1. bis 6. Tag nach Infektion sowie beim anderen auf den Zeitraum vom 14. bis 15. Tag nach Infektion beschränkte.

Nur ein Schwein der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe war am 4. Tag nach Infektion geringgradig (Score 1) von einer Diarrhoe-Symptomatik betroffen.

Die Ergebnisse der Messung der inneren Körpertemperatur unterschieden sich gleichermaßen signifikant zwischen der Wildtyp-Infektionsgruppe und den beiden Mutanten-Infektionsgruppen. Die mit *S. Typhimurium* DT104 infizierten Schweine zeigten bereits einen Tag nach Infektion eine Fiebersymptomatik, welche bis zum vierten Tag nach Infektion andauerte. Indes konnten bei den Tieren der Mutanten-Infektionsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum keine erhöhten Körpertemperaturen festgestellt werden. Dies veranschaulicht die Abbildung auf Seite 57.



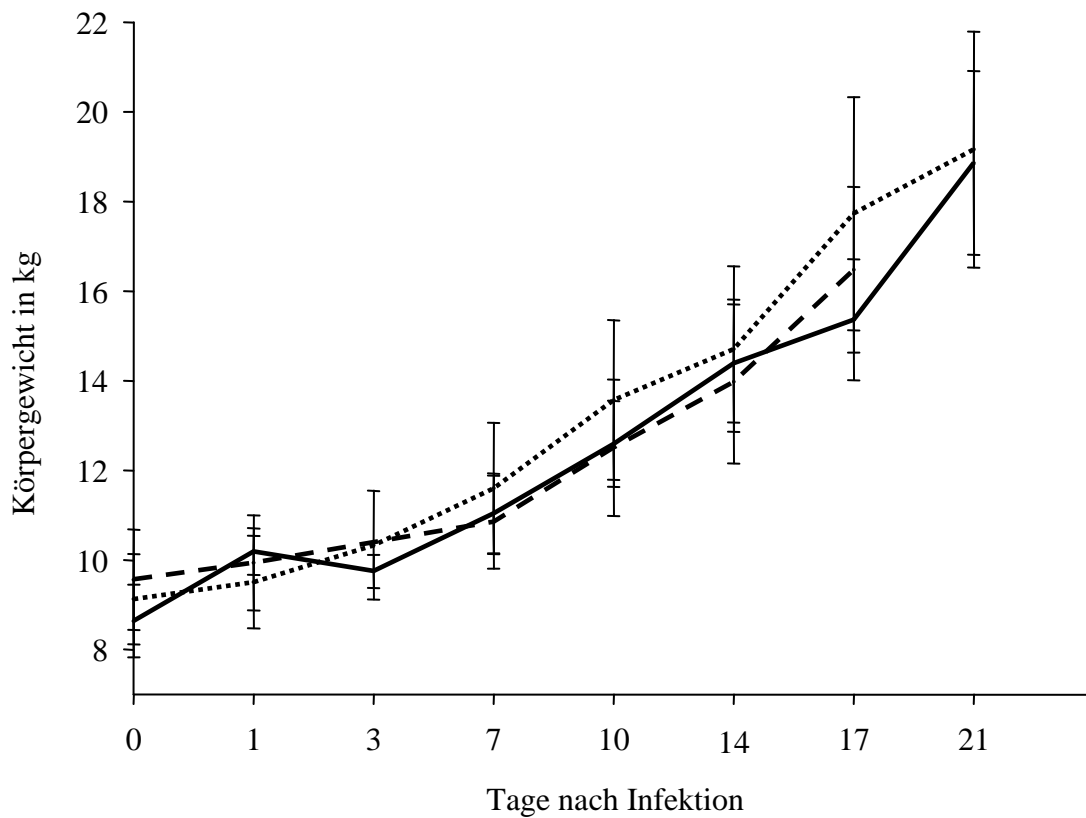
**Abbildung 8. Körpertemperatur der drei Infektionsgruppen im Verlauf der Infektion mit *S. Typhimurium* DT104.** Die Kurven geben den Temperaturmittelwert der einzelnen Probandengruppen am jeweiligen Tag wieder, wobei die durchgehende für die Wildtyp-Infektionsgruppe, die gepunktete für die *invC::aphT*-Infektionsgruppe und die gestrichelte für die *sseD::aphT*-Infektionsgruppe steht. Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichung dar. Der signifikante Unterschied, durch den Mann-Whitney-Test ermittelt, wird durch den Stern symbolisiert (\*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.1.2 Körpergewicht

Die Ermittlung des Körpergewichts geschah zweimal wöchentlich in konstanten Abständen, jedoch konnte bei der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe das Wiegen am 3. und 21. Tag nach Infektion aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden.

Man erkennt in Abbildung 9, dass sich die Körpergewichtszunahme der Schweine in den einzelnen Gruppen gleichförmig entwickelte. Auffällig war, dass bei den mit dem Wildtyp-Stamm infizierten Schweinen am 3. Tag nach Infektion eine Reduktion der Körpermasse festzustellen war, was sich allerdings im weiteren Versuchszeitraum, gemessen an den Mutanten-Infektionsgruppen, nivellierte.

Im Anhang dieser Arbeit sind die Mittelwerte des Körpergewichts einschließlich der Standardabweichung der jeweiligen Infektionsgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Infektion aufgeführt (s. S. 124).



**Abbildung 9. Körpergewicht der Infektionsgruppen im Verlauf der Infektion mit *S. Typhimurium* DT104 und der Deletionsmutanten.** Die Kurven geben den Körpergewichtsmittelwert der einzelnen Probandengruppen am jeweiligen Tag wieder, wobei die durchgehende für die Wildtyp-Infektionsgruppe, die gepunktete für die *invC::aphT*-Infektionsgruppe und die gestrichelte für die *sseD::aphT*-Infektionsgruppe steht. Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichung dar.

## 4.2 Diagnostik *Salmonella*

### 4.2.1 Kultureller Nachweis

#### 4.2.1.1 Kultureller Nachweis in Gewebeproben

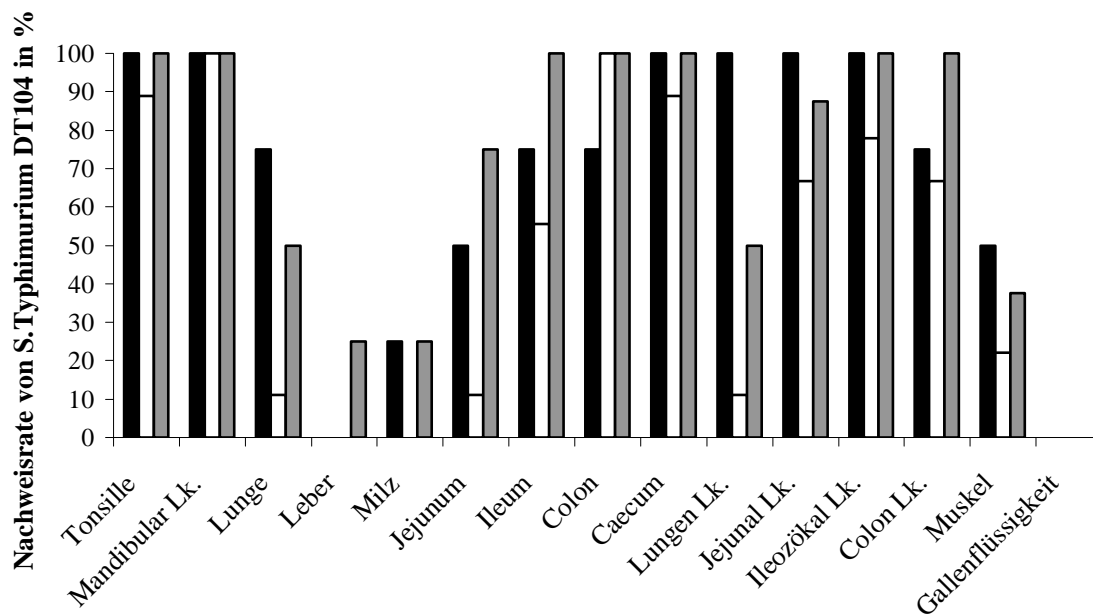
In dem ersten Infektionsversuch mit *S. Typhimurium* DT104 wurden von vier Hybridschweinen insgesamt 60 Gewebeproben zum Zeitpunkt der Tötung steril entnommen. Diese wurden in Anlehnung an die ISO 6579 kulturell auf *S. Typhimurium* untersucht. Bei allen Tieren konnten in Tonsillargewebe, Caecum, Mandibularlymphknoten, Lungenlymphknoten, Jejunallymphknoten und Ileozökallymphknoten *S. Typhimurium* nachgewiesen werden. Die Untersuchung von Lebergewebe und Gallenflüssigkeit fiel bei jedem Tier negativ aus.

Beim folgenden Infektionsversuch mit der Deletionsmutante-*invC* standen von neun Hybridschweinen 135 Gewebeproben zur Verfügung, die ebenfalls unter sterilen Bedingungen entnommen worden waren. Die kulturelle Auswertung dieses Versuchs zeigte einen positiven Befund für Mandibularlymphknoten und Colon bei allen Tieren und für Tonsillargewebe, Caecum, Jejunal-, Ileozökal- und Colonlymphknoten bei der überwiegenden Zahl der Tiere. Die Nachweisrate im Ileum betrug lediglich 55,6 %. Bei zwei Tieren der Infektionsgruppe konnte die Deletionsmutante aus der Muskulatur und bei einem der Tiere aus Lunge, Lungenlymphknoten, Jejunum isoliert werden. Die Untersuchung von Lebergewebe, Milzgewebe und Gallenflüssigkeit fiel stets negativ aus.

Beim dritten Versuch, bei dem als Infektionsstamm die Deletionsmutante-*sseD* zum Einsatz kam, wurden 120 steril gewonnene Proben von acht Hybridschweinen kulturell auf *S. Typhimurium* überprüft. Hier konnte *Salmonella* zu 100 % in den Gewebeproben von Tonsillen, Ileum, Colon, Caecum und in den Lnn. mandibularis, Lnn. illeocaecalis und Lnn. colici nachgewiesen werden. Bei fast allen Tieren war ein positiver Befund für das Jejunum und den dazugehörigen Lymphknoten zu verzeichnen. Die Untersuchung des Lungengewebes und der Lungenlymphknoten ergab eine Nachweisrate von 50 %. Bei drei von acht Tieren waren in der Muskulatur und bei zwei von acht Tieren in Leber und Milz Salmonellen isolierbar. Die Untersuchungsergebnisse der Gallenflüssigkeiten



fielen wie bei den beiden anderen Infektionsversuchen negativ aus. Die Werte sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (s. S. 124).



**Abbildung 10. Prozentuale Darstellung der Nachweisrate von *S. Typhimurium* DT104 in Gewebeproben.** Die schwarzen Balken stellen die prozentuale Nachweisrate des Wildtyp-Stamms, die weißen Balken die der Deletionsmutante-*invC* und die grauen Balken die der Deletionsmutante-*sseD* mit dem Kulturverfahren nach ISO 6579 dar. Lk., Lymphknoten.

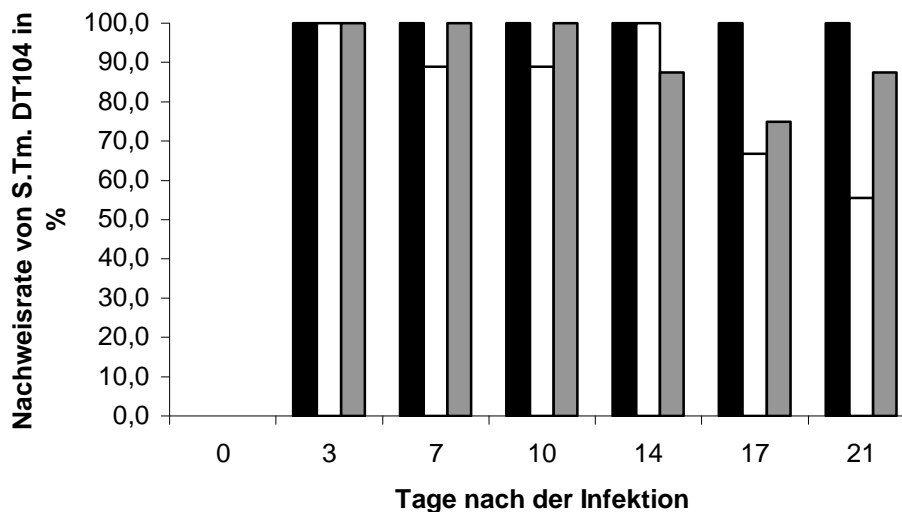
#### 4.2.1.2 Kultureller Nachweis in Faecesproben

Die Untersuchung der Kotproben auf *S. Typhimurium* erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die ISO 6579 und diente der Ermittlung der Ausscheidungsrate des jeweiligen Infektionsstamms.

Die Probandengruppe, die als Infektionsstamm den Wildtyp von *S. Typhimurium* DT104 erhalten hatte, wies über den gesamten Versuchszeitraum eine kontinuierliche Ausscheidungsrate von 100 % auf.

Die Gruppe, welche mit *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT* infiziert worden war, schied vom 3. Tag bis zum 21. Tag nach Infektion Salmonellen aus. Dabei betrug die Nachweisrate zwischen 55,6 % und 100 %.

Bei der *sseD::aphT*-Deletionsmutanten-Infektionsgruppe fiel das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung vom 3. bis zum 21. Tag positiv aus, wobei bis zum 14. Tag die Nachweisrate bei 100 % lag und in der Folge intermittierend auf 87,5 bis 75 % abfiel. Die Werte sind in Tabelle 26 gelistet.



**Abbildung 11. Prozentuelle Darstellung der Nachweisrate von *S. Typhimurium* in Kotproben.**

Die schwarzen Balken stellen die prozentuale Nachweisrate des Wildtyp-Stamms, die weißen Balken die der Deletionsmutante-*invC* und die grauen Balken die der Deletionsmutante-*sseD* mit dem Kulturverfahren nach ISO 6579 dar.

#### 4.2.2 Erreger-Nachweis mittels qualitativer PCR

Mit dieser molekularbiologischen Untersuchungsmethode, die bei einem vorherigen positiven Befund der bakteriologischen Untersuchung durchgeführt wurde, konnte eine exakte Differenzierung des jeweiligen Infektionsstamms erfolgen. Alle positiven kulturellen Nachweise von *Salmonella* konnten in jedem Fall mit einem positiven PCR-Ergebnis bestätigt werden, so dass Stall- und Laborkontaminationen ausgeschlossen werden konnten (s. S. 124, 127, 128).

Die entsprechenden Amplifikatgrößen unter Einsatz der in Tabelle 3 gelisteten stammspezifischen Oligonukleotide, sind in Tabelle 13 aufgeführt. Zur Veranschaulichung der PCR-Ergebnisse dient Abbildung 12. Weitere exemplarisch ausgewählte Elektrophorese-Gele sind im Anhang (Seite 115, 116) nachzulesen.

Tabelle 13. Produktgrößen des jeweiligen Infektionsstamms in der qualitativen PCR.

Infektionsstamm	Primer	Produktgröße
Wildtyp	FsseD RsseD	1,0 kb
	FinvC RinvC	1,5 kb
<i>sseD</i> - Mutante	FsseD RsseD	1,8 kb
<i>invC</i> - Mutante	FinvC RinvC	2,5 kb

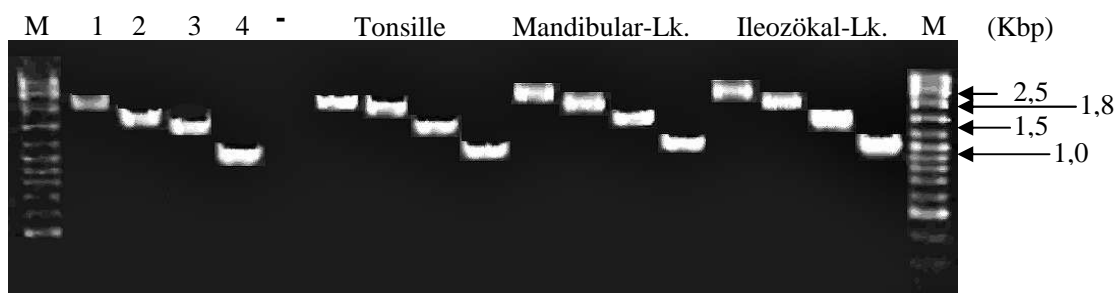


Abbildung 12. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104, *invC*-Deletionsmutante und *sseD*-Deletionsmutante in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen. M, Marker (Leiter-Mix); 1, Positivkontrolle *invC*-Mutante; 2, Positivkontrolle *sseD*-Mutante; 3, Positivkontrolle Wildtyp mit *invC*-Oligonukleotiden amplifiziert; 4, Positivkontrolle Wildtyp mit *sseD*-Oligonukleotiden amplifiziert.

#### 4.2.3 Serologischer Nachweis

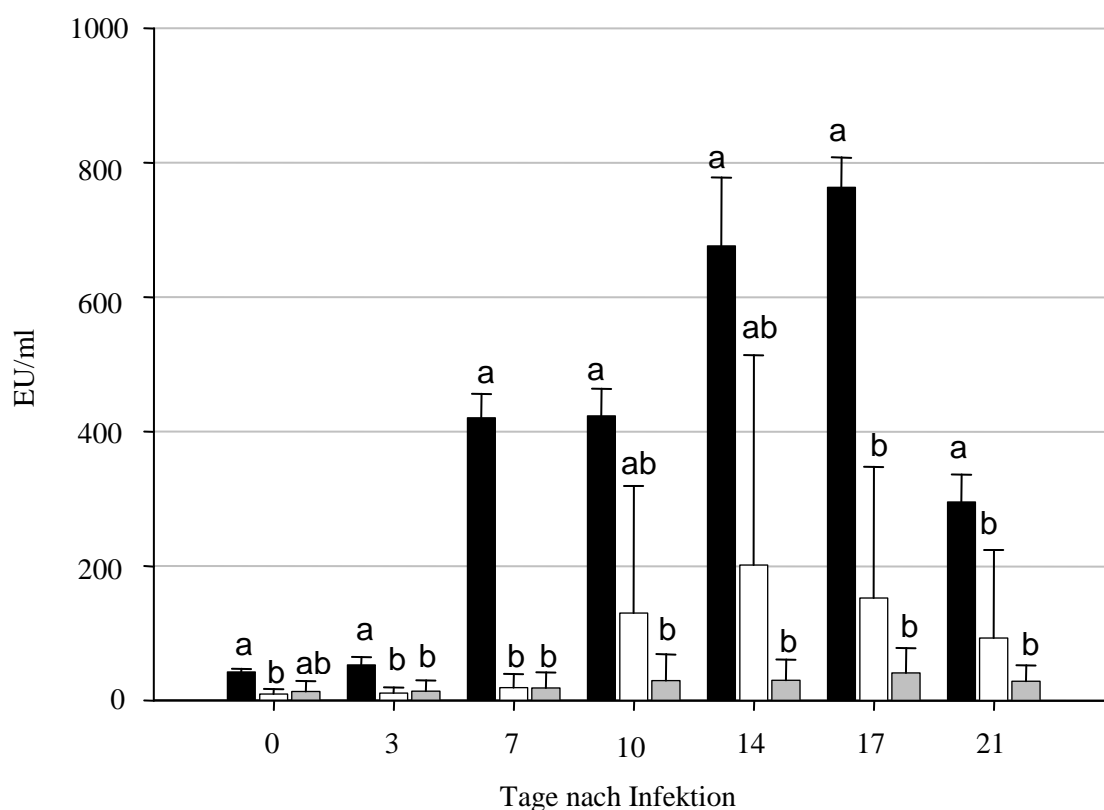
Der serologische Nachweis von *Salmonella* wurde mit dem isotypspezifischen indirekten ELISA-System SALMOTYPE® Pig STM-WCE (Fa. Labordiagnostik Leipzig GmbH, Leipzig) durchgeführt. Hierbei wurde die Antikörperaktivität der Isotypen IgA, IgG und IgM im Verlauf der Infektion ermittelt. Auf Grundlage der Quantifizierung der Antikörperproduktion bei den einzelnen Infektionsgruppen konnten zusätzliche Rückschlüsse auf die Auswirkungen der Attenuierungen der einzelnen Infektionsstämme für die humoralen Abwehrmechanismen gezogen werden.

Um die Signifikanzen zwischen den Infektionsgruppen zu ermitteln, kam der Mann-Whitney-Test zur Anwendung. Ein signifikanter Unterschied lag bei  $p \leq 0,05$  vor und ist in den Graphiken durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Für den Antikörper-Isotyp IgM, bei dem es sich um einen zirkulierenden und LPS-spezifischen Antikörper handelt, welcher im Rahmen einer Infektion sofort gebildet wird, war bei allen drei Probandengruppen die gleiche Tendenz an Aktivität zu konstatieren. Bei der *S. Typhimurium* DT104 Wildtyp-Infektionsgruppe konnte am 7. Tag nach Infektion ein Anstieg der ELISA-Units/ml (EU/ml) um das 8-fache festgestellt werden. Das Maximum wurde am 17. Tag nach Infektion erreicht, als der Basiswert von 42,76 EU/ml vor Infektion auf 763,03 EU/ml angewachsen war. Die am 21. Tag *p. inf.* gemessene Aktivität betrug 295,51 EU/ml, was wiederum einen Abfall um 61 % darstellte. Bei beiden Deletionsmutanten-Infektionsgruppen war erst am 10. Tag nach Infektion ein prägnanter Anstieg der IgM-Antikörperaktivität festzustellen. Dabei wurde bei der *invC::aphT* Mutanten-Gruppe eine Steigerung um 92 % ermittelt (9,41 EU/ml – 129,86 EU/ml). Der Peak mit einem Wert von 200,5 EU/ml wurde bei diesen Tieren in der zweiten Woche *post infectionem* erreicht. Bis zum 21. Tag des Versuchszeitraums sank der Wert auf 92,63 EU/ml. Die Tiere der *sseD::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe reagierten, wie bereits erwähnt, ebenso erst am 10. Tag nach Infektion mit einer Zunahme der Antikörperaktivität um 57 %, was in der Steigerung des Wertes von 13,03 EU/ml vor Infektion auf 29,65 EU/ml seinen Niederschlag fand. Der Maximalwert von 40,98 EU/ml konnte gleichfalls am 17. Tag nach Infektion gemessen werden; allerdings sank der Wert bis zum 21. Tag wieder auf 28,46 EU/ml. In der Abbildung 13 wurden die Werte der einzelnen Infektionsgruppen graphisch erfasst und vergleichend dargestellt. Hierbei wurde die deutlich höhere Potenz des Wildtyp-Stammes von *S. Typhimurium* DT104, eine starke Antikörperproduktion des Isotyps IgM auszulösen, ersichtlich. Die eindeutig geringste Antikörperantwort zeigten die Tiere der *sseD::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe.

**Tabelle 14. Die Signifikanzen der Unterschiede der IgM Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test.**

Tage <i>p.</i> <i>inf.</i>	Signifikanz		
	WT↔ <i>invC</i>	WT↔ <i>SseD</i>	<i>SseD</i> ↔ <i>invC</i>
0	0,033	0,068	0,923
3	0,034	0,037	0,847
7	0,034	0,037	0,847
10	0,099	0,037	0,248
14	0,099	0,037	0,124
17	0,034	0,037	0,248
21	0,099	0,037	0,564

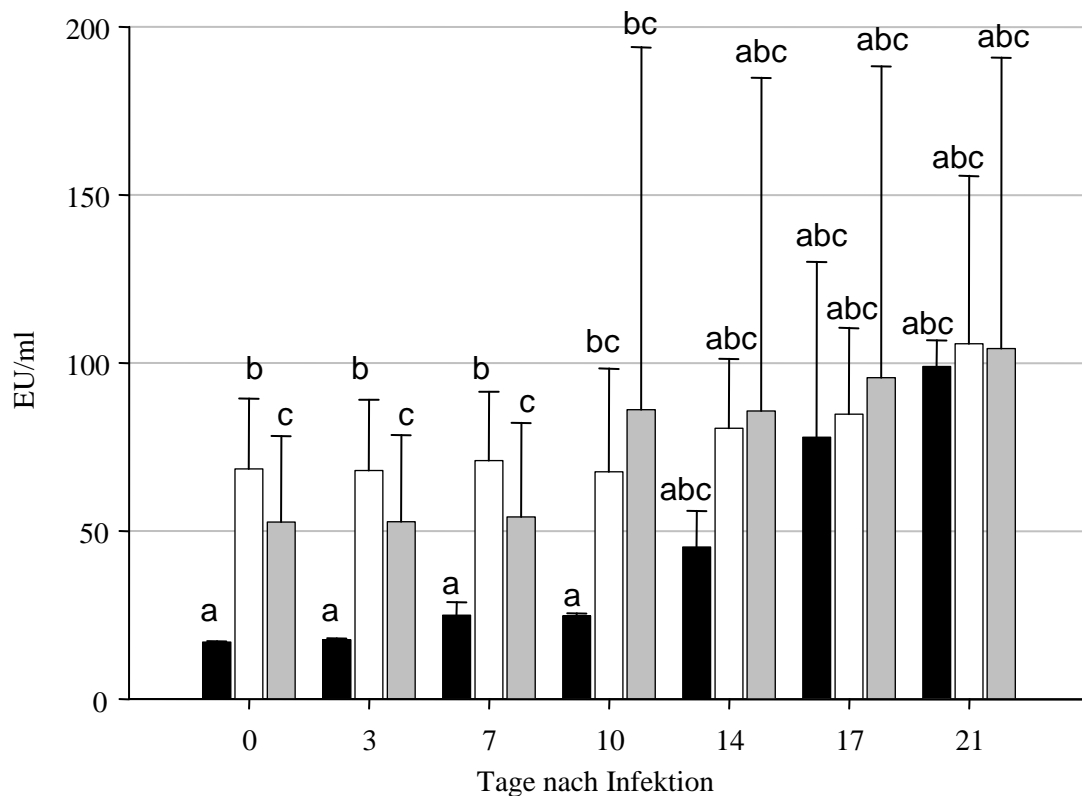


**Abbildung 13. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgM im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein.** Die schwarzen Balken bilden die Mittelwerte der Antikörperaktivität des Isotyps IgM in den Serumverlaufproben der *S. Typhimurium* DT104 Wildtyp-Infektionsgruppe, die weißen Balken die der Deletionsmutante-*invC::aphT* und die grauen Balken die der Deletionsmutante-*sseD::aphT* ab. Die vertikalen Linien stehen für die jeweilige Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Mann-Whitney-Test) zwischen den Gruppen.

Im Zuge der Bestimmung der Antikörperaktivität des Immunglobulins A im Serum, bei dem es sich um eine Vorstufe des Schleimhaut-assoziierten und somit sekretorischen IgA handelt, war bei den drei Infektionsgruppen ein kontinuierlicher Anstieg im Verlauf der Infektion mit *Salmonella* erkennbar. Die deutlichsten Reaktionen zeigten die Tiere der Wildtyp-Infektionsgruppe mit einer Steigerung der Antikörperaktivität um 83 %, wohingegen bei beiden Deletionsmutanten-Infektionsgruppen der Anstieg deutlich flacher verlief; die *sseD::aphT* Mutanten-Infektionsgruppe wies eine gemessene Antikörperaktivitätssteigerung um 47 % auf und die *invC::aphT* Mutanten-Infektionsgruppe eine Steigerung um lediglich 27 % und damit die geringste Potenz.

**Tabelle 15. Signifikanzen der Unterschiede der IgA Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test.**

Tage p. inf.	Signifikanz		
	WT↔ <i>invC</i>	WT↔ <i>SseD</i>	<i>SseD</i> ↔ <i>invC</i>
0	0,034	0,037	0,043
3	0,034	0,037	0,043
7	0,034	0,037	0,043
10	0,099	0,037	0,211
14	0,059	0,794	0,102
17	0,814	0,794	0,441
21	1,000	0,602	0,501



**Abbildung 14. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgA im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein.** Die Balken stellen die Mittelwerte der Antikörperaktivität in den Serumverlaufspröben und die vertikalen Linien die entsprechenden Standardabweichungen dar. Die schwarzen Balken geben die Werte der Wildtyp-Infektionsgruppe, die weißen Balken die der *invC::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe und die grauen Balken die der *sseD::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe von *S. Typhimurium* DT104 wieder. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Mann-Whitney-Test) zwischen den Gruppen.

Die systemisch zirkulierenden Antikörper des Isotyps IgG entfalten ihre immunologische Wirkung hauptsächlich durch das Opsonieren von Pathogenen und die Aktivierung des Komplementsystems. Bedeutungsvoll ist dieser Isotyp vor allem im Rahmen der sekundären Immunantwort. Bei einem primären Antigenkontakt erfolgt die erhöhte Bildung in der Regel nach ca. 3 Wochen.

So war bei allen drei Infektionsgruppen innerhalb des Beobachtungszeitraums kaum ein Anstieg der Antikörperaktivität im Verlauf der Infektion zu verzeichnen.

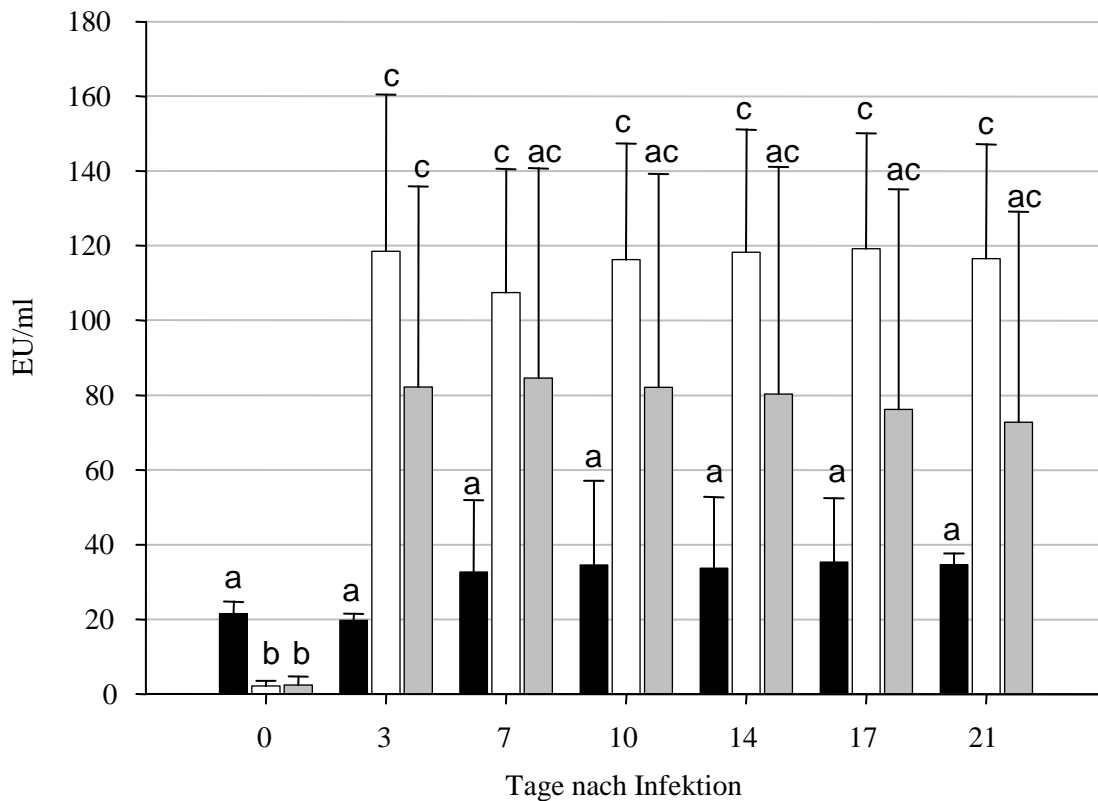
Die Tiere der Wildtyp-Infektionsgruppe von *S. Typhimurium* DT104 zeigten ab dem 7. Tag nach der Infektion eine Steigerung der Antikörperaktivität um 11,16 EU/ml im Bezug zu dem Wert vor der Infektion. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums konnten keine weiteren Veränderungen festgestellt werden.

Die Daten der Deletionsmutanten-Infektionsgruppen unterschieden sich hiervon deutlich und sie wiesen zueinander Analogien auf. So war eine deutlich erhöhte Antikörperaktivität bei beiden Tiergruppen bereits nach dem 3. Tag *post infectionem* messbar. Bei der *invC::aphT*-Infektionsgruppe stieg der Wert von 2,13 EU/ml auf 118,53 EU/ml und bei *sseD::aphT*- Infektionsgruppe von 2,33 EU/ml auf 82,23 EU/ml in dem angegebenen Zeitraum an. Bis zum 21. Tag nach der Infektion blieben diese Antikörperaktivitäten in einem kleinen Schwankungsbereich verhältnismäßig konstant.

**Tabelle 16. Signifikanzen der Unterschiede der IgG Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen, errechnet mit dem Mann-Whitney-Test.**

Tage <i>p.</i> <i>inf.</i>	Signifikanz		
	WT↔ <i>invC</i>	WT↔ <i>SseD</i>	<i>SseD</i> ↔ <i>invC</i>
0	0,034	0,037	0,386
3	0,034	0,037	0,211
7	0,034	0,192	0,386
10	0,034	0,192	0,124
14	0,034	0,433	0,083
17	0,034	0,433	0,083
21	0,034	0,602	0,068





**Abbildung 15. Antikörperaktivitäten des Isotyps IgG im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein.** Die Balken stellen die Mittelwerte der Antikörperaktivität dar und die dazugehörigen Standardabweichungen sind durch die vertikalen Linien dargestellt. Die schwarzen Balken verkörpern die Wildtyp-Infektionsgruppe, die weißen Balken die *invC::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe und die grauen Balken die *sseD::aphT* Deletionsmutanten-Infektionsgruppe von *S. Typhimurium* DT104. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Mann-Whitney-Test) zwischen den Gruppen.

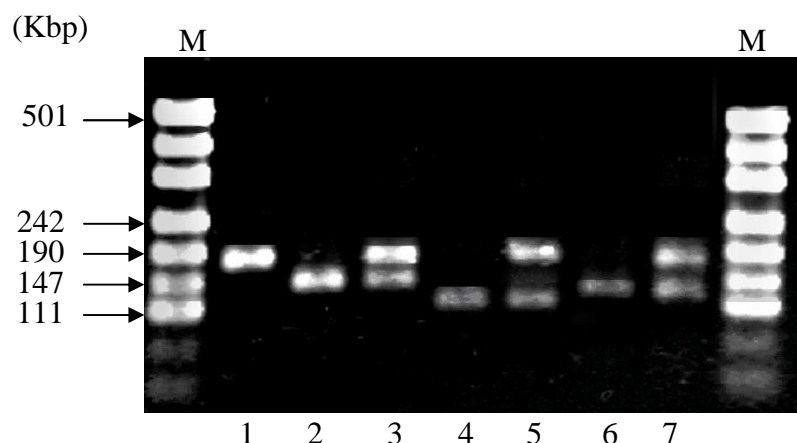
## **4.3 Zytokin-Expression**

### **4.3.1 Optimierung der quantitativen Real-time PCR zur Detektion von Zytokinen**

Um die Effizienz der quantitativen Real-time PCR zu überprüfen, wurden von den mittels herkömmlicher PCR für die einzelnen Targets (GAPDH, IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ ) erzeugten Mengenstandards logarithmische Verdünnungsreihen hergestellt und in der Real-time PCR als Template eingesetzt. Zur Effizienzbestimmung der einzelnen Zytokin-Assays wurden die Steigungen der Standardverdünnungsreihen der Zytokine ermittelt, aus denen die zum Gerät gehörige Software sodann die Effizienz der Reaktion, d. h. die Wiederfindungsrate der eingesetzten Templatemenge, berechnete. Die Effizienzwerte sollten zwischen 90 % bis 100 % liegen. Die Darstellungen der Standardreihen der untersuchten Zytokinen sind im Anhang (Seite 118 und 119) abgebildet.

Für die Negativkontrollen wurde RNase- und DNase-freies Wasser anstatt eines cDNA Templates genutzt. Bei keiner der Negativkontrollen konnte ein Signal detektiert werden.

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR wurden die Amplifikate in der Etablierungsphase anhand der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Auf diese Weise konnten die Größen der zu erwartenden PCR-Produkte überprüft und vorhandene Nebenprodukte aufgrund der einzelnen, scharf abgegrenzten Banden ohne Nebenbanden für jede einzelne Probe ausgeschlossen werden.



**Abbildung 16. Spezifitätskontrolle der Multiplex quantitativen Real-time PCR für GAPDH, IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4.** 1, GAPDH; 2, IFN- $\gamma$ ; 3, GAPDH und IFN- $\gamma$ ; 4, IL-2; 5, GAPDH und IL-2; 6, IL-4; 7, GAPDH und IL-4.

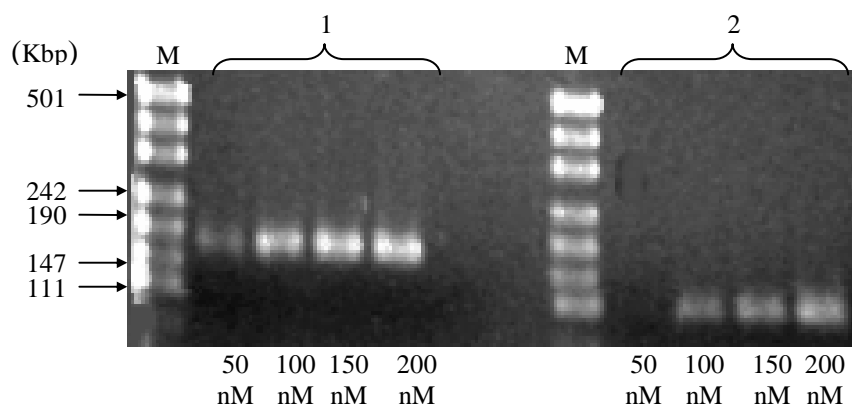
Zur Optimierung dieser quantitativen Real-time PCR war es notwendig, die Entstehung von Oligonukleotid-Dimeren zu überprüfen. Hierzu wurde SYBR®-Green eingesetzt, welches anstatt der fluorogenen Sonden den Reaktionsansätzen zugegeben wurde. Das Dissoziationsprotokoll lieferte die Schmelztemperaturen der entstandenen PCR-Produkte und die jeweiligen Schmelzkurven ergaben sich aus der ersten Ableitung ( $dF/dT$ ) der Funktion Fluoreszenzintensität (F) in Abhängigkeit zur Temperatur (T). Liegen Oligonukleotid-Dimere vor, so weisen die Schmelzkurven bei niedrigeren Schmelztemperaturen Nebenmaxima auf. In keinem Fall war eine Bildung von derartigen Oligonukleotid-Dimeren zu registrieren. Nebenprodukte waren ebenso nicht zu verzeichnen. Die Maxima der Schmelzkurven waren für jedes Produkt reproduzierbar. Die Schmelztemperaturen der einzelnen Zytokine und des HKG sind in Tabelle 17 aufgeführt; die Abbildungen der Schmelzkurven der einzelnen Zytokine und von GAPDH befinden sich im Anhang (ab Seite 119). Da die Schmelzkurven der untersuchten Negativkontrollen keinen spezifischen Schmelzpunkt aufwiesen, ist es folgerichtig anzunehmen, dass keine doppelsträngige DNA amplifiziert wurde und die eingesetzten Oligonukleotide somit spezifisch waren.

**Tabelle 17. Die Schmelztemperaturen für die Zytokine: IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  und das HKG GAPDH.**

PCR-Produkt	Schmelztemperatur
GAPDH	86,8°C
IL-2	79,7°C
IL-4	84,4°C
IFN- $\gamma$	78,0°C

Demzufolge konnte durch die Agarose-Gelelektrophorese und die Schmelzkurvenanalyse die Reinheit und Größe der jeweiligen Amplifikate kontrolliert und bestätigt werden.

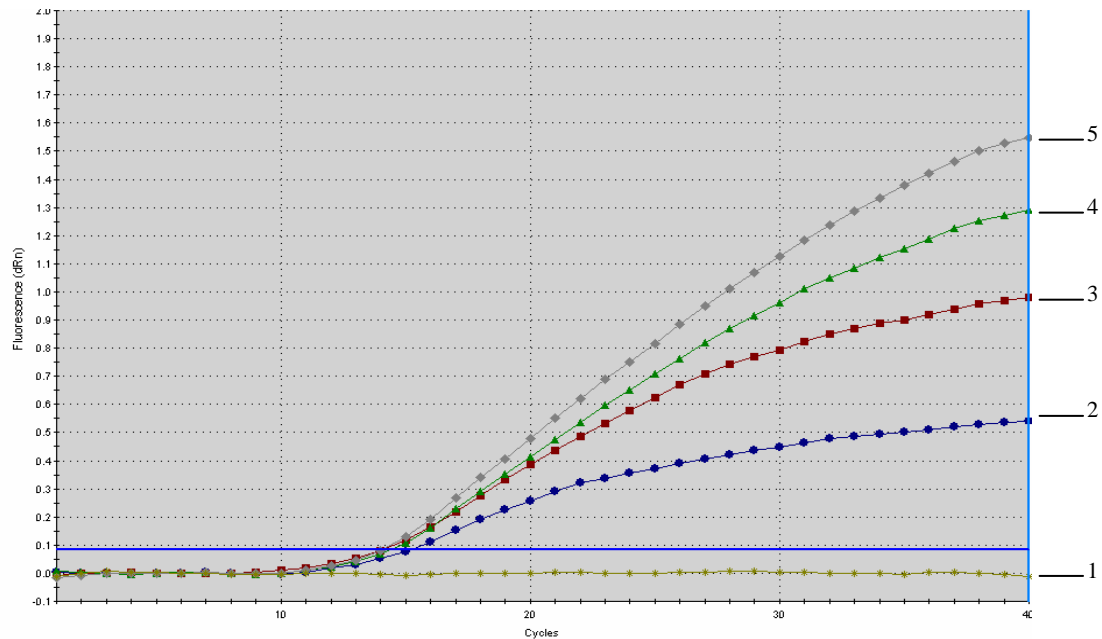
Ein weiterer Schritt zur Etablierung dieser quantitativen Real-time PCR war die Optimierung der Konzentration der einzusetzenden Oligonukleotide und Sonden. Zu diesem Zweck kamen als Template für die einzelnen Sequenzen wiederum die mittels herkömmlicher PCR erzeugten Standards zum Einsatz. Nachdem die  $C_T$ -Werte der einzelnen Oligonukleotid- und Sonden-Konzentrationen miteinander verglichen worden waren, fiel die Wahl auf einen frühen  $C_T$ -Wert in Kombination mit einer niedrigen Konzentration an Oligonukleotiden und Sonden. Zur semi-qualitativen Überprüfung wurden die Amplifikate für die jeweiligen Oligonukleotid-Konzentrationen auf Agarose-Gele aufgetragen. Exemplarisch ist dies für IL-2 und GAPDH in Abbildung 17 dargestellt.



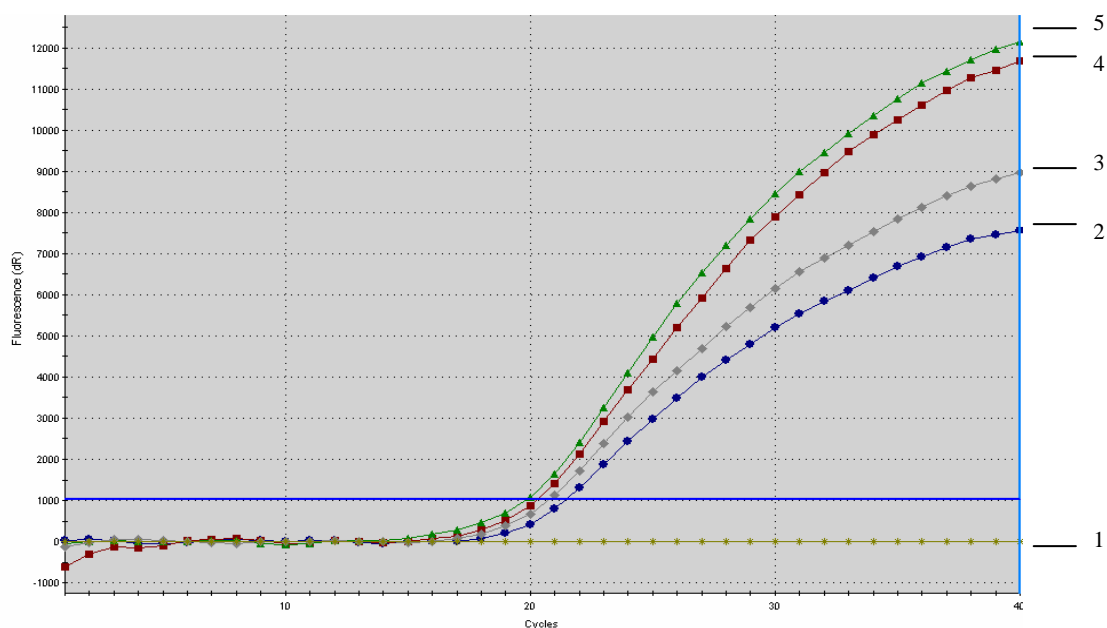
**Abbildung 17. Primeroptimierung von GAPDH und Interleukin 2 dargestellt im Agarose-Gel zur qualitativen Kontrolle.** M, Marker; 1, Primermatrix von GAPDH; 2, Primermatrix von IL-2.

Dabei wurde der Auswahl der einzusetzenden Oligonukleotid- und Sonden-Konzentrationen, der Auswertung der  $C_T$ -Werte und des Amplifikationsplots ein größeres Gewicht als der Agarose-Gelelektrophorese beigemessen. Veranschaulichend seien die Amplifikationsplots für Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zur Oligonukleotid- und Sonden-Optimierung in der Abbildung 18 und Abbildung 19 wiedergegeben. Bei jeder zu untersuchenden Zielsequenz wurde nach dem identischen Schema, wie an GAPDH erläutert, verfahren. Die in dieser Arbeit etablierte quantitative Real-time PCR ist ein Multiplex-Experiment, weswegen die hier aufgeführten Schritte für jede Sequenz kombiniert durchgeführt wurden, um die idealen Oligonukleotid- und Sonden-Konzentrationen zu ermitteln. Hierbei wurde wiederum besonderes Augenmerk

auf die Effizienz der Multiplex-PCR für die einzelnen Targets gerichtet, die zwischen 90 und 100 % liegen musste. Diese eruierten Konzentrationen für Oligonukleotide und Sonden sind in der Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt.



**Abbildung 18. Amplifikationsplot der verschiedenen GAPDH-Primer-Konzentrationen zur Optimierung der quantitativen Real-time PCR.** 1, Negativkontrolle; 2, Primerkonzentration: 50 nM; 3, Primerkonzentration: 100 nM; 4, Primerkonzentration: 150 nM; 5, Primerkonzentration: 200 nM.



**Abbildung 19. Amplifikationsplot der verschiedenen GAPDH-Sonden-Konzentrationen zur Optimierung der quantitativen Real-time PCR.** 1, Negativkontrolle; 2, Sondenkonzentration: 500 nM; 3, Sondenkonzentration: 200 nM; 4, Sondenkonzentration: 400 nM; 5, Sondenkonzentration: 300 nM.

Tabelle 18. Eingesetzte Primer-Konzentrationen für die quantitative Real-time PCR.

Sequenz	forward Primer/reverse Primer (nM)
GAPDH	500/500
IL-2	500/500
IL-4	1000/1000
IFN- $\gamma$	1000/1000

Tabelle 19. Eingesetzte Sonden-Konzentrationen für die quantitative Real-time PCR.

Sequenz	Sonden (nM)
GAPDH	300
IL-2	300
IL-4	300
IFN- $\gamma$	300

#### 4.3.2 Berechnung der Zytokin-Expression

Zur Ermittlung der *in vivo* Zytokin-Expression im Verlauf einer Salmonelleninfektion beim Schwein diente die relative (komparative) Quantifizierung. Es wurde die Genexpression der zu untersuchenden Zytokine auf ein nicht reguliertes HKG, in diesem Fall GAPDH, bezogen. Diese Methode wurde aufgrund der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse gewählt. Zu bestimmen war hierbei der relative Expressionsunterschied, die so genannte Ratio, einer Probe vor der Infektion und zu jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten während der Salmonelleninfektion. Die Ratio wurde zum Referenzgen (GAPDH) normalisiert und stets auf die Standardprobe (Calibrator bzw. Probe vor der Salmonelleninfektion) bezogen. Für die Berechnung wurde die arithmetische Formel  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  verwandt, die sich aus folgendem Berechnungsschema ergibt:

$$\Delta\text{C}_T = \text{C}_T \text{ Zytokin} - \text{C}_T \text{ GAPDH}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{C}_T \text{ Probe nach der Infektion} - \Delta\text{C}_T \text{ Probe vor der Infektion}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

In Bezug auf diesen Term geht man von der Annahme aus, dass die Effizienz der PCR-Reaktionen 100 % beträgt, demnach eine Verdoppelung der Anzahl der

Ausgangsmoleküle pro Amplifikationszyklus stattfindet. Die untersuchten Proben wurden jeweils vor der Infektion als definierte Null-Probe sowie am 7., 14. und 21. Tag nach der Infektion gewonnen. Zur Veranschaulichung soll die Berechnung mit einem Beispiel dargelegt werden.

**Tabelle 20. C<sub>T</sub>-Mittelwerte von einem mit *S. Typhimurium* DT104 infizierten Hybridschwein.**

Zytokin	Tag 0	7 Tage <i>p. inf.</i>	14 Tage <i>p. inf.</i>	21 Tage <i>p. inf.</i>
IL-2	31,01	33,14	27,60	26,24
GAPDH	21,58	20,26	22,19	26,58
IL-4	31,41	32,92	27,64	26,53
GAPDH	21,33	19,92	22,16	26,87
IFN- $\gamma$	28,26	28,70	26,04	26,69
GAPDH	21,98	20,00	22,32	27,09

Berechnung der Ratio für IL-2 am Tag 7 *p. inf.*:

$$\Delta C_{T(\text{Kontrolle})} = 31,01 - 21,58 = 9,43$$

$$\Delta C_{T(\text{Behandlung})} = 33,14 - 20,26 = 12,88$$

$$\Delta \Delta C_T = 12,88 - 9,43$$

$$R = 0,092$$

Berechnung der Ratio für IL-4 am Tag 7 *p. inf.*:

$$\Delta C_{T(\text{Kontrolle})} = 31,41 - 21,33 = 10,08$$

$$\Delta C_{T(\text{Behandlung})} = 32,92 - 19,92 = 13,00$$

$$\Delta \Delta C_T = 13,00 - 10,08 = 2,92$$

$$R = 0,13$$

Berechnung der Ratio für IFN- $\gamma$  am Tag 7 *p. inf.*:

$$\Delta C_{T(\text{Kontrolle})} = 28,26 - 21,98 = 6,28$$

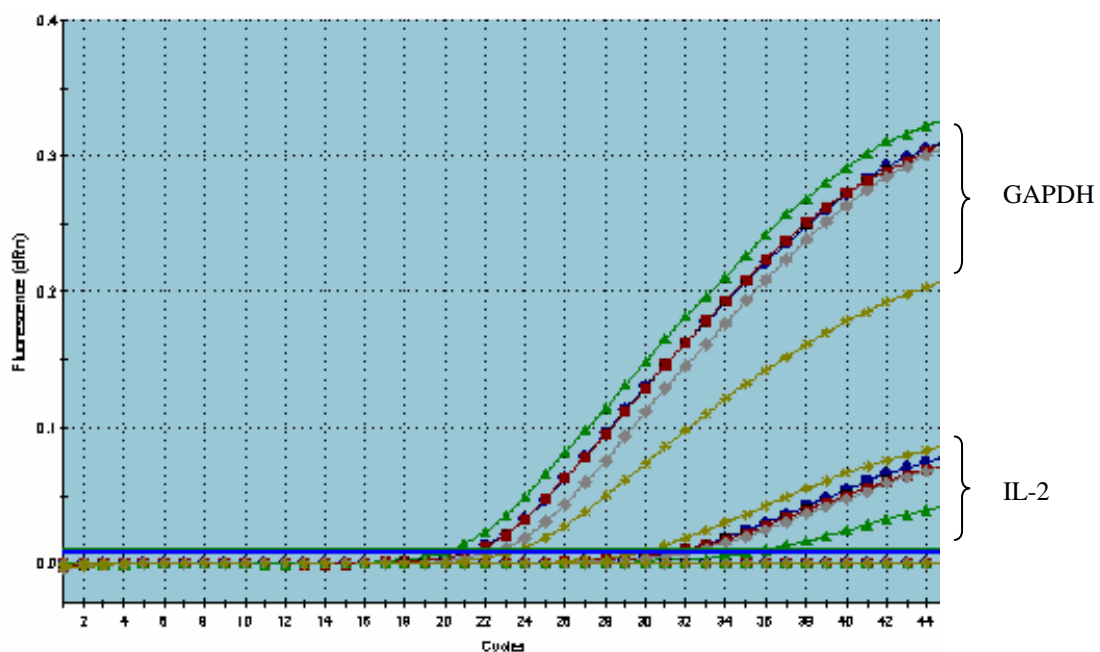
$$\Delta C_{T(\text{Behandlung})} = 28,70 - 20,00 = 8,70$$

$$\Delta \Delta C_T = 2,42$$

$$R = 0,19$$

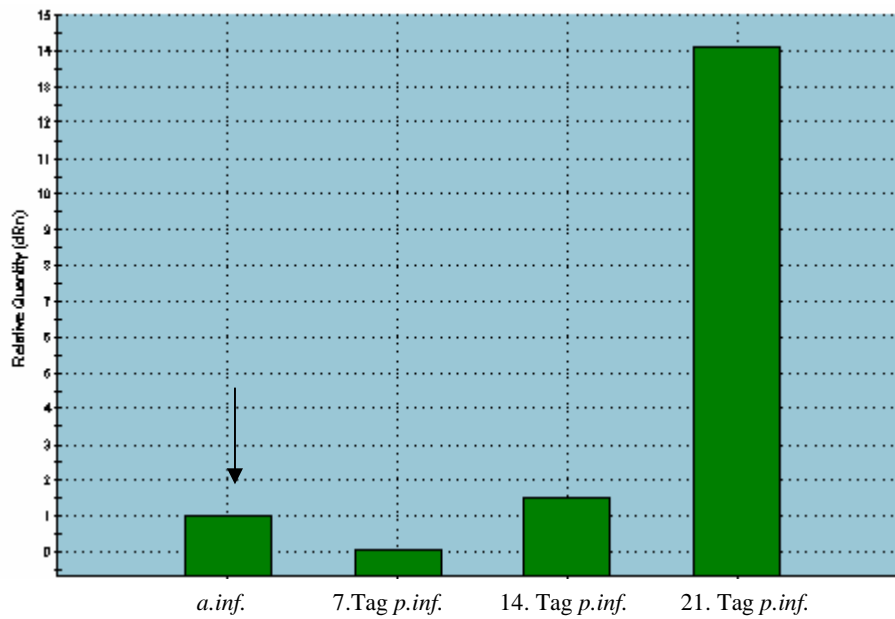
### 4.3.3 Analyse der Zytokin-Expression

Für jede Probandengruppe wurden die Expressionsunterschiede von IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  zwischen dem Zeitpunkt vor Infektion mit *Salmonella* (Tag 0) und den Tagen 7, 14 und 21 nach der Infektion im Doppelansatz ermittelt und im Anschluss die Ratio-Mittelwerte miteinander verglichen. Dabei sollte die Ratio vor der Infektion idealerweise den Wert des Calibrators (1,00) annehmen, da es sich um das identische Probenmaterial handelte (siehe auch Abbildung 7). Im Anhang sind die Mittelwerte der einzelnen  $C_T$ -Werte und  $\Delta C_T$ -Werte, mit Standardabweichung, aufgeführt (siehe ab Seite 129).



**Abbildung 20.** Amplifikationsplot anhand eines Probanden, exemplarisch abgebildet für Interleukin 2. Diese Darstellung stammt von einem Experiment mit dem Gerät MX 3000P (Multiplex QPCR System™, Stratagene, West Cedar Creek, USA). Auf der Abszisse sind die Zyklen der PCR-Reaktion dargestellt und die Ordinate gibt die gemessene Fluoreszenz wieder.

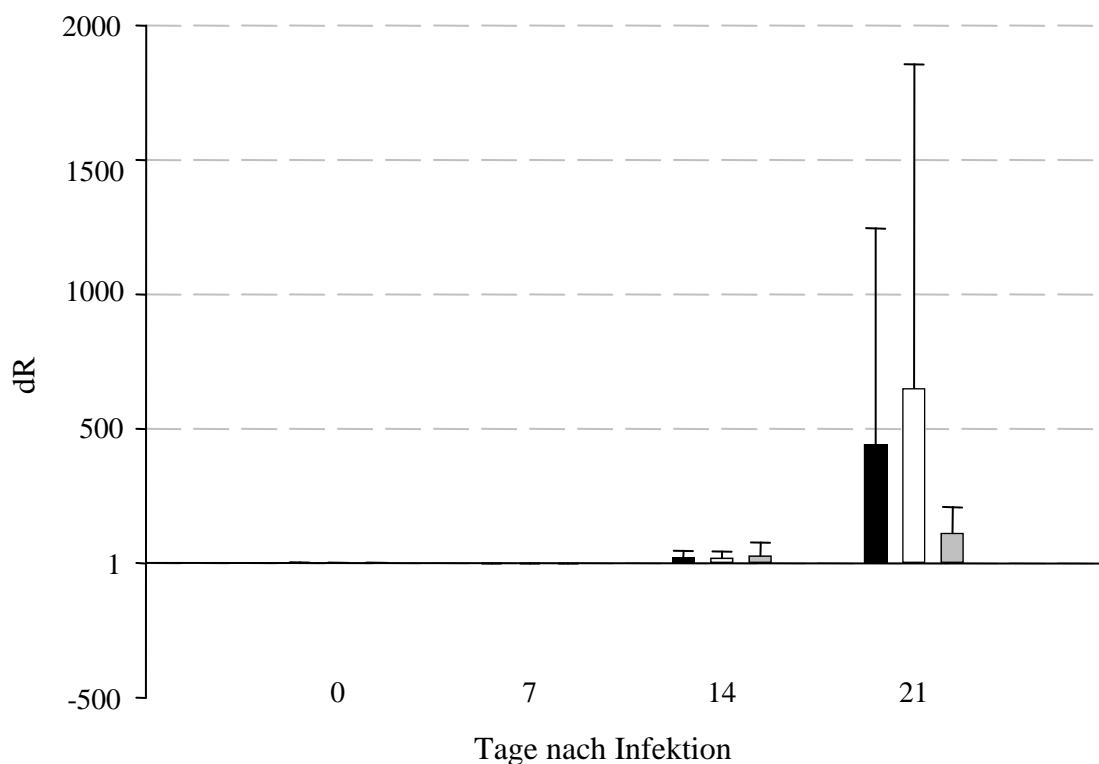




**Abbildung 21. Relative Quantifizierung anhand eines Tieres, exemplarisch dargestellt für Interleukin 2.** Bei dieser Darstellung handelt es sich um dasselbe Experiment wie in Abbildung 20. Die Abbildung wurde von der dazugehörigen Software des Gerätes MX 3000P (Multiplex QPCR System™, Stratagene, West Cedar Creek, USA) erstellt. Die Doppelansätze wurden gemittelt. *a.inf.*, *ante infectionem*; *p. inf.*, *post infectionem*

#### 4.3.3.1 Expressionsanalyse der Salmonella Typhimurium DT104 Wildtyp-Infektionsgruppe

Es war offensichtlich, dass alle drei Zytokine in ihrer Expression die gleiche Tendenz aufwiesen. So sank bei den Tieren nach 7 Tagen erst die Zytokin-Produktion, war nach 2 Wochen jedoch um das 20fache gesteigert und nach 21 Tagen nochmal rapide angestiegen. Augenscheinlich ist dies mit folgender Darstellung (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Zytokin-Expressionsunterschiede der mit *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp infizierten Hybridschweine.** Die schwarzen Balken stellen die relative Expression von Interleukin 2, die weißen Balken von Interleukin 4 und die grauen Balken von Interferon  $\gamma$  dar. Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

**Tabelle 21. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit *S. Typhimurium* DT104-Wildtyp infizierten Hybridschweine.** Aufgeführt sind die Mittelwerte der nach obigem Berechnungsschema ermittelten Ratios, die sich auf den Expressionswert vor der Infektion (Tag 0) mit dem Idealwert 1,00 beziehen.

Ratio-Mittelwerte			
Tag	IL-2	IL-4	IFN- $\gamma$
0	1,46 $\pm$ 0,80	1,00 $\pm$ 0,28	1,18 $\pm$ 0,13
7	0,93 $\pm$ 1,77	0,93 $\pm$ 1,72	0,50 $\pm$ 0,57
14	21,20 $\pm$ 24,67	20,68 $\pm$ 22,21	27,81 $\pm$ 48,90
21	440,73 $\pm$ 804,09	649,42 $\pm$ 1205,54	110,92 $\pm$ 97,21

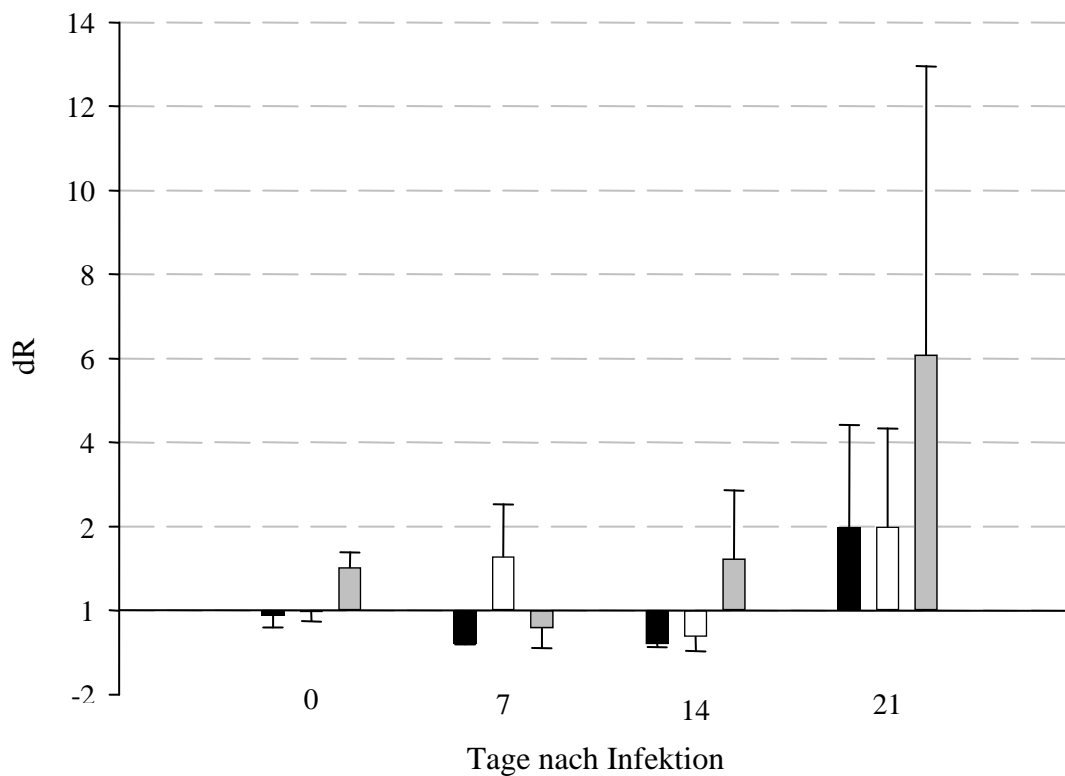
#### 4.3.3.2 Expressionsanalyse der *S. Typhimurium* DT104 Deletionsmutanten *invC::aphT*-Infektionsgruppe

Durch die relative Quantifizierung konnte ein konträres Verhalten der einzelnen Zytokine beobachtet werden. Tatsächlich sank die Expressionsrate von IL-2 bis zum 14. Tag nach der Infektion mit der *invC::aphT* Deletionsmutante von *S. Typhimurium* kontinuierlich ab, und erst am 21. Tag nach der Infektion war eine Steigerung der relativen Expression um den Faktor 9,9 zu verzeichnen.

Im Kontrast zu den anderen untersuchten Zytokinen führte die Infektion mit dieser Deletionsmutante nach 7 Tagen zu einer Erhöhung der IL-4-Expression von einer Ratio von 0,97 auf 1,29. Nach 14 Tagen war die IL-4-Ausschüttung um den Faktor 3,5 gesunken. Doch am 21. Tag *p. inf.* hatte sich die Quantität von IL-4 auf das Level von IL-2 mit einer Ratio von 2,00 eingepegelt.

Bei IFN- $\gamma$  war auch zunächst ein sehr deutliches Absinken der relativen Expressionrate zu beobachten. Nach 2 Wochen *p. inf.* aber erhöhte sich die Ratio um den Faktor 2,2 und nach 3 Wochen konnte, verglichen mit den Interleukinen die höchste Expressionsrate dokumentiert werden. Der Ratio-Mittelwert lag bei 6,09.

Zusammenfassend betrachtet unterlagen alle untersuchten Zytokine im Laufe der Infektion einer Expressionsdepression, die allerdings spätestens nach 21 Tagen *p. inf.* in eine deutliche Expressionssteigerung mündete.



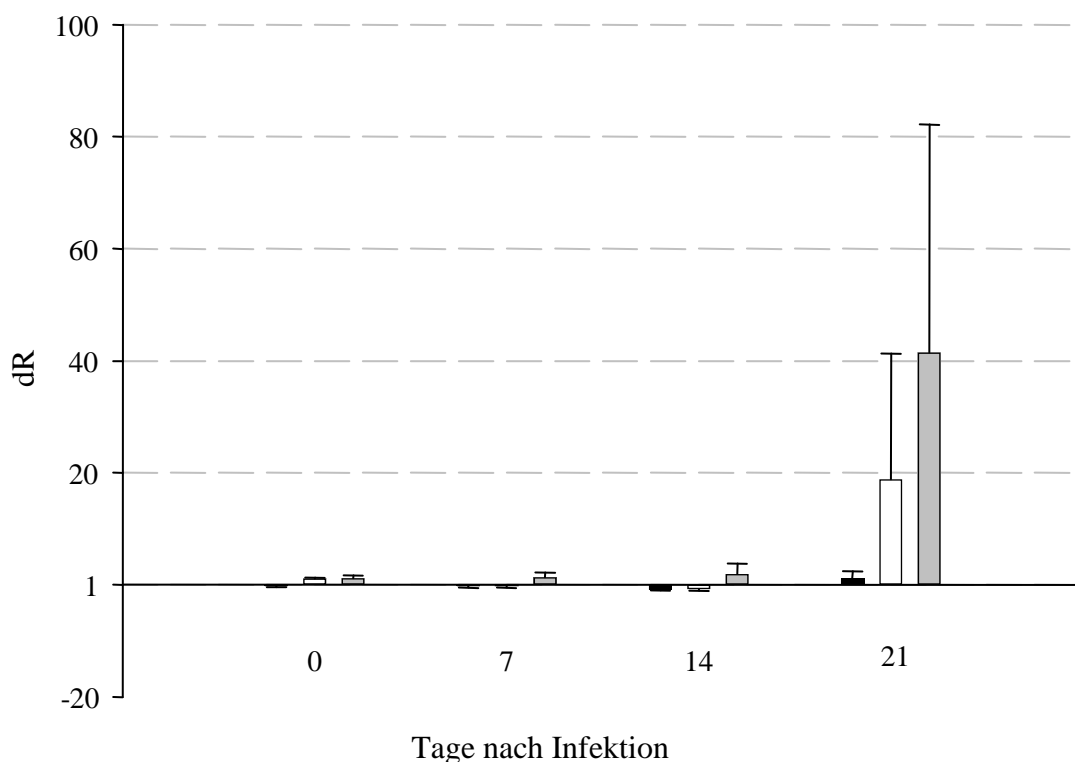
**Abbildung 23. Zytokin-Expressionsunterschiede der mit *S. Tm* DT104-*invC::aphT* infizierten Hybridschweine.** Die schwarzen Balken stellen die relative Expression von Interleukin 2, die weißen Balken von Interleukin 4 und die grauen Balken von Interferon  $\gamma$  dar. Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

**Tabelle 22. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit *S. Typhimurium* DT104-*invC::aphT* infizierten Hybridschweine.** Gelistet sind die Mittelwerte der nach obigem Berechnungsschema ermittelten Ratio, die sich auf den Expressionswert vor der Infektion (Tag 0) idealer Weise mit dem Wert 1,00 beziehen.

Ratio-Mittelwerte			
Tage	IL-2	IL-4	IFN- $\gamma$
0	0,88 $\pm$ 0,28	0,97 $\pm$ 0,23	1,03 $\pm$ 0,35
7	0,71 $\pm$ 0,01	1,29 $\pm$ 1,24	0,57 $\pm$ 0,46
14	0,20 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,34	1,23 $\pm$ 1,63
21	1,98 $\pm$ 2,43	2,00 $\pm$ 2,34	6,09 $\pm$ 6,86

#### 4.3.3.3 Expressionsanalyse der *S. Typhimurium* DT104 Deletionsmutanten *sseD::aphT*-Infektionsgruppe

In dieser Infektionsgruppe wurde die Expressionsrate aller untersuchten Zytokine zu Beginn der Infektion gleichfalls herunterregulierung ihrer Expressionsrate. Am deutlichsten war dies bei Interleukin 2 mit einer Verringerung um 87 % der Fall, wohingegen bei Interleukin 4 eine Senkung um 81 % und bei Interferon  $\gamma$  nur um 24 % erfolgte. Am 21. Tag nach der Infektion war eine Erhöhung der Ratio aller Zytokine zu beobachten. Während die Entwicklung im Fall von Interleukin 2, wie in der Abbildung 24 ersichtlich, als Wiedererlangen des Ausgangsniveaus zu interpretieren war, verzeichneten Interleukin 4 und Interferon  $\gamma$  eine deutliche Steigerung ihrer Expression: im Vergleich zu Tag 14 *p. inf.* Interleukin 4 um den Faktor 90 und Interferon  $\gamma$  um den Faktor 46,5.



**Abbildung 24.** Darstellung der Zytokin-Expressionsrate der mit *S. Typhimurium* DT104-*sseD::aphT* infizierten Hybridschweine. Die schwarzen Balken stellen die relative Expression von Interleukin 2, die weißen Balken von Interleukin 4 und die grauen Balken von Interferon  $\gamma$  dar. Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

**Tabelle 23. Relative Quantifizierung der Zytokin-Expression der mit *S. Typhimurium* DT104 *sseD::aphT* infizierten Hybridschweine.** Gelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der nach obigem Berechnungsschema ermittelten Ratio, die sich auf den Expressionswert vor der Infektion (Tag 0) idealer Weise mit dem Wert 1,00 beziehen.

Ratio-Mittelwerte			
Tage	IL-2	IL-4	IFN
0	0,79 ± 0,20	1,11 ± 0,12	1,17 ± 0,52
7	0,71 ± 0,24	0,82 ± 0,35	1,33 ± 0,79
14	0,10 ± 0,12	0,21 ± 0,27	0,89 ± 1,87
21	1,08 ± 1,32	18,81 ± 22,47	41,41 ± 40,75

Die Expressionsraten der untersuchten Zytokine wurden zusätzlich zeitlich gegliedert im Anhang (s. S. 121, 122, 123) dargestellt, wobei eine Gegenüberstellung der Infektionsgruppen erfolgte.

## 5 Diskussion

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung einzelner Virulenzfaktoren des epidemiologisch bedeutsamen Serovars *S. Typhimurium* DT104 bei der Salmonelleninfektion des Schweins und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Immunsystem charakterisiert werden. Der Einsatz von zwei Mutanten, die Deletionen des *invC*-Gens in der SPI 1 und des *sseD*-Gens in der SPI 2 aufwiesen, ermöglichte vergleichende Untersuchungen zur Invasivität und intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate sowie Schlussfolgerungen auf die Bedeutung dieser Virulenzfaktoren und deren Effekte auf den Wirtsorganismus. Bisher erfolgten derartige Untersuchungen im Maus- und Hühnermodell, jedoch ist eine Übertragung dieser Untersuchungsergebnisse auf das Schwein nur eingeschränkt möglich. Das Schwein wurde darüber hinaus auch als Zielspezies gewählt, da es das derzeit bedeutendste Reservoir für humane *S. Typhimurium*-Infektionen ist. Durch den überwiegend symptomlosen Verlauf einer *S. Typhimurium*-Infektion beim Schwein gilt kontaminiertes, rohes Schweinefleisch als große Gefahrenquelle für den Menschen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erweitern die Kenntnisse zur Pathogenese von Salmonelleninfektionen und können dazu beitragen, den Eintrag von Salmonellen in die Lebensmittelkette zu verringern, um somit einen verbesserten Verbraucherschutz zu gewährleisten.

Durch das Verfahren der quantitativen Real-time PCR, die im Rahmen dieser Arbeit für den Nachweis der Zytokine Interleukin 2, Interleukin 4 und Interferon  $\gamma$  beim Schwein etabliert wurde, konnten Aussagen über die adaptive Immunität getroffen werden. Durch die zeitgleich erhobenen klinischen, kulturellen und serologischen Daten war es möglich, Befunde über die Attenuierung der jeweiligen *Salmonella*-Mutante und die Wirkungen des Erregers auf den Wirtsorganismus zu vergleichen.

Das gut typisierte Probenmaterial stammte von experimentell infizierten Schweinen aus drei Infektionsversuchen, welche nach einem bereits etablierten Infektionsmodell mit *S. Typhimurium* DT104 beim Schwein ausgeführt wurden (MARG et al. 2001). In jedem Infektionsversuch erfolgte eine exakte Einzeltierdokumentation (Seite 46). Lediglich ein Tier der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe wurde nicht in die Ergebnisauswertung einbezogen, da es den Erreger ungeplanter Weise *intrapulmonal* verabreicht bekommen hat. Bei der Wildtyp-Infektionsgruppe verstarben zwei Tiere

wenige Stunden nach der Infektion an Symptomen einer Septikämie, was die geringere Probandenanzahl in dieser Versuchsgruppe erklärt.

## 5.1 Klinik

### 5.1.1 Vergleich der klinischen Befunde

In der Literatur wurden bereits Infektionsversuche im Mausmodell mit den in dieser Arbeit eingesetzten Deletionsmutanten beschrieben, deshalb bestand der Verdacht einer geringeren klinischen Belastung der Tiere im Vergleich zum Wildtypstamm, da die Mutationen in SPI 1 und SPI 2 zu einer Attenuierung des Erregers führen (HEESEMANN u. HENSEL 2000).

Dies konnte durch unsere Untersuchungen bestätigt werden, da die Befunde der klinischen Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen den Schweinen der Wildtyp-Infektionsgruppe und denen der Mutanten-Infektionsgruppen aufwiesen. Lediglich die Tiere, die den vollvirulenten Stamm von *S. Typhimurium* DT104 erhielten, zeigten typische Symptome einer Salmonellose. Wenige Stunden nach Infektion verendeten zwei Tiere aufgrund einer akuten Septikämie, was auf die Stärke des gewählten Challenge-Modells schließen läßt. Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass eine manifeste Salmonellose durch die Serovar Typhimurium häufig nur bei prädisponierenden Faktoren auftritt, sie ähnelt jedoch dann einer Cholerasuis-Infektion, welche durch reduziertes Allgemeinbefinden, Fieber, pneumonische Symptome und Diarrhoe geprägt ist (SELBITZ et al. 1995). Basierend auf dem etablierten Infektionsmodell wurden hohe Infektionsdosen eingesetzt, was ursächlich für die deutlich ausgeprägte Klinik der Wildtyp-Infektionsgruppe war. Der vollvirulente Stamm führte zu deutlichen Veränderungen fast aller untersuchten klinischen Parameter mit Ausnahme der Atmung, die sich stets im physiologischen Bereich befand. Nach ca. einer Woche erschienen die Tiere jedoch wieder klinisch unauffällig. Lediglich die Durchfallsymptomatik zog sich bis zum 17. Tage nach Infektion hin. Diese klinische Symptomatik kongruierte mit Daten von vorangegangenen Untersuchungen mit diesem Wildtyp-Isolat bei identischer Infektionsdosis (MARG et al. 2001).

Die Schweine beider Mutanten-Infektionsgruppen, welche eine gleiche Infektionsdosis erhielten, zeigten hingegen keine klinischen Symptome einer Salmonellose. Somit konnte schon anhand dieser klinischen Befunde von einer Attenuierung beider



Infektionsstämme *invC::aphT* und *sseD::aphT* ausgegangen werden und die bestehenden Vermutungen zur klinischen Bedeutung dieser Mutationen, die auf Versuchen im Mausmodell basierten, konnte an der eigentlichen Zielspezies Schwein bestätigt werden (HEESEMANN u. HENSEL 2000).

### **5.1.2 Vergleich der Körpergewichtsentwicklung**

Die Schweine der Wildtyp-Infektionsgruppe unterschieden sich wiederum von den Tieren der beiden Mutanten-Infektionsgruppen, da am 3. Tag nach Infektion eine Gewichtsabnahme dokumentiert wurde. Zuvor lag jedoch in dieser Gruppe eine außerordentliche Gewichtszunahme von 1,55 kg zwischen Tag 0 und einen Tag nach Infektion vor, welches als Messfehler zu diskutieren ist. Begründet werden kann die insgesamt geringgradig verminderte Gewichtszunahme der Wildtyp-Infektionsgruppe allerdings mit dem klinischen Zustand der Tiere, da verschlechtertes Allgemeinbefinden, gesenkte Nahrungsaufnahme, Fieber und Diarrhoe dies unweigerlich zur Folge haben. Das Körpergewicht beider Mutanten-Infektionsgruppen entwickelte sich dagegen gleichförmig. Diese Divergenz zwischen Wildtyp- und Mutanten-Infektionsgruppen beschränkte sich nur auf die erste Woche nach Infektion, im Anschluß wiesen alle Probandengruppen den gleichen Kurvenverlauf auf (Seite 58).

## **5.2 Diagnostik *Salmonella***

### **5.2.1 Kultureller Nachweis von *S. Typhimurium* DT104**

#### 5.2.1.1 Vergleich der Ausscheidungsrate in Faeces zwischen den Infektionsgruppen

Der kulturelle Nachweis von *Salmonella* in Faecesproben erfolgte nach dem standardisierten Verfahren (ISO 6579). Die Kotproben wurden in einem kontinuierlichen und engen Abstand entnommen, um eine sichere Aussage über die Dauer der Ausscheidung zu treffen (VON ALTROCK et al. 2000). Generell können persistent infizierte Schweine für einige Wochen bis Monate Salmonellen ausscheiden und jederzeit nach Einwirkung von Stress diesen Status wieder erlangen (WOOD et al. 1989).

Da es sich, worauf die klinischen Befunde hindeuteten, im Falle der Mutanten-Infektionsgruppen um latente Salmonelleninfektionen handelte, bestand der Verdacht, dass diese Tiere stille, nicht ausscheidende Träger oder intermittierende Ausscheider waren. Die Probandengruppen, welche als Infektionskeim die Deletionsmutante *invC::aphT* oder die Deletionsmutante *sseD::aphT* erhielten, erwiesen sich tatsächlich als intermittierende Ausscheider, während 100 % der Tiere der Wildtyp-Infektionsgruppe kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum Salmonellen ausschied (siehe Kapitel 4.2.1.2). Somit konnte auch an dieser Stelle eine Attenuierung beider Deletionsmutanten bestätigt werden, da mit einem geringeren Ausscheidertum ein gesenkter Infektionsdruck in den Beständen korreliert. Die *invC::aphT*-Mutante führte dabei im Vergleich zu den zwei anderen Infektionskeimen zur geringsten Ausscheidungsrate. Dies könnte man mit der eingeschränkten Fähigkeit zur Invasion dieser Deletionsmutante begründen, da eine Abhängigkeit zwischen der daraus resultierenden, lediglich vorübergehenden Haftung des Erregers im Darm und der intermittierenden Ausscheidung mit dem Kot existiert. Die kurzzeitige Erregerhaftung im Darm wird unter Feldbedingungen durch Aufnahme niedriger Keimzahlen ( $10^3$ - $10^5$ ) hervorgerufen (DEDIE et al. 1993).

#### 5.2.1.2 Vergleich der Invasivität und intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate zwischen den Infektionsstämmen

Die Untersuchungen zur Invasivität und intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate jedes Infektionskeims wurde anhand von 15 verschiedenen Organproben, welche mittels bakteriologischer Diagnostik in Anlehnung an die ISO 6579 auf die Organbesiedlung von *Salmonella* überprüft wurden, durchgeführt. Abweichend von diesem Standard wurde die Selektivanreicherung im Doppelansatz mit RV-Medium vorgenommen, da *S.Typhimurium* DT104 in diesem Medium ein besonders gutes Wachstumsverhalten aufweist. Der Einsatz eines zweiten Selektivmediums konnte entfallen, da die bakteriologische Diagnostik auf den jeweiligen Infektionsstamm zielte.

*S.Typhimurium* ist ein invasiver Erreger, der aufgrund seiner Virulenzfaktoren die Fähigkeit besitzt, sich systemisch über das lymphatische System und den Blutstrom auszubreiten. Als eine Voraussetzung gilt jedoch die Fähigkeit zum Überleben und zur Vermehrung in Makrophagen (ALTHOUSE et al. 2003). Bekannt ist, dass bei einer

persistenten Infektion mit Salmonellen der Erreger mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Tonsillen, kaudalem Jejunum, Ileum, Caecum, Colon und Mandibular- und Ileozökallymphknoten isoliert werden kann. So besteht die Annahme, dass diese Organe einen Einfluß auf die Erregerpersistenz haben (WOOD et al. 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass keine Abhängigkeit zwischen Inokulationsroute und Organbesiedlung besteht (GRAY et al. 1995).

Um die eventuelle Attenuierung und die Auswirkung der eingesetzten Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtypstamm zu eruieren, wurden insgesamt 315 Gewebeproben qualitativ auf *Salmonella* untersucht. Zur exakten Differenzierung der jeweiligen Infektionsstämme diente die molekularbiologische Untersuchung unter Einsatz von stammspezifischen Oligonukleotiden. Die Durchführung erfolgte bei jedem positiven kulturellen Nachweis von *Salmonella*. Die insgesamt 188 bakteriologisch positiven Proben konnten alle mit einem positiven PCR-Ergebnis bestätigt werden. Somit war zusätzlich sichergestellt, dass keine Stall- und Laborkontaminationen stattgefunden haben. Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Infektionsstämmen festgestellt werden. Im Fall der Mutante mit einer Deletion des *invC*-Gens konnte bereits in *in vitro*-Versuchen eine verminderte Fähigkeit zur epithelialen Invasion gezeigt werden (GALLOIS et al. 2001). Bei den Schweinen, welche diesen Infektionsstamm erhielten, wurde eine Besiedlungsrate der 15 untersuchten inneren Organe von lediglich 47,4 % ermittelt. Somit war die bestehende Vermutung eines reduzierten Invasionsvermögens bestätigt. Im Vergleich dazu betrug die Besiedlungsrate der inneren Organe beim Wildtypstamm 68,3 % und bei der *sseD*-Deletionsmutante 69,2 %. Bei allen Tieren der drei Infektionsgruppen war jedoch ein Nachweis von *Salmonella* aus den Mandibularlymphknoten möglich. Ebenso bestanden bei allen drei Infektionsgruppen hohe Nachweisraten bei Tonsillargewebe, Ileum, Colon, Caecum, Jejunallymphknoten, Ileozökallymphknoten und Colonlymphknoten. Auffällig war, dass beide Deletionsmutanten vergleichend zum Wildtypstamm zu einer deutlich höheren Besiedlung des Colongewebes befähigt waren. Die Untersuchung von Gewebeproben des Ileums, Jejunums und des Colonlymphknotens zeigten bei einer größeren Anzahl der Tiere der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe positive Befunde als bei der Wildtyp-Infektionsgruppe. Dies verdeutlichte wiederholt, dass bei dieser Deletionsmutante keine Einschränkung im Invasionsvermögen vorlag.

## 5.2.2 Serologische Untersuchungen

Um Aussagen über die Auswirkungen der Attenuierungen der einzelnen Infektionsstämme auf die Antikörperantwort treffen zu können, erfolgte die Bestimmung der Serum-Antikörperaktivitäten der Isotypen IgA, IgG und IgM im Verlauf der Salmonelleninfektion. Dabei kam das isotypspezifische ELISA-Testsystem SALMOTYPE<sup>®</sup> Pig STM-WCE zum Einsatz. Dieser Test beruht auf der so genannten „Referenzstandard-Methode“, welche konkrete Aussagen über die Dynamik der Immunantwort nach Infektion ermöglichte. Die humorale Immunantwort im Verlauf einer Salmonelleninfektion setzt zeitlich verzögert ein und gestaltet sich zudem stark individuell. So konnte bereits mit einem „Mix-ELISA“ (LPS-ELISA-System) gezeigt werden, dass eine sehr hohe Variabilität bezüglich der Zeit bis zur Serokonversion vorlag, nämlich zwischen dem 6. bis 36. Tag nach Infektion mit *Salmonella* (NIELSEN et al. 1995). Ebenso wichtig ist, ob es sich um eine direkte Infektion oder um eine Kontaktinfektion handelte, da die Antikörperaktivitäten im ersteren Fall zeitlich eher erfassbar waren (GRAY et al. 1996).

Generell gilt die Antikörperantwort verglichen mit der CD4-T-Zellantwort bei der Begrenzung der Salmonelleninfektion als weniger bedeutend, jedoch erscheint sie für den Schutz bei einer erneuten Infektion wichtig (MITTRUCKER et al. 2000). Systemische Antikörper dienen zudem zur Beseitigung der Salmonellen aus dem Blut und führen zu einer gesteigerten Phagozytose (MASTROENI et al. 2001).

IgM wird als erste Immunglobulinklasse nach einer bakteriellen Infektion gebildet. Es weist zwar eine geringe Antigenbindungsstärke (Affinität) auf, die jedoch durch die pentamere Struktur des IgM-Moleküls (Avidität) erhöht wird (MADIGAN 2000). Der Wildtypstamm von *S. Typhimurium* DT104 sowie die beiden Deletionsmutanten führten bei den Schweinen zu einem Anstieg der Antikörperaktivität dieses Isotyps. Dabei konnten signifikante Unterschiede in der Stärke der Antikörperproduktion sowie eine zeitliche Verzögerung der Serokonversion zwischen Wildtyp- und Mutanten-Infektionsgruppen verzeichnet werden. Der Wildtypstamm führte bei den Tieren zu einer deutlich stärkeren und schneller einsetzenden Antikörperantwort (s. S. 64). Die insgesamt geringsten IgM-Antikörperaktivitäten zeigten die Tiere der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe.

IgA im Serum liegt als Monomer vor und wird vor allem bei einer akuten Salmonellose gebildet. Bei allen Infektionsgruppen fand eine Steigerung der Antikörperaktivität des Isotyps IgA statt, wobei die Tiere, welche den Wildtypstamm erhielten, zu einer deutlich höheren Antikörperbildung angeregt wurden. Hier führte jedoch die *invC::aphT*-Mutante zur geringsten Zunahme der IgA-Antikörperaktivität (s. S. 66).

IgG, ebenfalls ein Monomer mit zwei Antigenbindungsstellen, wird nach einem Antigenkontakt nach ca. 1-3 Wochen gebildet. Somit ist erklärbar, weshalb dieser Isotyp insbesondere für die sekundäre Immunantwort wichtig ist (MADIGAN 2000). Im gesamten Beobachtungszeitraum war ein geringfügiger Anstieg der Antikörperaktivität dieses Isotyps zu verzeichnen. Jedoch existierten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und Deletionsmutanten-Infektionsgruppen, die besonders deutlich beim Vergleich von den Wildtyp-Infektionstieren mit den *invC::aphT*-Infektionstieren ausgeprägt waren (s. S. 68). Allerdings ist der bereits am 3. Tag nach Infektion zu beobachtende und damit wesentlich früher als bei der Wildtypgruppe einsetzende Anstieg der Antikörperaktivität bei beiden Mutanten-Gruppen zu diskutieren. Dies kann auch auf einen bereits vor der Infektion erfolgten Antigenkontakt zurückzuführen sein, obwohl die Tiere vor Versuchsbeginn eindeutig bakteriologisch sowie serologisch negativ getestet wurden, wie auch das serologische Testergebnis am Tag der Infektion zeigt. Eine weitere Erklärung hierfür wäre aber auch der frühere Kontakt der eingesetzten Versuchstiere mit kreuzreagierenden Antigenen anderer Bakterienspezies, wie sie zum Beispiel bei Enterobacteriaceen häufig vorkommen. Diese primäre Antikörperantwort würde dann durch den Infektionsersuch stark geboostert worden sein, was auch den anschließenden schnellen Antikörperanstieg erklären würde.

Insgesamt waren beide Mutanten in der Potenz zur Stimulation der Antikörperbildung aller drei Isotypen dem Wildtypstamm unterlegen. Dies steht im engen Zusammenhang mit dem Ergebnis der deutlich geringeren Interleukin 4-Expressionsrate der Schweine beider Mutanten-Infektionsgruppen, da dieses Interleukin als Differenzierungszytokin fungiert, indem es zu einer Differenzierung von CD4-Zellen zu Th2-Zellen führt. Zusätzlich protegiert es die klonale Vermehrung und Antikörperproduktion der B-Zellen (JANEWAY u. TRAVERS 2002).

In einer Studie an Mäusen wurde gezeigt, dass B-Zellen und deren Antikörper bei einer Erst- oder Zweitinfektion mit attenuierten Salmonellen kaum von Bedeutung sind. Jedoch forcieren Antikörper die Heilung im Rahmen einer Zweitinfektion. Zudem

besteht eine Abhängigkeit zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern und einer Vakzine-induzierten Resistenz (MCSORLEY u. JENKINS 2000).

## 5.3 Untersuchungen zur zellulären Immunantwort

### 5.3.1 Etablierung der quantitativen Real-time PCR

Mit der Etablierung der quantitativen Real-time PCR wurde der Zytokinnachweis auf mRNA-Ebene gewählt. Allerdings liegt, aufgrund von post-transkriptionellen oder post-translationellen Einflüssen, nicht immer eine strenge Korrelation zwischen Zytokin-mRNA-Expression und Proteinmenge vor. Dies sollte bei der Analyse der Ergebnisse berücksichtigt werden (ROMAGNANI 2000). Generell ist jedoch der Zytokin-Genexpressionsnachweis dem Nachweis auf Protein-Ebene überlegen, da es sich bei Zytokinen um äußerst geringe Mengen mit einer kurzen Halbwertszeit handelt, die es nachzuweisen gilt. Wie im Kapitel 2.2.4 erläutert, existieren zahlreiche Quantifizierungsmethoden der Zytokin-mRNA, die jedoch arbeitsintensiver und häufig schwerer standardisierbar sind als die quantitative PCR (WHITESIDE 2002). Nicht nur aus diesen Gründen wurde das Verfahren der quantitativen Real-time PCR gewählt, sondern auch aufgrund seiner hohen Sensitivität. Des Weiteren handelt es sich hierbei um einen vollautomatisierten Prozess in einem geschlossenen System, in dem Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und Quantifizierung ablaufen. Damit ist diese Technik schneller und die Gefahr von Kontaminationen deutlich geringer.

Für quantitative Genexpressionsstudien ist es aufgrund unterschiedlicher Ausgangsmengen an RNA und der schwankenden Effektivität der Reversen Transkription nötig, ein konstant exprimiertes Referenzgen (Housekeeping-Gen) zusätzlich zu quantifizieren und die Expressionsrate des zu untersuchenden Gens zu der Expressionsrate des Housekeeping-Gens in Relation zu setzen (VANDESOMPELE et al. 2002). Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit die hochexprimierte Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gewählt.

Für jedes zu quantifizierende Zytokin (IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ ) und das Housekeeping-Gen wurden spezifische Oligonukleotid-Paare eingesetzt, welche, getestet mit dem Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese und der spezifischen Schmelzkurvenanalyse, keine Co-Amplifikate von unspezifischen PCR-Produkten aufwiesen. Des Weiteren konnte eine hohe Spezifität durch den Einsatz von TaqMan®-Sonden garantiert werden (STORDEUR et al. 2002).

Nach umfassender Optimierung der einzelnen Versuchsprotokolle konnte der zur Quantifizierung mittels Real-time PCR geforderte Effizienzwert zwischen 90 % bis

100 % der einzelnen Zytokin-Assays anhand der Steigungen der logarithmischen Verdünnungsreihen der jeweiligen Mengenstandards der Zytokine und GAPDH bestätigt werden. Obwohl die Standards und die eigentlichen Proben identische Ziel-DNA aufweisen, können dennoch Unterschiede in den PCR-Effizienzen auftreten. Als Ursachen hierfür sind unterschiedliche Zusammensetzung der aufgereinigten Standards und inhibitorische Substanzen in den Probelösungen zu diskutieren (KUHNE u. OSCHMANN 2002).

Aufgrund der kostenintensiven TaqMan®-Sonden wurde nach durchgeführter Konzentrationsoptimierung von Oligonukleotiden und Sonden eine Kombination gewählt, bei der die Sondenkonzentrationen so gering wie möglich, jedoch auf Kosten höherer Oligonukleotid-Konzentrationen gewählt wurden.

### 5.3.2 Vergleich der relativen Zytokin-Expression

Anhand der relativen Zytokin-Expression (IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ ), der so genannten Ratio, sollte die zelluläre Immunantwort im Verlauf einer *S.Typhimurium* DT104-Infektion beim Schwein näher untersucht werden. *Salmonella* ist ein fakultativ intrazellulärer Erreger, der im Gegensatz zu anderen intrazellulär parasitierenden Mikroorganismen die Fähigkeit besitzt, beide Arme des Immunsystems, den zellulären und den humoralen, zu aktivieren. Welche Mechanismen im Einzelnen daran ursächlich beteiligt sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Bekannt ist, dass Zellen des infizierten Gewebes mit Hilfe ihrer Toll-like-Rezeptoren (TLR) bakterielle Komponenten erkennen und daraufhin proinflammatorische Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1, IL-6 und IL-18 sekretieren. Durch das entzündungsbedingte Zytokinmilieu wird eine CD4-Th1-Antwort schon wenige Stunden nach Infektion stimuliert, die zur Eliminierung der Erreger und zu einem Schutz vor erneuter Infektion führt (MITTRUCKER u. KAUFMANN 2000). In dieser Arbeit wurde die Expression von Interleukin 2, Interleukin 4 und Interferon  $\gamma$  untersucht. Das immunmodulatorische Interferon  $\gamma$  verdient besonderes Interesse, da es aufgrund seiner Verstärkung der IL-12 Wirkung das Hauptzytokin der Th1-Zellen-Antwort ist (FARRAR u. SCHREIBER 1993; RODRIGUEZ-CARRENO et al. 2002). Als so genanntes „frühes“ IFN- $\gamma$  dient es vor allem zur Aktivierung antibakterieller Effektormechanismen der Makrophagen (siehe Kapitel 2.2.2). Um die Th1-Antwort weitergehend zu beurteilen, wurde Interleukin 2 in die Untersuchungen mit einbezogen. Da es als T-Zell-Wachstumsfaktor



fungiert, spielt es eine zentrale Rolle bei der Auslösung erworbener Immunreaktionen und ist essentiell für zelluläre Abwehrmechanismen gegen intrazelluläre Erreger (LUCHEY et al. 1996). Interleukin 4 wurde gewählt, weil es wie bereits erörtert als Differenzierungszytokin zu einer Th2-Antwort führt.

Durch die Ermittlung der relativen Zytokin-Expression von IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 in den jeweiligen Infektionsgruppen konnten weitere Erkenntnisse über die adaptive Immunität gewonnen und Rückschlüsse auf die Attenuierungen der Deletionsmutanten gezogen werden.

Die Vermutung der Reaktion unterschiedlicher Zytokin-Antworten auf die Infektion mit dem vollvirulenten Wildtypstamm und den *invC*- und *sseD*-Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* DT104 konnte im Rahmen dieser Arbeit bewiesen werden. Generell war bei den Schweinen der Wildtyp-Infektionsgruppe eine deutlich höhere Expressionsrate von IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  festzustellen. Auch die Expressionsdynamik aller untersuchten Zytokine im Verlauf der *Salmonella*-Infektion gestaltete sich in den drei Infektionsgruppen unterschiedlich. So kam es bei der Wildtypgruppe am 7. Tag nach Infektion stets zu einer Dezimierung der Zytokin-Ratio, welche jedoch anschließend rasant gesteigert wurde. Ebenso existierte kein einheitliches Muster der Zytokin-Antworten bei den beiden Mutanten-Infektionsgruppen. So verhielten sich die Schweine der *invC::aphT*-Infektionsgruppe bei der Dynamik der IFN- $\gamma$ -Expressionsrate identisch zu den Tieren der Wildtypgruppe. Jedoch führte diese Deletionsmutante zu einem weitaus geringeren Expressionsniveau. Dagegen kam es bei der Mutante mit Deletion des *sseD*-Gens nach einer anfänglichen Steigerung zu einer Suppression am 14. Tag nach Infektion. Die deutlich geringere Expressionsrate von IFN- $\gamma$  bei den Schweinen der *invC::aphT*-Infektionsgruppe im Vergleich zu den anderen Tieren, war vermutlich auf die durch die Attenuierung bedingten geringeren Zellschädigungen sowie die reduzierte Invasivität zurückzuführen. Studien zeigten, dass ein niedriger Level von IFN- $\gamma$  nach einer *Salmonella*-Infektion mit einem Mangel an Zellschäden korreliert (TREBICHAUSKY et al. 2003). Dagegen verhielt sich die Expressionsrate von IL-2 sowohl in Dynamik und Stärke in beiden Mutanten-Infektionsgruppen gleichartig. Nach anfänglicher Expressionssenkung konnte am 21. Tag nach Infektion eine Zunahme verzeichnet werden, welche das Ausgangsniveau jedoch nur geringfügig überschritt. Weiterhin zeigte sich, dass die *sseD::aphT*-Mutante eine deutlich stärkere IL-4-Antwort hervorrief, als die *invC::aphT*-Mutante, was ein weiterer Beleg für die deutlich schwächere Attenuierung dieser Mutante ist. Wie bei IL-2 kam es in dieser

Gruppe erst ab dem 21. Tag nach Infektion zu einer Expressionssteigerung. Dagegen war bei der *invC::aphT*-Mutantengruppe bereits in der ersten Woche nach Infektion eine Erhöhung der Expressionsrate feststellbar. Dieser folgte jedoch eine Senkung, die im Anschluß wieder in einer Erhöhung der IL-4-Expression mündete.

Zusammenfassend war ersichtlich, dass der vollvirulente Stamm erwartungsgemäß ein deutlich höheres Potential zur Stimulation der Zytokin-Antwort aufwies als die beiden untersuchten Mutanten mit Deletionen im Typ III-Sekretionssystem. Die geringsten Reaktionen zeigten die Schweine, welche als Infektionsstamm die *invC::aphT*-Deletionsmutante erhielten, was mutmaßlich auf deren Unfähigkeit zur Invasion zurückzuführen ist.

Letztendlich erwies sich die im Rahmen dieser Arbeit erstmals bei der Salmonelleninfektion des Schweins etablierte *ex vivo*-Zytokinexpressionsanalyse als sehr gut geeignet, Unterschiede in der Stimulation der zellulären sowie der humoralen Immunantwort zu untersuchen. Gleichwohl sollten in künftigen Versuchen, vor allem auch bei weniger stark expremierten Genen, zusätzlich Stimulationsassays mit Lymphozytenpräparationen durchgeführt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden *ex vivo*-Zytokinexpressionsanalyse betrachtend, muss die Wirkung von Zytokinen als Bestandteil eines großen Zytokin-Netzwerkes der angeborenen und erworbenen Immunität angesehen werden. So führt eine Antigenaktivierung direkt zur Transkription des Gens für das immunmodulatorische IFN- $\gamma$ , welche erhöht wird durch IL-2 und IL-12. Beide in ihrer Virulenz attenuierten Infektionsstämme wiesen evident niedrigere IL-2- und IFN- $\gamma$ -Expressionsraten auf. Aus diesem Grund würden Untersuchungen zur IL-12-Expressionsrate weitere aufschlussreiche Erkenntnisse liefern. Dieses Interleukin ist ebenfalls ein Differenzierungszytokin, das von dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet wird. Es stimuliert die „frühe“ IFN- $\gamma$ -Produktion. Bei einem IL-12-Mangel bildet sich eine dominierende Th2-Antwort aus, die einer Infektion mit intrazellulären Erregern nicht dementsprechend entgegenwirken kann (MAGRAM et al. 1996). Aber auch IL-18, das in engem Synergismus zu IL-12 steht und zuerst als IFN- $\gamma$  induzierender Faktor (Interferon-gamma inducing factor, IGIF) bezeichnet wurde, ist bedeutungsvoll und damit untersuchenswert (OKAMURA et al. 1995; MUNDER et al. 1998; MASTROENI 2002). Des Weiteren wurde in zahlreichen Studien das Verhalten des TNF- $\alpha$  näher beleuchtet, da dieses Zytokin ebenfalls eine wichtige Rolle in der Resistenz gegen bakterielle Infektionen spielt, indem es im Frühstadium einer Salmonelleninfektion zur Makrophagenaktivierung mit beiträgt (NAUCIEL u.

ESPINASSE-MAES 1992). Zudem wirkt es bei schädlichen Effekten mit, welche im septikämischen Schock münden (MCDERMOTT et al. 2000). So wurde gezeigt, dass verschiedene Faktoren, z.B. IL-2 und TNF- $\alpha$  durch *Salmonella*-Impfstämme freigesetzt werden und die Immunantwort des Wirtes feinregulieren (AL RAMADI et al. 2001).

#### 5.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte ein Virulenzverlust der beiden *invC*- und *sseD*-Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* DT104 im Schwein gezeigt werden. Dies wird damit am deutlichsten, dass keine klinische Symptomatik einer Salmonellose bei den Tieren der Mutanten-Infektionsgruppen feststellbar war, im Gegensatz zu den Tieren der Wildtyp-Infektionsgruppe, welche teilweise schwer erkrankten. Somit wurde die Bedeutung der Proteine *invC* und *sseD* des Typ III-Sekretionssystems von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium für die Salmonelleninfektion des Schweins sowie für die resultierende Immunantwort nachgewiesen.

Der Infektionsstamm mit Deletion des *invC*-Gens auf SPI 1, welcher durch *in vitro*-Studien bereits das Unvermögen zur Invasion in Wirtszellen vermuten ließ (GINOCCHIO et al. 1992), zeigte auch beim Schwein die geringste Organbesiedlung. Da demzufolge die zur Invasion nötigen Zytoskelettveränderungen ausblieben, kam es folglich zu stark reduzierten Zellschäden und damit auch zu einer deutlich geringeren IFN- $\gamma$ -Expression.

Bei der *sseD::aphT*-Deletionsmutante zeigten vorherige Arbeiten Replikationsdefekte, gesenkte Überlebenszeiten in Makrophagen sowie das Unvermögen, sich in Leber und Milz zu vermehren (HENSEL 2000). Durch bakteriologische Untersuchungen gelang jedoch beim Schwein die Isolierung von Salmonellen aus Leber- und Milzgewebe.

Im Vergleich zum vollvirulenten Stamm präsentierten sich sowohl die zelluläre wie die humorale Immunantwort in einer jedoch deutlich geringeren Ausprägung. Die niedrige IL-4 Expressionsrate korrelierte mit den geringeren Antikörperaktivitäten der Isotypen IgA, IgG und IgM, da dieses Interleukin eine Differenzierung von CD4-Zellen zu Th2-Zellen verursacht. Insgesamt war die *sseD*-Deletionsmutante jedoch deutlich virulenter als die Mutante mit Deletion des *invC*-Gens.

Eine erfolgreiche Immunantwort auf infektiöse Erreger ist abhängig von der Aktivierung der angemessenen Effektorfunktionen der T-Zell-Subpopulation (POWRIE u. COFFMAN 1993). Somit können gezielte Attenuierungen in Virulenzgenen,

---

regulatorischen Genen oder Stoffwechselgenen vollzogen werden, um unterschiedlich immunogene Impfstämme zu generieren (RAUPACH u. KAUFMANN 2001). Um eine ausreichende Immunogenität gegenüber *Salmonella* zu gewährleisten ist dabei eine breite Stimulation der Immunantwort unter Mitbeteiligung zellvermittelter Mechanismen notwendig. Deshalb erlangten Lebendimpfstoffe eine große Bedeutung bei der Immunprophylaxe der Salmonelleninfektion (SELBITZ 2002b). Erreger, die als Lebendimpfstoff eingesetzt werden sollen, müssen dabei bestimmte Bedingungen erfüllen. Dies sind vor allem eine exakte Unterscheidung des Impfstammes von Feldstämmen und eine genetische Stabilität. Des Weiteren sollten Kenntnisse über Ausscheidung und Persistenz des jeweiligen Impfstammes vorliegen (SPRINGER u. LINDNER 2005).

In dieser Arbeit konnten wichtige Pathogenitätsfaktoren von *S. Typhimurium* DT104 im Schwein bezüglich ihrer Invasivität, Persistenz, Ausscheidung und ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften näher charakterisiert werden. Dies könnte für die in dieser Arbeit untersuchten Deletionsmutanten einen substantiellen Schritt zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Salmonelleninfektion des Schweins bedeuten. In Folge müssten jedoch noch umfassende Untersuchungen zur Immunogenität der untersuchten Deletionsmutanten hinsichtlich Belastungsinfektion nach Impfung erfolgen.

## 6 Zusammenfassung

Steffi Brumme

Charakterisierung der Virulenzfaktoren *invC* und *sseD* des Typ III-Sekretionssystems von *Salmonella* Typhimurium DT104 mittels *ex vivo* Zytokin-Expression im experimentell infizierten Schwein.

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im November 2005

132 Seiten, 38 Abbildungen, 35 Tabellen, 207 Literaturstellen,

**Schlüsselworte:** *Salmonella* Typhimurium DT104, quantitative Real-time PCR, adaptive Immunität, Zytokine, relative Zytokin-Expressionsrate, Deletionsmutante, *invC*-Gen, *sseD*-Gen, Schwein, experimentelle Infektion

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, anhand von klinischen, kulturellen, serologischen sowie molekularbiologischen Parametern die Bedeutung der beiden Komponenten *invC* und *sseD* des Typ III-Sekretionssystems von *Salmonella* sowie die zellulären und humoralen Immunitätsmechanismen beim Schwein im Rahmen einer *Salmonella* Typhimurium DT104-Infektion zu untersuchen. Dabei kamen in einer experimentellen Infektion neben dem Wildtypstamm von *S.*Typhimurium DT104 zwei Mutanten dieses Stammes mit Deletionen des *invC*-Gens der SPI 1 sowie des *sseD*-Gens der SPI 2 zum Einsatz.

Da sich durch den quantitativen Nachweis der Zytokinproduktion Aussagen über stattfindende Immunprozesse treffen lassen, wurden in dieser Arbeit drei quantitative Real-time-PCR Assays als TaqMan™-Sonden-Experimente zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression für die Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ , welche bedeutende Regulatoren der adaptiven Immunantwort darstellen, etabliert.

Das zur Verfügung stehende typisierte Probenmaterial stammte aus drei Infektionsversuchen, die nach einem bereits etablierten Modell durchgeführt wurden. Die vergleichenden Untersuchungen jeder Infektionsgruppe umfassten zu Beginn die wichtigsten klinischen Parameter, die Salmonellen-Ausscheidungsrate in Faeces und den Verlauf der spezifischen Antikörperaktivitäten (IgA, IgG, IgM) in Blutseren. Die

Beurteilung der Kolonisierung, bzw. der intrazellulären Überlebens- und Replikationsrate in verschiedenen Organen und Geweben erfolgte anhand der qualitativen bakteriologischen Untersuchung von 15 Organproben der experimentell infizierten Schweine. Durch die relative Quantifizierung der Zytokin-Expression von IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  mittels Real-time-PCR wurde die adaptive Immunität, sowohl auf zellulärer Ebene wie auf humoraler Ebene, gegen den jeweiligen Infektionsstamm analysiert, um die Effekte der untersuchten Virulenzfaktoren auf diese Erreger-Wirt-Interaktionen darzustellen.

Die Infektionsversuche zeigten, dass nach oraler Verabreichung einer Infektionsdosis von  $1 \times 10^{11}$  KBE *S. Typhimurium* DT104 lediglich die Tiere der Wildtyp-Infektionsgruppe typische Symptome einer Salmonellose wie Anorexie, Erbrechen, vermindertes Allgemeinbefinden, Fieber und Diarrhoe präsentierten. Nach der Infektion schieden alle Schweine den jeweiligen Infektionsstamm über den gesamten Beobachtungszeitraum aus. Bei den Tieren der Wildtypgruppe handelte es sich dabei um kontinuierliche Ausscheider, dagegen stellte es sich bei den Probanden beider Mutanten-Gruppen als ein intermittierendes Geschehen dar.

Bei der bakteriologischen Untersuchung von insgesamt 315 Organproben lag bei den Schweinen der Wildtyp-Infektionsgruppe eine Besiedlungsrate von 68,3 %, bei der *sseD*-Deletionsmutantengruppe von 69,2 % und bei der *invC*-Deletionsmutantengruppe von 47,4 % vor. Somit konnte die Bedeutung des *invC*-Gens im Invasionsprozess gezeigt werden. Ebenso waren signifikante Unterschiede der spezifischen Antikörperaktivitäten zwischen den Infektionsgruppen zu verzeichnen. Generell führte der Wildtypstamm zu einer bedeutend höheren Antikörperaktivitätssteigerung im Serum. Gleichmaßen zeigten die Daten der relativen Zytokin-Expression von IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ , dass der Wildtypstamm bei diesen untersuchten Zytokine zu einer bedeutend höheren Expressionsrate führte.

Somit konnte die bereits im Mausmodell gezeigte verminderte Virulenz der *invC::aphT*- und *sseD::aphT*-Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* DT104 in der gewichtigeren Zielspezies Schwein bestätigt werden. Hierbei resultiert eine *invC*-Deletion mit ausbleibenden klinischen Symptomen und stark verminderten Kolonisationsraten in weitaus deutlicheren Attenuierungseffekten als eine *sseD*-Deletion, die zwar ebenso klinische Symptomlosigkeit und verminderte zelluläre und humorale Immunantwort hervorruft, jedoch prägnant höhere Kolonisationsraten aufweist.

## 7 Summary

Steffi Brumme

Characterisation of virulence factors *invC* and *sseD* from Typ III-secretion system of *Salmonella* Typhimurium DT104 with the *ex vivo* cytokine expression in experimentally infected pigs

Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Faculty of Veterinary Medicine

Submitted in November 2005

132 Pages, 38 Figures, 35 Tables, 207 References

**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium DT104, quantitative Real-time PCR, adaptive immunity, cytokine, relative cytokine expression rate, deletion mutant, *invC*-gene, *sseD*-gene, swine, experimental infection

*Salmonella* Typhimurium DT104 (*S. Tm*) is the most common non-host-adapted *Salmonella* serotype in pigs and the leading cause of food poisoning in man.

Current efforts to identify and remove pigs persistently infected with *Salmonella* have been impeded mainly through a lack information regarding the epidemiology, immunology, pathogenesis and host specificity of *Salmonella* infection.

The present study was initiated to gain information about the interaction between the host pig and *S. Tm* DT104 *in vivo*. We examined the impact of two virulence factors of the

type III-secretion system of *Salmonella* for their ability to influence the disease causing potency. Therefore, besides the wild type strain we used two deletion mutants of this strain in an experimental infection. The first mutant has a deletion of the *invC*-gene of the *Salmonella* pathogenicity island I and the second had a deletion of the *sseD*-gene of the *Salmonella* pathogenicity island II.

Twenty one 7-week-old male hybrid pigs were infected with  $10^{11}$  cfu of the respective bacterial strain. Each group was examined for clinical signs, shedding rate of *Salmonella* and the specific antibody-response (IgA, IgG and IgM) in serum. Intracellular survival and replication was estimated by qualitative determination of the colonisation rate. The analysis of the cross-talk between the humoral and cellular

immune system response was examined using the real time PCR as multiplex TaqMan™-experiments for IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$ . Within this study, we established these real time PCR.

This study revealed that the deletion mutants tested had a lower virulence for pigs, compared to the wild type. Only the pigs infected with the wild type strain of *S. Tm* DT104 showed typical clinical symptoms of salmonellosis, e.g. anorexia, vomiting, disturbed demeanour, fever and diarrhoea. All pigs shed *Salmonella* with the faeces during the observation period. However, the animals infected with the wild type strain were continuous shedders (100 %). In contrast, the pigs infected with the mutants were only intermittent shedders.

We could confirm a reduced invasion in pig which infected with the *invC::aphT* mutant, because the colonisation rate of inner organs was only in mean at 47,4 %. In contrast to the findings in pigs infected with the *sseD::aphT* mutant, which were in mean at 69,2 % and into the animals infected with the wild type strain which were in mean at 68,3 % colonized by *S. Tm* DT104. The reduced colonisation rate implicates the important role of the *invC*-gene in the process of invasion.

Furthermore the results of specific serum antibody measurement showed significant differences between both mutants and the wild type strain of *S. Tm* DT104 in the humoral immune response.

The pigs infected with wild type strain showed a markedly higher IgA and IgM antibody activity in the serum. Otherwise the results of the quantification of the m-RNA expression of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  showed that the wild type strain of *S. Tm* DT104 could induce an eminent higher expression of all three cytokines.

Therefore, this study indicates that the *invC::aphT*- and *sseD::aphT*-mutant of *S. Tm* DT104 have a lower virulence for pigs, compared to a mouse model shown before. Here the *invC*-deletion results in far clearly attenuated effects as the *sseD*-deletion mutant, because of the lack of clinical signs of salmonellosis and decimated colonisation rates. The *sseD*-deletion mutant results in a lack of clinical salmonellosis and a reduced cellular and humoral immunity too, but the colonisation rate of the tested tissue was eminently higher.

Thus studies on the mechanism of cytokine expression levels may contribute to better understanding of the host-pathogen interaction as well as the relevance of the virulence factors *invC* and *sseD* of type III secretion system of *Salmonella*.



## 8 Literaturverzeichnis

Abshire KZ, Neidhardt FC. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. *J Bacteriol.* 1993;175(12):3734-43.

Akeda Y, Galan JE. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol.* 2004;186(8):2402-12.

Al Ramadi BK, Al Dhaheri MH, Mustafa N, AbouHaidar M, Xu DM, Liew FY et al. Influence of vector-encoded cytokines on anti-*Salmonella* immunity: Divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity.* 2001;69(6):3980-8.

Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med.* 1994;179(2):601-8.

Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity.* 2003;71(11):6446-52.

Anonymus. Bakterielle Gastroenteritiden: Situationsbericht 2003. *Epidemiologisches Bulletin.* 2004;31.

Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines - Coordinators of Immune and Inflammatory Responses. *Annual Review of Biochemistry.* 1990;59:783-836.

Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 1997;412:149-58.

Bearson S, Bearson B, Foster JW. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;147(2):173-80.

Benjamin WH, Turnbough CL, Posey BS, Briles DE. The Ability of *Salmonella*-Typhimurium to Produce the Siderophore Enterobactin Is Not A Virulence Factor in Mouse Typhoid. *Infection and Immunity.* 1985;50(2):392-7.

Bernard PS, Wittwer CT. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem.* 2000;46(2):147-8.

Beuzon CR, Banks G, Deiwick J, Hensel M, Holden DW. pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 1999;33(4):806-16.

Bisping W, Amtsberg G. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Berlin, Hamburg: Paul Parey; 1988.

- Böhm R. Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 1993;(100):275-8.
- Bonnet G, Tyagi S, Libchaber A, Kramer FR. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6171-6.
- Bouwer HGA, Barry RA, Hinrichs DJ. Acquired immunity to an intracellular pathogen: immunologic recognition of L-monocytogenes-infected cells. Immunological Reviews. 1997;158:137-46.
- Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG. At least four percent of the Salmonella typhimurium genome is required for fatal infection of mice. Infect Immun. 1998;66(7):3372-7.
- Boyd EF, Hartl DL. Salmonella virulence plasmid: Modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in Salmonella enterica subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. Genetics. 1998;149(3):1183-90.
- Buchmeier NA, Lipps CJ, So MY, Heffron F. Recombination-deficient mutants of Salmonella typhimurium are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. Mol Microbiol. 1993;7(6):933-6.
- Burns-Keliher L, Nickerson CA, Morrow BJ, Curtiss R, III. Cell-specific proteins synthesized by Salmonella typhimurium. Infect Immun. 1998;66(2):856-61.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 2000;25(2):169-93.
- Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, Poiesz BJ. Detection of Hiv-1 Rna Sequences by Invitro Dna Amplification. Nucleic Acids Research. 1988;16(9):4165.
- Caron GA, Sarkany I, Williams HS, Todd AP, Gell HMC. Radioactive Method for Measurement of Lymphocyte Transformation in Vitro. Lancet. 1965;2(7425):1266-&.
- Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. J Exp Med. 2002;195(9):1155-66.
- Ciacci-Woolwine F, Blomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. Infection and Immunity. 1998;66(3):1127-34.
- Clarke RC, Gyles CL. Salmonella. In: Gyles CL, Thoen CO, (Hrsg.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Ames: Iowa State University Press; 1993.
- Cobbold S. T cell subsets.  
<http://users.path.ox.ac.uk/~scobbold/Teaching/TSUBSETS.pdf> . 2000.
- Czerkinsky C, Moldoveanu Z, Mestecky J, Nilsson LA, Ouchterlony O. A Novel 2 Color Elispot Assay .1. Simultaneous Detection of Distinct Types of Antibody-Secreting Cells. Journal of Immunological Methods. 1988;115(1):31-7.

- Dedie K, Bockemühl J, Kühn H, Volkmer K-J, Weinke T. Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Stuttgart: Enke Verlag; 1993.
- Dinjus U, Hanel I, Rabsch W, Helmuth R. Studies of the presence of the virulence factors, adhesion, invasion, intracellular multiplication and toxin formation in salmonellas of different origin. *Zentralbl Bakteriol.* 1998;287(4):387-98.
- Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect.* 2001;3(14-15):1191-200.
- Eichelberg K, Ginocchio CC, Galan JE. Molecular and functional characterization of the Salmonella typhimurium invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the FOF1 ATPase family of proteins. *J Bacteriol.* 1994;176(15):4501-10.
- Emoto M, Emoto Y, Kaufmann SHE. IL-4 Producing Cd4(+) Tcr-Alpha-Beta(Int) Liver Lymphocytes - Influence of Thymus, Beta(2)-Microglobulin and Nk1.1 Expression. *International Immunology.* 1995;7(11):1729-39.
- Everest P, Allen J, Papakonstantinopoulou A, Mastroeni P, Roberts M, Dougan G. Salmonella typhimurium infections in mice deficient in interleukin-4 production - Role of IL-4 in infection-associated pathology. *Journal of Immunology.* 1997;159(4):1820-7.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:571-611.
- Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods.* 1997;204(1):57-66.
- Fedoraka-Cray PJ. Mechanism of host-agent interactions in subclinical Salmonella infection in pig herds. 2nd Int Symp on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork, Copenhagen. 1997;9-18.
- Fedoraka-Cray PJ, Gray JT, Wray C. Salmonella infections in Pigs. In: Wray C., Wray A., (Hrsg.). *Salmonella in domestic animals.* New York: CABI Publishing; 2000: 191-208.
- Felix A., Callow B.R. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *British Medical Journal.* 1943;127-30.
- Ferre F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl.* 1992;2(1):1-9.
- Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F. Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(14):5189-93.
- Foster JW. The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol.* 1993;175(7):1981-7.
- Francis KP, Taylor PD, Inchley CJ, Gallagher MP. Identification of the *ahp* operon of Salmonella typhimurium as a macrophage-induced locus. *J Bacteriol.* 1997;179(12):4046-8.

- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26(1):112-5.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid Production of Full-Length Cdnas from Rare Transcripts - Amplification Using A Single Gene-Specific Oligonucleotide Primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(23):8998-9002.
- Frost AJ, Bland AP, Wallis TS. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol*. 1997;34(5):369-86.
- Galan JE. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2(1):46-50.
- Galan JE, Bliska JB. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996;12:221-55.
- Galan JE, Curtiss R. Cloning and Molecular Characterization of Genes Whose Products Allow *Salmonella-Typhimurium* to Penetrate Tissue-Culture Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(16):6383-7.
- Galan JE, Zhou D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):8754-61.
- Gallois A, Klein JR, Allen LA, Jones BD, Nauseef WM. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J Immunol*. 2001;166(9):5741-8.
- Gareis M. *Salmonellae* - A Survey. *Fleischwirtschaft*. 1995a;75(8):954-7.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996b;6(10):995-1001.
- Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2725-9.
- Ginocchio C, Pace J, Galan JE. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(13):5976-80.
- Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL, Galan JE. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell*. 1994;76(4):717-24.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001c;25(4):386-401.
- Gray JT, Fedorkacray PJ, Stabel TJ, Ackerman MR. Influence of Inoculation Route on the Carrier State of *Salmonella-Choleraesuis* in Swine. *Veterinary Microbiology*. 1995;47(1-2):43-59.

- Gray JT, FedorkaCray PJ, Stabel TJ, Kramer TT. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(1):141-6.
- Grimont PAD, Grimont F, Bouvet P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C, W, r, a, y, et al., (Hrsg.). *Salmonella in domestic animals*. New York: CABI Publishing; 2000: 1-17.
- Groisman EA. How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol*. 1994;2(11):444-9.
- Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;124(1):1-9.
- Gulig PA, Caldwell AL, Chiodo VA. Identification, genetic analysis and DNA sequence of a 7.8-kb virulence region of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid. *Mol Microbiol*. 1992;6(10):1395-411.
- Guy RL, Gonias LA, Stein MA. Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the *fms-aroE* intragenic region. *Mol Microbiol*. 2000;37(6):1417-35.
- Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R et al. Deletions of Chromosomal Regions Coding for Fimbriae and Hemolysins Occur In vitro and In vivo in Various Extraintestinal *Escherichia-Coli* Isolates. *Microbial Pathogenesis*. 1990;8(3):213-25.
- Hacker J, BlumOehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*. 1997;23(6):1089-97.
- Hartung M. Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1998. *bgVV Hefte*. 1999;9.
- Heesemann J, Heinz D, Rüssmann H, Wehland J, Goebel W, Kuhn M. Lektionen aus der Bakterienwelt: Wie Krankheitserreger Wirtszellprozesse ausnutzen. *BIOspektrum*. 2003;Special-Heft: Postgenomics-vom Molekül zur Funktion:486-9.
- Heesemann J, Hensel M. Infektionsmodelle, Yersinien, Salmonellen, Shigellen und Listerien. In: Heesemann J, Hacker J, (Hrsg.). *Molekulare Infektionsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag; 2000: 220-222.
- Heffernan EJ, Harwood J, Fierer J, Guiney D. The *Salmonella typhimurium* virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J Bacteriol*. 1992;174(1):84-91.
- Helmuth R., Guerra B., Malorny B., Miko A., Schroeter A. Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E.coli*- Isolaten vom Tier, aus Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Dritter Zwischenbericht des Forschungsprojektes vom 11 Februar 2003. 2003.
- Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: A novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological Reviews*. 1996;60(2):316-&.

- Hensel M. Salmonella pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2000a;36(5):1015-23.
- Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of Salmonella pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology.* 1999;31(2):489-98.
- Henzler DJ, Opitz HM. The role of mice in the epizootiology of Salmonella enteritidis infection on chicken layer farms. *Avian Dis.* 1992;36(3):625-31.
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2396-401.
- Hessner MJ, Luhm RA, Pearson SL, Endean DJ, Friedman KD, Montgomery RR. Prevalence of prothrombin G20210A, factor V G1691A (Leiden), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T in seven different populations determined by multiplex allele-specific PCR. *Thromb Haemost.* 1999;81(5):733-8.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-7.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993;11(9):1026-30.
- Himmeler A, Hauptmann R, Adolf GR, Swetly P. Molecular-Cloning and Expression in Escherichia-Coli of Equine Type-I Interferons. *Dna-A Journal of Molecular & Cellular Biology.* 1986;5(5):345-56.
- Hof H, Dörries R, Müller RL. *Mikrobiologie.* Stuttgart: 2000.
- Holden DW. Trafficking of the Salmonella vacuole in macrophages. *Traffic.* 2002;3(3):161-9.
- Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(2):379-433.
- Hutchinson F. Mutagenesis. In: American Society for Microbiology (ASM) Press, (Hrsg.). *Escherichia coli and Salmonella-Cellular and Molecular Biology.* Neidhardt F.C, R. Curtis III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger; 1996: 2339-2362.
- Hutchinson F, Donnellan JE. A general database for DNA sequence changes induced by mutagenesis of several bacterial and mammalian genes. *Nucleic Acids Research.* 1996;24(1):172-6.
- Janeway CA, Travers P. *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease (Immunologie).* 2. Auflage. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 1997.
- Janeway CA, Travers P. *Immunologie.* 5. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002a.

- Jones BD, Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:533-61.
- Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity. *Infect Immun.* 1989;57(2):609-15.
- Kaufmann SHE. Immunität gegen intrazelluläre Bakterien. Die gelben Hefte. 1997;37:97-113.
- Kelterborn E. Salmonella-Species. Leipzig: S.Hirzel Verlag; 1967.
- Klein JR, Jones BD. Salmonella pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect Immun.* 2001;69(2):737-43.
- Krause G. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2001. Berlin: RKI; 2001.
- Krauss H, Weber A, Enders B, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H. Zoonosen. 2. Auflage. Köln: 1997.
- Krüger M. Allgemeine Bakteriologie. In: Mayr A., (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 377-415.
- Kuhne BS, Oschmann P. Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques.* 2002;33(5):1078-+.
- Lalmanach AC, Lantier F. Host cytokine response and resistance to Salmonella infection. *Microbes and Infection.* 1999;1(9):719-26.
- LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens. *Science.* 1996;274(5290):1208-11.
- Lee IS, Lin J, Hall HK, Bearson B, Foster JW. The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol.* 1995;17(1):155-67.
- Lee IS, Slonczewski JL, Foster JW. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol.* 1994;176(5):1422-6.
- Libby SJ, Adams LG, Ficht TA, Allen C, Whitford HA, Buchmeier NA et al. The spv genes on the Salmonella dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect Immun.* 1997;65(5):1786-92.
- Libby SJ, Goebel W, Ludwig A, Buchmeier N, Bowe F, Fang FC et al. A cytolysin encoded by Salmonella is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2):489-93.
- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, Guiney DG. The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology.* 2000;2(1):49-58.

- Liesegang A, Prager R, Streckel W, Rabsch W, Gericke B, Seltmann G. Wird der Salmonella-Enterica-Stamm DT104 des Serovars Typhimurium der neue führende Epidemietyp in Deutschland? [1/97], 6-10. 1997. Robert Koch Institut.
- Lim WS, Edwards JF, Boyd NK, Payne SL, Ball JM. Simultaneous quantitation of equine cytokine mRNAs using a multi-probe ribonuclease protection assay. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91(1):45-51.
- Lindgren SW, Heffron F. To sting or be stung: bacteria-induced apoptosis. *Trends Microbiol.* 1997;5(7):263-4.
- Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(9):4197-201.
- Lindner T, Springer S, Steinbach G, Geyer E, Selbitz HJ. Immunoprophylaxis - a contribution to control Salmonella Typhimurium-infection in pigs. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere.* 2002;30(6):392-4.
- Liu Y, Kleine HD, Engel H, Andreeff M. Cytokine expression of T cells in chronic myeloid leukemia. *Chin Med J (Engl ).* 2000;113(3):232-5.
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 1996;9(4):532-&.
- Madigan MT. *Brock Mikrobiologie.* 1. Auflage. Berlin: Goebel,W.; 2000a.
- Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J et al. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 1996;4(5):471-81.
- Marg H, Scholz HC, Arnold T, Rosler U, Hensel A. Influence of long-time transportation stress on re-activation of Salmonella typhimurium DT104 in experimentally infected pigs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001;114(9-10):385-8.
- Martell M, Gomez J, Esteban JI, Sauleda S, Quer J, Cabot B et al. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* 1999;37(2):327-32.
- Martin G. Eigenschaften von Salmonellen und ihre Beziehung zur Stimulierung von Immunreaktionen. *Mh Vet Med.* 1992;47:632-6.
- Mastroeni P. Immunity to systemic Salmonella infections. *Curr Mol Med.* 2002;2(4):393-406.
- Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. Salmonella: immune responses and vaccines. *Vet J.* 2001;161(2):132-64.
- Mayr A. Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. In: Mayr A., (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Stuttgart: Enke Verlag; 2002: 1-62.



- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 2001;413(6858):852-6.
- McDermott PF, Ciacci-Woolwine F, Snipes JA, Mizel SB. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface polypeptide results in human monocyte activation. *Infection and Immunity*. 2000;68(10):5525-9.
- McSorley SJ, Jenkins MK. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*. 2000;68(6):3344-8.
- Mitov I, Denchev V, Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of *Salmonella typhimurium*: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine*. 1992;10(1):61-6.
- Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol*. 2000;67(4):457-63.
- Mittrucker HW, Raupach B, Kohler A, Kaufmann SH. Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol*. 2000;164(4):1648-52.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998;24(6):954-8, 960, 962.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL. Th1-Cell and Th2-Cell - Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional-Properties. *Annual Review of Immunology*. 1989;7:145-73.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;187(12):2103-8.
- Nauciel C, Espinasse-Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun*. 1992;60(2):450-4.

- Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P. The serological response to *Salmonella* serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet Microbiol.* 1995;47(3-4):205-18.
- Nikolaus T, Deiwick J, Rappl C, Freeman JA, Schroder W, Miller SI et al. SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol.* 2001;183(20):6036-45.
- Nuntaprasert A, Mori Y, Fujita K, Yoneda M, Miura R, Tsukiyama-Kohara K et al. Expression and purification of recombinant swine interleukin-4. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* 2005;28(1):17-35.
- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T et al. Cloning of A New Cytokine That Induces Ifn-Gamma Production by T-Cells. *Nature.* 1995;378(6552):88-91.
- Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med.* 1998;36(5):255-69.
- Osawa J. [IL-2 responsiveness in antigen-specific lymphocyte proliferation test with sulfhydryl drug-sensitized murine lymphocytes--using rapid fluorochromasia assay]. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi.* 1990;100(12):1235-40.
- Pang T, Levine MM, Ivanoff B, Wain J, Finlay BB. *Trends Microbiology.* 6. Auflage. 1998.
- Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3014-20.
- Pascopella L, Raupach B, Ghori N, Monack D, Falkow S, Small PLC. Host Restriction Phenotypes of *Salmonella*-Typhi and *Salmonella*-Gallinarum. *Infection and Immunity.* 1995;63(11):4329-35.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:727-77.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum.* 2004;1:92-5.
- Pietzsch O. *Salmonella.* In: Blobel H, Schliesser T, (Hrsg.). *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.* Jena: VEB Fischer Verlag; 1981.
- Plitnick LM, Loveless SE, Ladics GS, Holsapple MP, Selgrade MJ, Sailstad DM et al. Cytokine profiling for chemical sensitizers: application of the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;179(3):145-54.

- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 2004;155(7):568-70.
- Popoff MY, Miras I, Coynault C, Lasselin C, Pardon P. Molecular relationships between virulence plasmids of Salmonella serotypes typhimurium and dublin and large plasmids of other Salmonella serotypes. *Ann Microbiol (Paris)*. 1984;135A(3):389-98.
- Powrie F, Coffman RL. Cytokine Regulation of T-Cell Function - Potential for Therapeutic Intervention. *Immunology Today*. 1993;14(6):270-4.
- Prasad R, Chopra AK, Chary P, Peterson JW. Expression and characterization of the cloned Salmonella typhimurium enterotoxin. *Microb Pathog*. 1992;13(2):109-21.
- Occurrence of Salmonella Typhimurium in German slaughter pigs. 4. Wltkongress Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen, Berlin, 7.-12. Juni 1998; 1998.
- Rasch G, Schrader C. Infektionen mit Zoonoseerregern beim Menschen. Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonose-Infektionen nach der Zoonose-RL (92/117/EWG) für 1997. 1996: 5-9.
- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K., (Hrsg.). *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Heidelberg: Springer Press; 2001.
- Rathman M, Barker LP, Falkow S. The unique trafficking pattern of Salmonella typhimurium-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun*. 1997;65(4):1475-85.
- Raupach B, Kaufmann SH. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate Salmonella vaccine strain? *Microbes Infect*. 2001;3(14-15):1261-9.
- Recchia GD, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 1995;141 ( Pt 12):3015-27.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 1997;245(2):154-60.
- Rocourt J, Moy G, Vierk k, Schlundt J. The present state of foodborne disease in OECD countries. WHO, (Hrsg.). 1-43. 2003.
- Rodriguez-Carreno MP, Lopez-Fuertes L, Revilla C, Ezquerro A, Alonso F, Dominguez J. Phenotypic characterization of porcine IFN-gamma-producing lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2002;259(1-2):171-9.
- Rolle M, Mayr A. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten*. 6. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 1993.
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy Asthma & Immunology*. 2000;85(1):9-18.

- Roudier C, Fierer J, Guiney DG. Characterization of translation termination mutations in the *spv* operon of the *Salmonella* virulence plasmid pSDL2. *J Bacteriol.* 1992;174(20):6418-23.
- Ruiz J, Capitano L, Nunez L, Castro D, Sierra JM, Hatha M et al. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1999;43(5):699-702.
- Saalmuller A, Werner T, Fachinger V. T-helper cells from naive to committed. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002;87(3-4):137-45.
- Sander J. [Pathogenesis of salmonella infections in humans]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1993;100(7):283-5.
- Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SH. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol.* 1999;71:267-377.
- Schwan WR, Kopecko DJ. Serovar specific differences in *Salmonella* survival within macrophage cells. *Adv Exp Med Biol.* 1997;412:277-8.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Destgroth BF. The Presence of Interleukin-4 During *In vitro* Priming Determines the Lymphokine-Producing Potential of Cd4+ T-Cells from T-Cell Receptor Transgenic Mice. *Journal of Experimental Medicine.* 1992;176(4):1091-8.
- Selbitz HJ. *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie.* Jena-Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1992.
- Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Mayer A, (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Stuttgart: Enke Verlag; 2002a: 417-588.
- Selbitz HJ. Zur Immunprophylaxe von Salmonelleninfektionen des Schweines. *Zoonosen des Schweines 21.* Jenaer Symposium. 2002b.
- Selbitz HJ, Bisping W. *Tierseuchen und Zoonosen-Alte und neue Herausforderungen.* Jena, Stuttgart: Fischer Verlag; 1995.
- Selbitz HJ, Sinell A.M., Sziegeleit A. *Das Salmonellen-Problem.* Stuttgart: Verlag Gustav Fischer Jena; 1995.
- Shea JE, Beuzon CR, Gleeson C, Mundy R, Holden DW. Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect Immun.* 1999;67(1):213-9.
- Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1999;1432(2):159-84.
- Splichal I, Trebichavsky I, Muneta Y, Mori Y. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Veterinary Research.* 2002;33(3):291-7.

- Spratt BG, Rowbury RJ, Meynell GG. Plasmid of Salmonella-Typhimurium Lt2. *Molecular & General Genetics*. 1973;121(4):347-53.
- Springer S, Lindner ThSHJ. Die Sicherheit von Salmonella Lebendimpfstoffen aus diagnostischer Sicht. 24. Arbeits- und Fortbildungstagung des AVID. 2005.
- Stasny BR, De GS, Rompato G, Garmendia AE. Functional characterization of a swine CD4(+)/CD8(+) double positive lymphoblastoid T-cell line with a CD25(+)/CD45RA(-) phenotype generated in vitro with interleukin-2. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;78(1):57-70.
- Steinbach G, Hartung M. An attempt to estimate the share of human cases of salmonellosis attributable to Salmonella originating from swine. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*. 1999;112(8):296-300.
- Stordeur P, Poulin LF, Craciun L, Zhou L, Schandene L, de Lavareille A et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*. 2002;259(1-2):55-64.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*. 2005;11(8):1131-40.
- Tanguay S, Killion JJ. Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994;13(4):259-63.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 1999;75(2-3):291-5.
- Tinge SA, Curtiss R, III. Isolation of the replication and partitioning regions of the Salmonella typhimurium virulence plasmid and stabilization of heterologous replicons. *J Bacteriol*. 1990;172(9):5266-77.
- Trebichavsky I, Splichal I, Splichalova A, Muneta Y, Mori Y. Systemic and local cytokine response of young piglets to oral infection with Salmonella enterica serotype Typhimurium. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003;48(3):403-7.
- Trebichavsky I, Zidek Z, Frankova D, Zahradnickova M, Splichal I. Nitric oxide metabolites in gnotobiotic piglets orally infected with Salmonella enterica serovar typhimurium. *Folia Microbiologica*. 2001;46(4):353-8.
- Valdivia RH, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science*. 1997;277(5334):2007-11.
- Valone SE, Chikami GK, Miller VL. Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B, and -C) from native plasmid pSDL2 of Salmonella dublin. *Infect Immun*. 1993;61(2):705-13.
- van der Velden AW, Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of Salmonella typhimurium in mice. *Infect Immun*. 1998;66(6):2803-8.

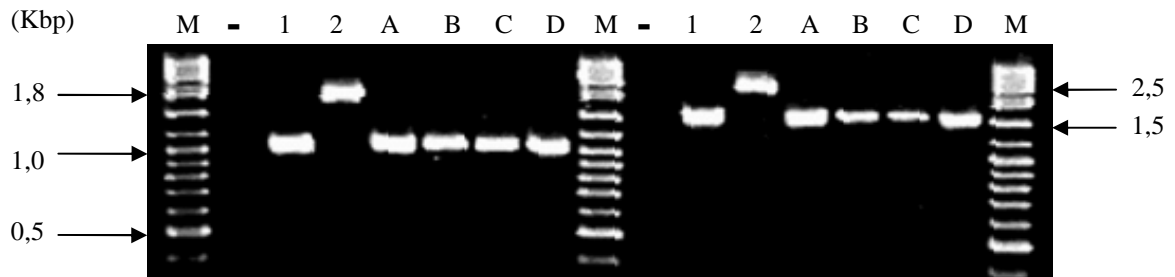
- Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002b;3(7): 95-8
- Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC et al. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science.* 2000;287(5458):1655-8.
- Venkatesan MM, Buysse JM, Oaks EV. Surface presentation of Shigella flexneri invasion plasmid antigens requires the products of the spa locus. *J Bacteriol.* 1992;174(6):1990-2001.
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal Salmonella infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 2004;38 Suppl 3:S127-S134.
- von Altrock A, Schutte A, Hildebrandt G. [Results of the German investigation in the EU Project "Salmonella in Pork (Salinork)"--2. Investigations in a slaughterhouse]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2000;113(6):225-33.
- Waldmann K-H, Plonait H. Erkrankungen der Verdauungsorgane und des Abdomens. In: Plonait H., Bickhardt K., (Hrsg.). *Lehrbuch der Schweinekrankheiten.* Berlin: Parey Buchverlag; 1997: 307-384.
- Waterfall CM, Eisenthal R, Cobb BD. Kinetic characterisation of primer mismatches in allele-specific PCR: a quantitative assessment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(5):715-22.
- Whiteside TL. Cytokine assays. *Biotechniques.* 2002;4- :21-7.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P, Cornelis GR. YscN, the Putative Energizer of the Yersinia Yop Secretion Machinery. *Journal of Bacteriology.* 1994;176(6):1561-9.
- Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of persistent Salmonella typhimurium infection in internal organs of swine. *Am J Vet Res.* 1989a;50(7):1015-21.
- Wood RL, Pospischil A, Rose R. Distribution of Persistent Salmonella-Typhimurium Infection in Internal Organs of Swine. *American Journal of Veterinary Research.* 1989b;50(7):1015-21.
- Zamorano PL, Mahesh VB, Brann DW. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. *Neuroendocrinology.* 1996;63(5):397-407.
- Zastrow KD, Schoneberg I. [Outbreaks of food-borne infections and microbe-induced poisonings in West Germany 1991]. *Gesundheitswesen.* 1993;55(5):250-3.
- Zelus D, Robinson-Rechavi M, Delacre M, Auriault C, Laudet V. Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in ruminants. *Journal of Molecular Evolution.* 2000;51(3):234-44.
- Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA. Vaccination for control of Salmonella in poultry. *Vaccine.* 1999;17(20-21):2538-45.

Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology*. 1996;87(3):500-12.

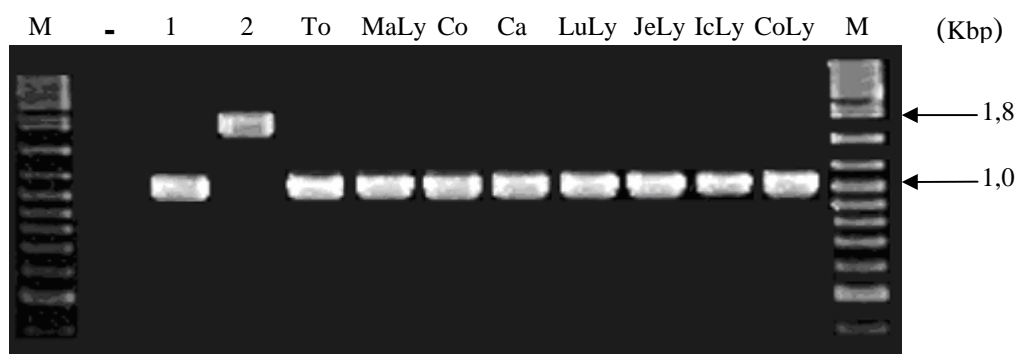
Zurawski DV, Stein MA. The SPI2-encoded SseA chaperone has discrete domains required for SseB stabilization and export, and binds within the C-terminus of SseB and SseD. *Microbiology*. 2004;150(Pt 7):2055-68.

## Anhang

## I Abbildungen

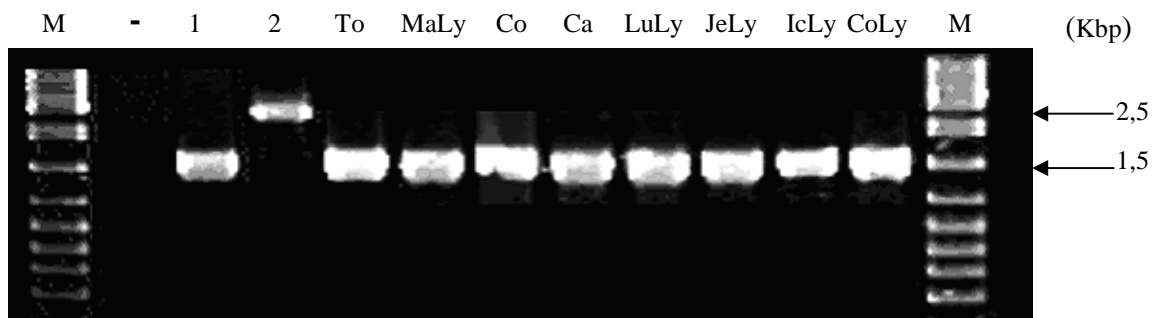


**Abbildung 25. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 in Kotproben von infizierten Hybridschweinen.** M, Marker (Leiter-Mix); -, Negativkontrolle; 1, Positivkontrolle Wildtyp mit *sseD*-Oligonukleotiden (1,0 kbp) und mit *invC*-Oligonukleotiden (1,5 kbp) amplifiziert; 2, Positivkontrolle *sseD*-Mutante (1,8 kbp) und *invC*-Mutante (2,5 kbp); A, B, C und D Kotproben der vier infizierten Hybridschweine.

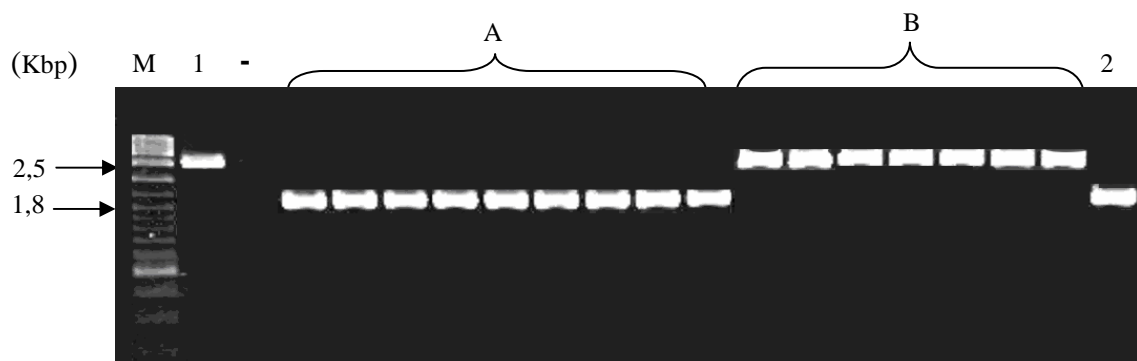


**Abbildung 25. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 in Organproben von einem infizierten Hybridschwein.** M, Marker; -, Negativkontrolle; 1, Positivkontrolle Wildtyp mit *sseD*-Oligonukleotiden (1,0 kbp) amplifiziert; 2, Positivkontrolle *sseD*-Mutante (1,8 kbp); To, Tonsille; MaLy, Mandibularlymphknoten; Co, Colon; Ca, Caecum; LuLy, Lungenlymphknoten; JeLy, Jejunallymphknoten; IcLy, Ileocaecallymphknoten; CoLy, Colonlymphknoten.

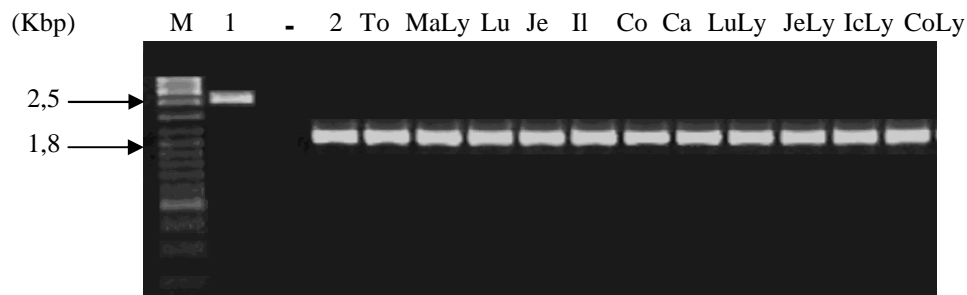




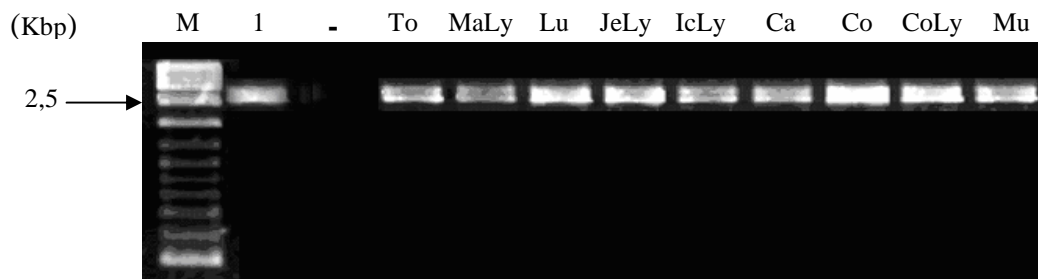
**Abbildung 26. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 in Organproben von einem infizierten Hybridschwein.** M, Marker; -, Negativkontrolle; 1, Positivkontrolle Wildtyp mit mit *invC*-Oligonukleotiden (1,5 kbp) amplifiziert; 2, Positivkontrolle *invC*-Mutante (2,5 kbp); To, Tonsille; MaLy, Mandibularlymphknoten; Co, Colon; Ca, Caecum; LuLy, Lungenlymphknoten; JeLy, Jejunallymphknoten; IcLy, Ileocaecallymphknoten; CoLy, Colonlymphknoten.



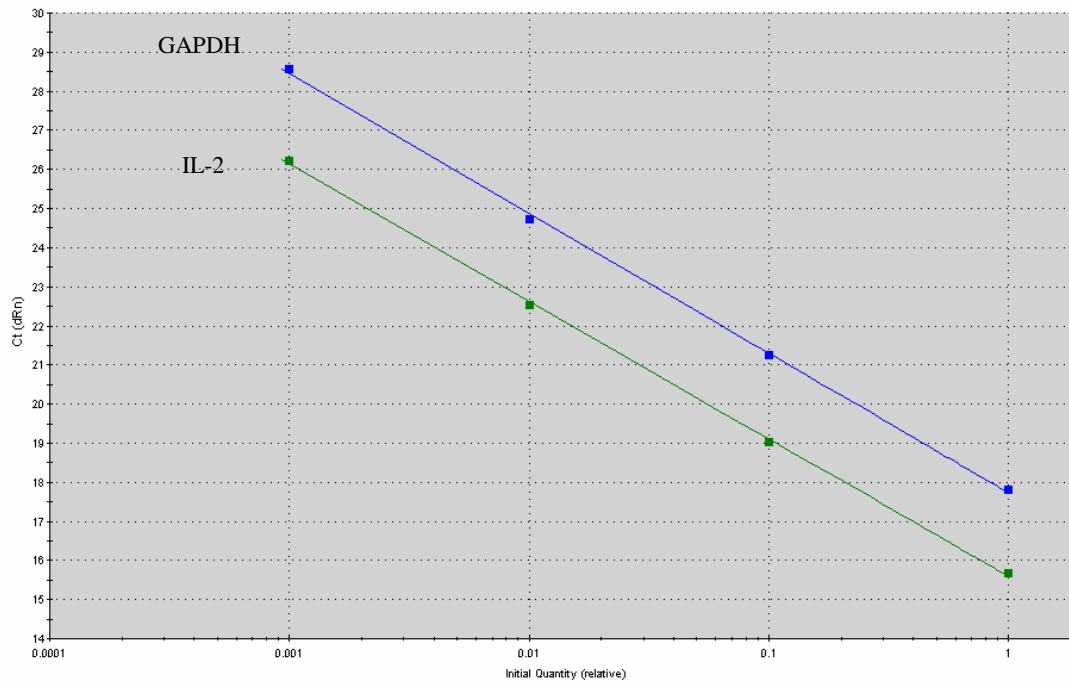
**Abbildung 27. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-*invC::aphT* und -*sseD::aphT* im Kot von infizierten Hybridschweinen.** M, Marker (Sizer V); -, Negativkontrolle; 1, Positivkontrolle von *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT*; 2, Positivkontrolle von *S. Typhimurium* DT104 *sseD::aphT*; A, Kotproben der *sseD*-Deletionsmutanten-Infektionsgruppe; B, Kotproben der *invC*-Deletionsmutanten-Infektionsgruppe.



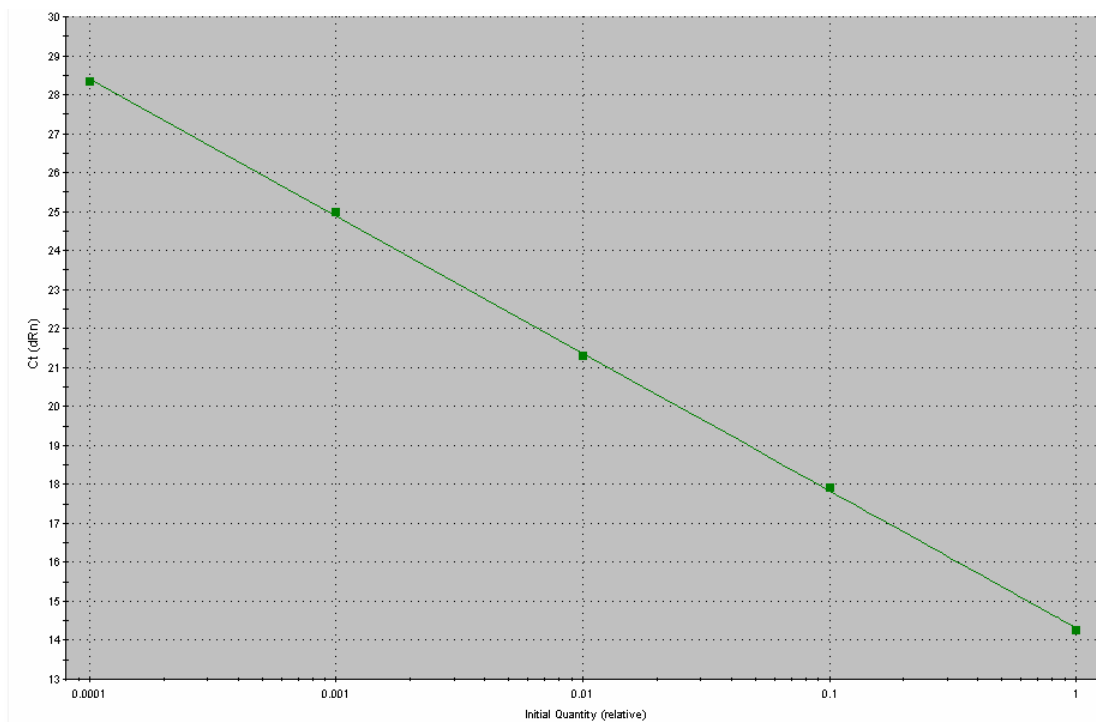
**Abbildung 28. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 *sseD::aphT* in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen.** M, Marker (Sizer V); -, Negativkontrolle; Positivkontrolle von *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT*; 2, Positivkontrolle von *S. Typhimurium* DT104 *sseD::aphT*; To, Tonsille; MaLy, Mandibularlymphknoten; Lu, Lunge; Je, Jejunum; IL, Ileum; Co, Colon; Ca, Caecum; LuLy, Lungenlymphknoten; JeLy, Jejunallymphknoten; IcLy, Ileozökallymphknoten; CoLy, Colonlymphknoten.



**Abbildung 29. Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT* in ausgewählten Gewebeproben von infizierten Hybridschweinen.** M, Marker (Sizer V); -, Negativkontrolle; Positivkontrolle von *S. Typhimurium* DT104 *invC::aphT*; To, Tonsille; MaLy, Mandibularlymphknoten; Lu, Lunge; JeLy, Jejunallymphknoten; Co, Colon; Ca, Caecum; IcLy, Ileozökallymphknoten; CoLy, Colonlymphknoten; Mu, Muskulatur.



**Abbildung 30. Effizienzbestimmung von Interleukin 2 und GAPDH.** Die Effizienz für IL-2 beträgt 92,4 % und für GAPDH 90,3 %.



**Abbildung 31. Effizienzbestimmung für Interleukin 4.** Die Effizienz hat einen Wert von 92,3 %.

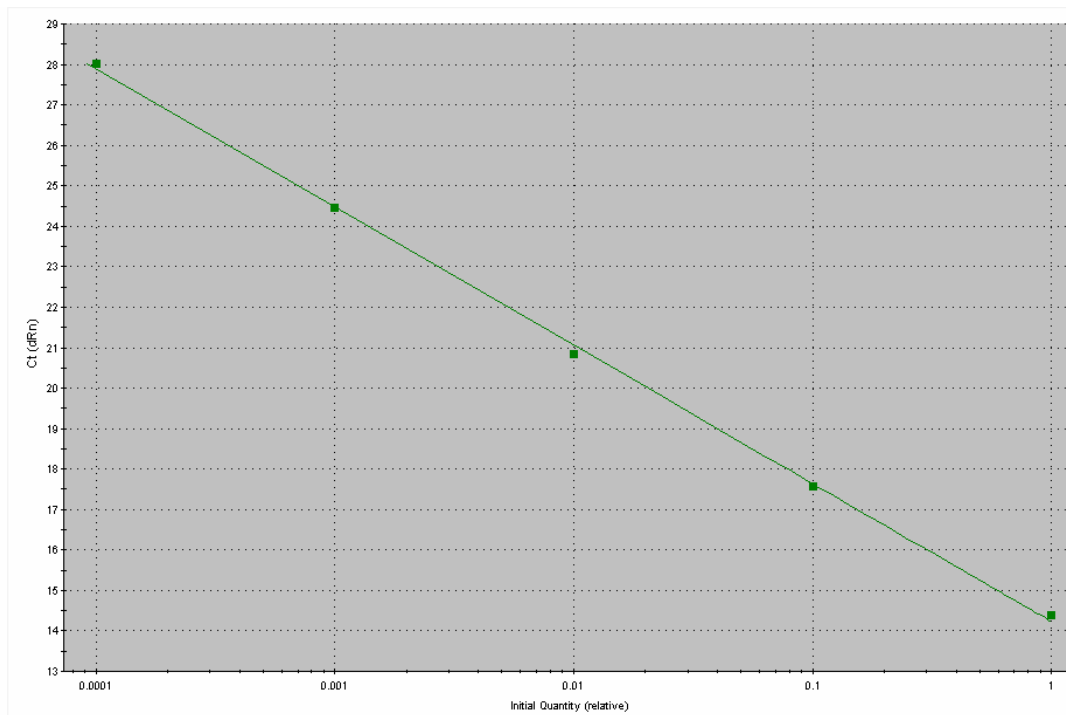


Abbildung 32. Effizienzbestimmung für Interferon  $\gamma$ . Der Effizienzwert beträgt 96,3 %.

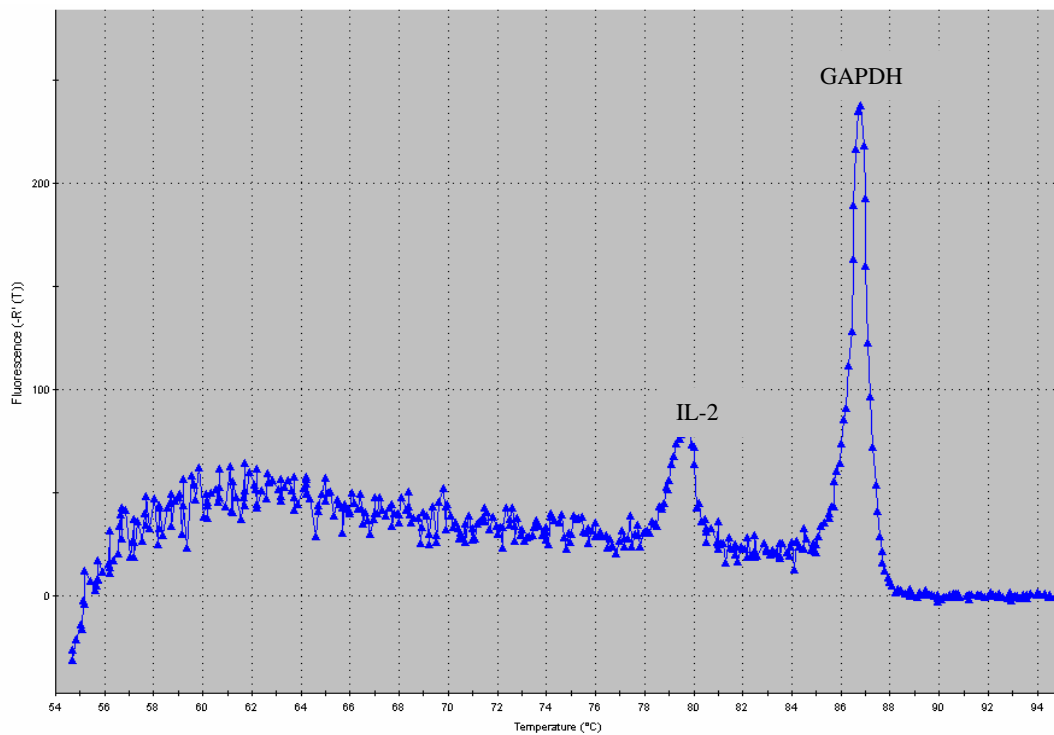
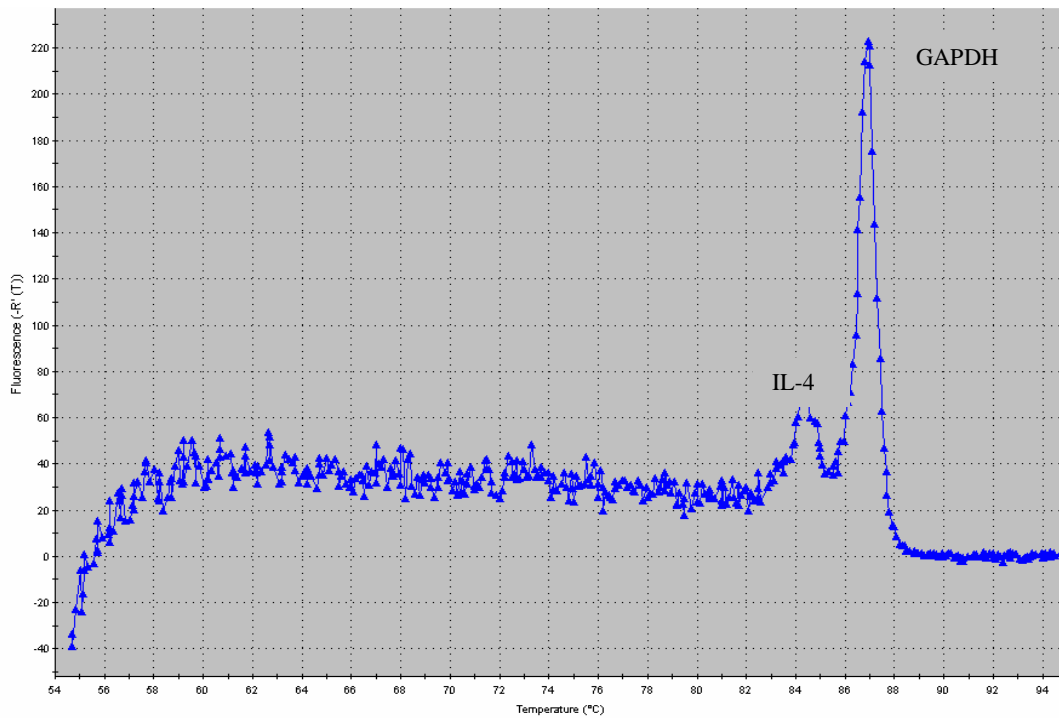
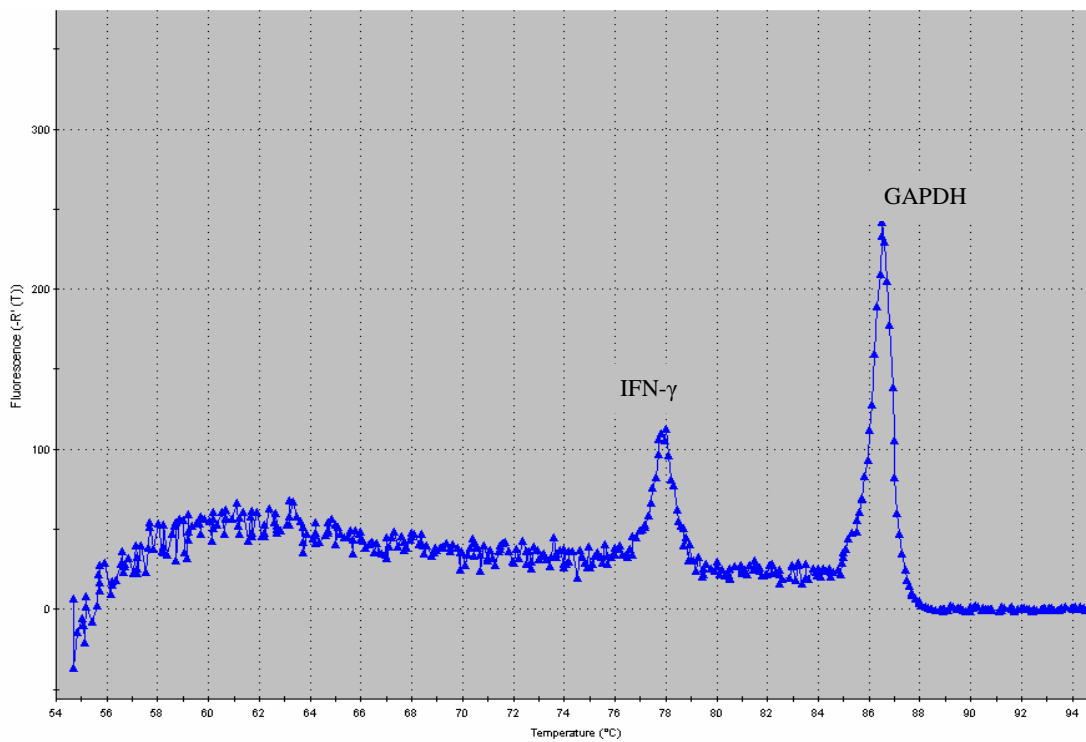


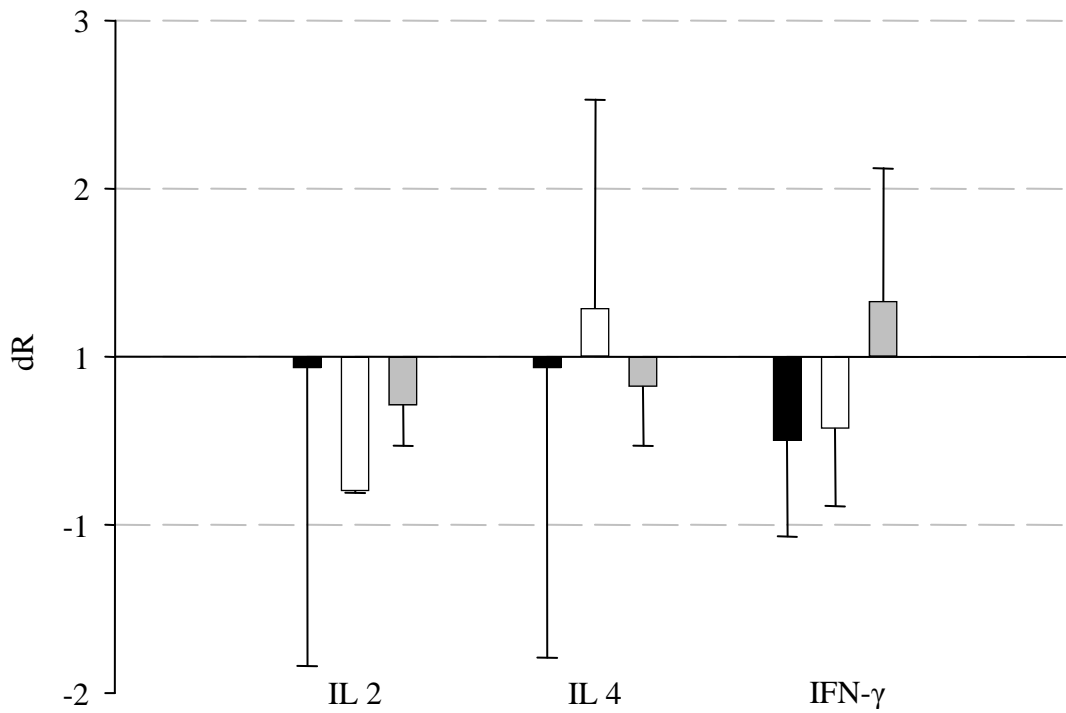
Abbildung 33. Dissoziationsprotokoll für Glyceralehyp-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interleukin 2. Die Schmelztemperatur für GAPDH liegt bei 86,8°C und für IL-2 bei 79,7°C.



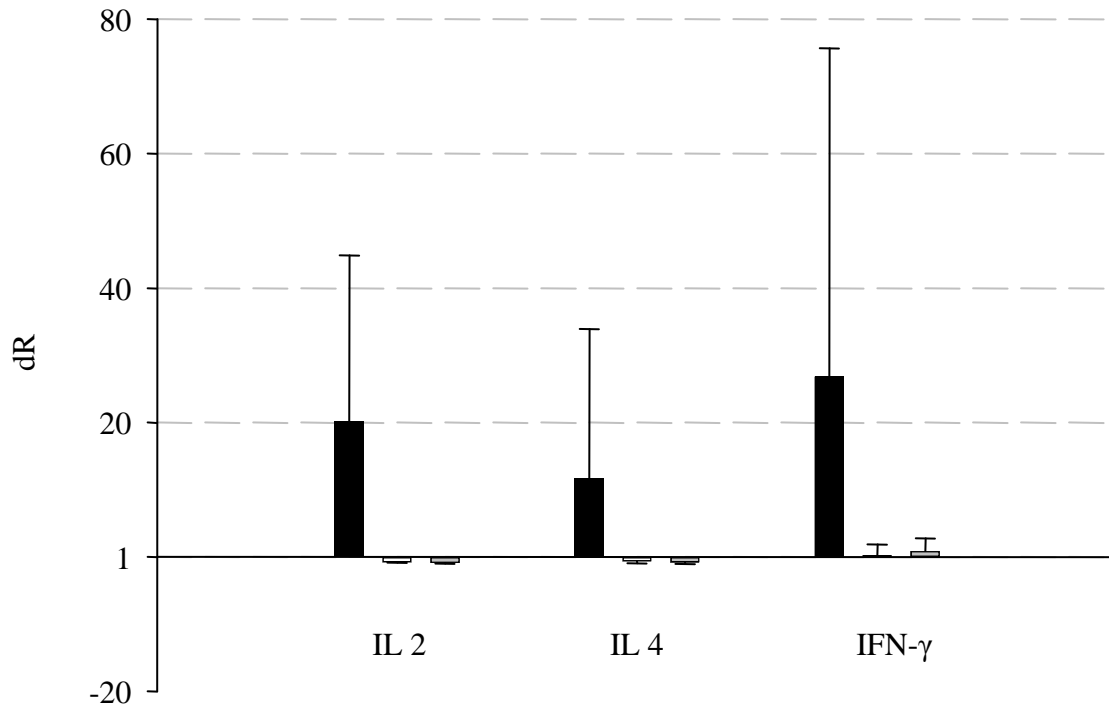
**Abbildung 34. Dissoziationsprotokoll für Glycerdehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interleukin 4.** Die Schmelztemperatur für GAPDH lautet 86,8°C und für IL-4 84,4°C.



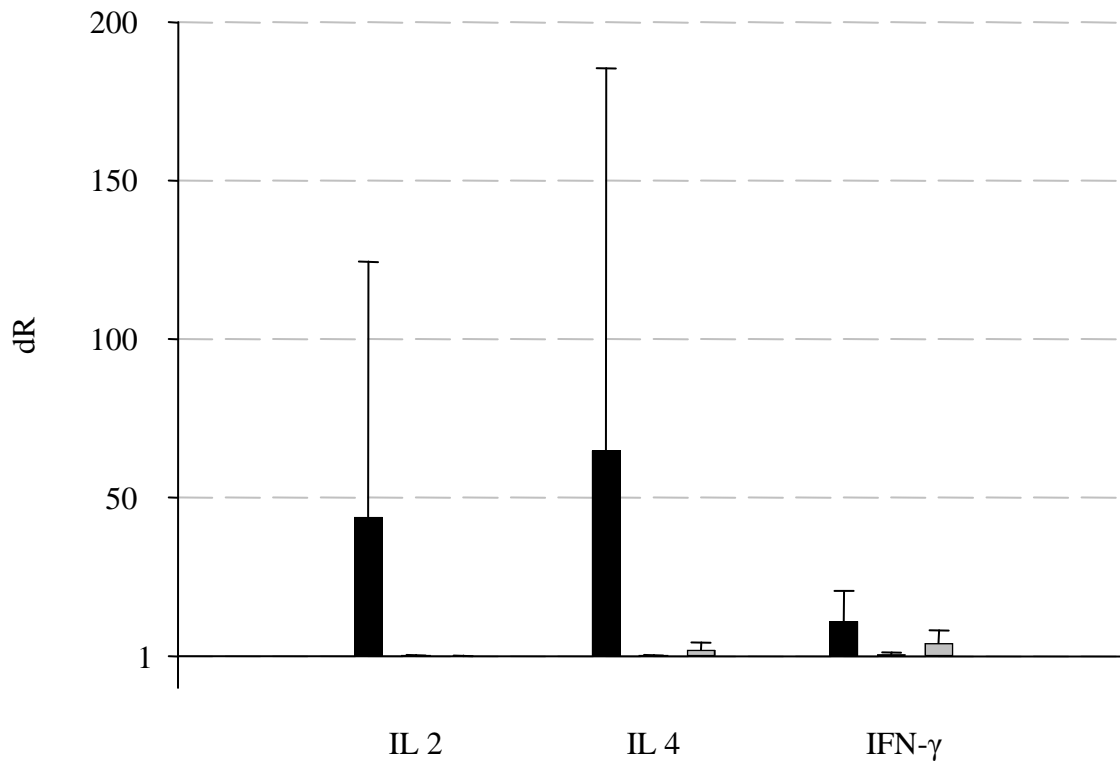
**Abbildung 35. Dissoziationsprotokoll für Glycerdehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Interferon- $\gamma$ .** Die Amplifikate von GAPDH besitzen eine Schmelztemperatur von 86,8°C und von IFN- $\gamma$  78,0°C.



**Abbildung 36. Relative Zytokin-Expressionsrate am 7. Tag nach Infektion mit *S. Typhimurium* DT104.** Die mittleren Expressionsraten der Wildtypgruppe werden durch die schwarzen Balken, die der *invC::aphT*-Infektionsgruppe durch die weißen Balken und die der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe durch die grauen Balken symbolisiert. Die vertikalen Linien demonstrieren die Standardabweichung.



**Abbildung 37. Relative Zytokin-Expressionsrate am 14. Tag nach Infektion mit *S. Typhimurium* DT104.** Die mittleren Expressionsraten der Wildtypgruppe werden durch die schwarzen Balken, die der *invC::aphT*-Infektionsgruppe durch die weißen Balken und die der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe durch die grauen Balken symbolisiert. Die vertikalen Linien demonstrieren die Standardabweichung.



**Abbildung 38. Relative Zytokin-Expressionsrate am 21. Tag nach Infektion mit *S.Typhimurium* DT104.** Die mittleren Expressionsraten der Wildtypgruppe werden durch die schwarzen Balken, die der *invC::aphT*-Infektionsgruppe durch die weißen Balken und die der *sseD::aphT*-Infektionsgruppe durch die grauen Balken symbolisiert. Die vertikalen Linien demonstrieren die Standardabweichung.



## II Tabellen

**Tabelle 24. Die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung des Körpergewichts der jeweiligen Infektionsgruppe im Verlauf der Infektion mit *S. Typhimurium* DT 104 und den beiden Deletionsmutanten.**

Tag	Körpergewicht in kg		
	<i>S. Tm</i> Wildtyp	<i>S. Tm invC::aphT</i>	<i>S. Tm sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	8,64 ± 0,81	9,13 ± 1,01	9,56 ± 1,12
1	10,19 ± 0,52	9,51 ± 1,03	9,94 ± 1,06
3	9,75 ± 0,37	10,33 ± 1,21	nicht gemessen
7	11,04 ± 0,89	11,60 ± 1,46	10,85 ± 1,04
10	12,59 ± 0,95	13,57 ± 1,78	12,51 ± 1,52
14	14,39 ± 1,32	14,71 ± 1,85	13,98 ± 1,83
17	15,36 ± 1,35	17,73 ± 2,60	16,48 ± 1,85
21	18,86 ± 2,05	19,16 ± 2,63	nicht gemessen

**Tabelle 25. Die prozentuale Nachweisrate von *S. Typhimurium* DT 104 und der beiden Deletionsmutanten in Gewebeproben von experimentell infizierten Hybridschweinen.** Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 315 Gewebeproben. Die bakteriologische Untersuchung wurde in Anlehnung an die ISO 6579 durchgeführt.

Nachweisrate von <i>Salmonella</i> in %			
Gewebeproben	Wildtyp	<i>invC::aphT</i>	<i>sseD::aphT</i>
Tonsille	100,0	88,9	100,0
Mandibular Lk.	100,0	100,0	100,0
Lunge	75,0	11,1	50,0
Leber	0,0	0,0	25,0
Milz	25,0	0,0	25,0
Jejunum	50,0	11,1	75,0
Illeum	75,0	55,6	100,0
Colon	75,0	100,0	100,0
Caecum	100,0	88,9	100,0
Lungen Lk.	100,0	11,1	50,0
Jejunal Lk.	100,0	66,7	87,5
Ileozökal Lk.	100,0	77,8	100,0
Colon Lk.	75,0	66,7	100,0
Muskulatur	50,0	22,2	37,5
Gallenflüssigkeit	0,0	0,0	0,0

**Tabelle 26. Die prozentuale Ausscheidungsrate von *S. Typhimurium* DT104 und der beiden Deletionsmutanten in den Verlaufs-Kotproben der experimentell infizierten Hybridschweine. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte in Anlehnung an die ISO 6579.**

<b>Nachweisrate von <i>Salmonella</i> in %</b>			
<b>Tage <i>p. inf.</i></b>	<b>Wildtyp</b>	<b><i>invC::aphT</i></b>	<b><i>sseD::aphT</i></b>
0	0,0	0,0	0,0
3	100,0	100,0	100,0
7	100,0	88,9	100,0
10	100,0	88,9	100,0
14	100,0	100,0	87,5
17	100,0	66,7	75,0
21	100,0	55,6	87,5

**Tabelle 27. Gewebeprouben aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von *S. Typhimurium* DT104 möglich war.** Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 60 Gewebeprouben. Die bakteriologische Untersuchung wurde in Anlehnung an die ISO 6579 durchgeführt. Angegeben ist jeweils die Anzahl positiv getesteter Prouben in den verschiedenen Untersuchungsverfahren.

<b>Untersuchtes Gewebe</b>	<b>Bakteriologische Untersuchung</b>	<b>Positive PCR-Befunde</b>
Tonsille	4	4
Mandibularlymphknoten	4	4
Lunge	3	3
Leber	0	0
Milz	1	1
Jejunum	2	2
Ileum	3	3
Colon	3	3
Caecum	4	4
Lungenlymphknoten	4	4
Jejunallymphknoten	4	4
Ileozökallymphknoten	4	4
Colonlymphknoten	3	3
Muskulatur	2	2

**Tabelle 28. Gewebeprobe**n aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-*invC::aphT* möglich war. Es wurden bakteriologisch und molekularbiologisch insgesamt 135 Gewebeprobe

n untersucht. Angegeben ist jeweils die Anzahl positiv getesteter Proben in den einzelnen Verfahren.

Untersuchtes Gewebe	Bakteriologische Untersuchung	Positive PCR-Befunde
Tonsille	8	8
Mandibularlymphknoten	9	9
Lunge	1	1
Leber	0	0
Milz	0	0
Jejunum	1	1
Ileum	5	5
Colon	9	9
Caecum	8	8
Lungenlymphknoten	1	1
Jejunallymphknoten	6	6
Ileozökallymphknoten	7	7
Colonlymphknoten	7	7
Muskulatur	2	2

**Tabelle 29. Gewebeproben aus experimentell infizierten Schweinen in denen ein Nachweis von *S. Typhimurium* DT104-*sseD::aphT* möglich war.**

Für die beiden Untersuchungsverfahren standen von 8 Tieren 120 Gewebeproben zu Verfügung. In der Tabelle sind die positiv getesteten Proben angegeben.

<b>Untersuchtes Gewebe</b>	<b>Bakteriologische Untersuchung</b>	<b>Positive PCR-Befunde</b>
Tonsille	8	8
Mandibularlymphknoten	8	8
Lunge	4	4
Leber	2	2
Milz	1	1
Jejunum	6	6
Ileum	8	8
Colon	8	8
Caecum	8	8
Lungenlymphknoten	4	4
Jejunallymphknoten	7	7
Ileozökallymphknoten	8	8
Colonlymphknoten	8	8
Muskulatur	3	3

**Tabelle 30. Die errechneten  $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interleukin 2 Expressionsrate verwendet wurden.**

Interleukin 2			
Tage	<i>S.Tm Wildtyp</i>	<i>S.Tm invC::aphT</i>	<i>S.Tm sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	31,71 ± 1,34	29,01 ± 0,67	35,48 ± 2,30
7	33,50 ± 2,47	28,87 ± 0,82	32,79 ± 1,78
14	28,65 ± 3,08	31,31 ± 0,67	37,30 ± 4,41
21	28,30 ± 1,76	31,01 ± 3,36	35,84 ± 5,02

**Tabelle 31. Die errechneten  $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interleukin 2 verwendet wurden.** Die  $\Delta C_T$ -Mittelwerte sind die Differenzen der gemessenen Amplifikationszyklen zwischen der zu untersuchenden DNA und der zur Normierung verwendeten GAPDH-DNA.

Interleukin 2			
Tage	<i>S.Tm Wildtyp</i>	<i>S.Tm invC::aphT</i>	<i>S.Tm sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	12,17 ± 6,58	5,12 ± 2,19	9,94 ± 2,70
7	11,23 ± 3,28	5,52 ± 2,28	9,96 ± 2,17
14	4,39 ± 4,45	7,33 ± 3,03	14,36 ± 3,71
21	2,07 ± 6,11	5,58 ± 5,68	9,55 ± 4,16

**Tabelle 32. Die errechneten  $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interleukin 4 Expressionsrate verwendet wurden.**

Interleukin 4			
Tage	<i>S.Tm Wildtyp</i>	<i>S.Tm invC::aphT</i>	<i>S.Tm sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	32,16 ± 1,04	28,64 ± 0,91	30,77 ± 2,43
7	34,86 ± 4,52	27,90 ± 1,38	29,14 ± 3,14
14	29,78 ± 1,39	30,21 ± 1,51	32,46 ± 3,10
21	28,69 ± 1,33	30,68 ± 4,45	25,57 ± 2,98

**Tabelle 33. Die errechneten  $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interleukin 4 verwendet wurden.** Die  $\Delta C_T$ -Mittelwerte sind die Differenzen der gemessenen Amplifikationszyklen zwischen der zu untersuchenden DNA und der zur Normierung verwendeten GAPDH-DNA.

Interleukin 4			
Tage	S.Tm Wildtyp	S.Tm <i>invC::aphT</i>	S.Tm <i>sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	7,43 ± 1,63	6,22 ± 1,02	5,72 ± 2,06
7	11,97 ± 5,04	6,31 ± 0,84	7,02 ± 2,37
14	7,90 ± 2,20	7,84 ± 1,82	10,22 ± 1,44
21	7,00 ± 3,63	7,06 ± 4,75	2,53 ± 6,01

**Tabelle 34. Die errechneten  $C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Berechnung für die Interferon  $\gamma$  Expressionsrate verwendet wurden.**

Interferon $\gamma$			
Tage	S.Tm Wildtyp	S.Tm <i>invC::aphT</i>	S.Tm <i>sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	30,44 ± 2,71	30,24 ± 2,99	34,55 ± 2,88
7	31,22 ± 2,00	30,71 ± 3,01	31,21 ± 2,75
14	28,54 ± 1,67	31,21 ± 1,88	34,7 ± 2,02
21	29,11 ± 1,66	29,45 ± 1,90	33,14 ± 7,40

**Tabelle 35. Die errechneten  $\Delta C_T$ -Mittelwerte, die zur relativen Quantifizierung Interferon  $\gamma$  verwendet wurden.** Die  $\Delta C_T$ -Mittelwerte sind die Differenzen der gemessenen Amplifikationszyklen zwischen der zu untersuchenden DNA und der zur Normierung verwendeten GAPDH-DNA.

Interferon $\gamma$			
Tage	S.Tm Wildtyp	S.Tm <i>invC::aphT</i>	S.Tm <i>sseD::aphT</i>
<i>a. inf.</i>	8,39 ± 1,29	7,37 ± 3,37	7,21 ± 3,39
7	10,43 ± 0,88	8,62 ± 3,77	7,31 ± 3,27
14	6,08 ± 2,52	8,58 ± 2,96	10,30 ± 3,47
21	7,15 ± 7,38	5,59 ± 3,57	6,83 ± 6,95

### III Chemikalien und Reagenzien

#### Gebrauchslösungen für die DNA-Extraktion

##### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 0,15 M, pH 7,4

NaCl		85,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(x 2H <sub>2</sub> O)	14,8 g (18,56)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		3,45 g
Aqua bidest.		ad 1 Liter

Diese Stocklösung 1:10 in Aqua bidest. verdünnt ergibt die Gebrauchslösung mit pH-Wert 7,2-7,4. Die Gebrauchslösung ist vor ihrem Einsatz zu autoklavieren.

##### Lysis-Puffer mit ProteinkinaseK

ProteinkinaseK		2 mg
Tween 20 (0,5 % Lösung)		50 µl
Aqua bidest.		ad 10 ml

#### Reagenzien für Agarose-Gelelektrophorese

##### Tris-Boric Acid-EDTA (TBE)

Tris-Base		108 g
Borsäure		55 g
EDTA		8,5 g
Aqua bidest.		ad 1 Liter

Die Gebrauchslösung ergibt sich aus dieser Stocklösung 1:10 in Aqua bidest. verdünnt.

##### Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid		1 mg
Aqua bidest.		400 ml



## Danksagung

In der Bearbeitungszeit meiner Dissertation war nicht selten Unterstützung nötig, diese erhielt ich von mir lieben Menschen. Da dies keine Selbstverständlichkeit ist, kann man nicht oft genug Danke sagen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung des sehr interessanten und mich faszinierenden Themas, ebenso für die zu Verfügung gestellten Mittel zur Durchführung der Versuche im Stall sowie Labor.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Uwe Rösler bedanken.

Eveline Brumme und Nadja Leinecker danke ich für die Unterstützung während der Einarbeitung in verschiedene bakteriologische, molekularbiologische und serologische Methoden. Danke auch für die Hilfe bei meinen ersten „Gehversuchen“ im Labor.

Danke den Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig für die Hilfe im Rahmen der Infektionsversuche.

Vielen Dank, Eugénie, nicht nur für die Unterstützung sondern vor allem für die Freundschaft.