

**IMMUNOLOGISCHE UND PARASITOLOGISCHE  
UNTERSUCHUNGEN ZUR NATÜRLICHEN  
KRANKHEITSRESISTENZ GEGENÜBER  
*SARCOCYSTIS MIESCHERIANA* BEIM SCHWEIN**

**STEPHANIE STANKEWITZ**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

---

Aus dem  
Institut für Parasitologie  
Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. Horst Zahner

**Immunologische und parasitologische Untersuchungen  
zur natürlichen Krankheitsresistenz gegenüber  
*Sarcocystis miescheriana* beim Schwein**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Stephanie Stankewitz**

Tierärztin aus Herdecke (Ruhr)

Giessen 2008

---

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. H. Zahner

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 14.08.2008

**Meinen Eltern,  
Sebastian und Tobias**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1	Bisheriger Erkenntnisse im Bereich der Nutzung von Krankheitsresistenzen in Bezug auf <i>S. miescheriana</i> .....	3
2.2	Apicomplexa.....	5
2.2.1	Allgemeine Eigenschaften von Apicomplexa .....	5
2.2.2	Immunologische Eigenschaften der Gattung <i>Sarcocystis</i> .....	12
2.2.3	Antigene der Gattung <i>Sarcocystis</i> .....	15
2.2.4	Besonderheiten im Immunsystem des Schweins.....	22
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.1	Material .....	27
3.2	Methoden .....	33
3.2.1	Klinische und diagnostische Methoden.....	33
3.2.2	Immunologische Methoden.....	37
3.3	Statistische Auswertung .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>46</b>
4.1	Ergebnisse der klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen.....	46
4.1.1	Klinische Eignung der Versuchstiere .....	46
4.1.2	Körpertemperatur der Versuchstiere im Verlauf der <i>S. miescheriana</i> -Infektion .....	46
4.1.3	Veränderungen im Blutbild im Verlauf der Infektion.....	48
4.2	Ergebnisse immunologischer Untersuchungen .....	50
4.2.1	Antikörperspiegel .....	50
4.2.2	Phänotypisierung der Lymphozyten im peripheren Blut.....	53
4.2.3	Proliferationsreaktionen peripherer Lymphozyten.....	66
4.2.4	Zytokinsynthese peripherer Blutlymphozyten .....	70
4.3	Sektionsergebnisse .....	79
4.3.1	Makroskopische und Histologische Untersuchung der Muskulatur sowie Beurteilung der Intensität des Befalls mit <i>S. miescheriana</i> .....	79
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>135</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>136</b>



---

# 1 Einleitung

In den letzten Jahren hat das Interesse am Immunsystem des Schweins stark zugenommen. Als Ursache hierfür ist der zunehmende Einsatz des Schweins als Modelltier für verschiedene bio-medizinische Fragestellungen anzusehen (Saalmüller 1998). Aber auch der Einsatz des Schweins als Organspender bei Xenotransplantationen wird zunehmend wichtiger (Kenmochi et al. 1994). Neben diesen wissenschaftlichen Fragestellungen spielt das Schwein natürlich auch eine wichtige Rolle als Lebensmittel-lieferndes Nutztier. Im Rahmen der Produktion tierischer Lebensmittel und der damit verbundenen Problematik, wie z. B. der Antibiotikaresistenzen, ist es nötig, neue Methoden der Krankheitsprophylaxe zu erforschen.

Nicht zuletzt für die Entwicklung neuer Impfstoffe oder der Überprüfung der Wirksamkeit vorhandener Vakzine ist eine genaue Kenntnis des porcinen Immunsystems von Bedeutung, um die Interaktionen von diversen Pathogenen mit dem Immunsystem analysieren zu können (Saalmüller 1998).

Der adaptiven Immunität, die nach erstmaligem Kontakt mit wirtsfremden Antigenen einen komplexen Abwehrmechanismus aufbaut, steht die Resistenz gegenüber. Als Resistenz werden all die Effekte bezeichnet, die das Auslösen einer Infektionskrankheit verhindern oder deren Ausmaß zumindest einschränken. Genetisch bedingte Resistenzunterschiede bei Nutztieren sowie der Maus sind seit langem bei zahlreichen Infektionskrankheiten bekannt. Vor allem bei der Maus erfolgten in vielen Fällen Selektionen in Populationen auf Grund von Resistenzen (Cole 1968; Madden et al. 1993; Vogeli et al. 1997b; Stear und Wakelin 1998).

In der vorliegenden Studie sollen die Resistenzunterschiede zwischen zwei Schweinerassen, europäisches Pietrain (PE) und chinesisches Meishan (ME), sowie der hieraus gewonnenen F2-Generation gegenüber einem protozoischen Erreger, *Sarcocystis miescheriana*, als Hinweis auf eine differierende genetische Ausstattung zur Erregerabwehr erfasst werden. Hierzu wird in verschiedenen aufeinander aufbauenden Arbeiten die Variabilität der klinischen und immunologischen

Merkmalsäußerungen auf eine experimentelle Infektion untersucht. Erste Untersuchungen ergaben Resistenzunterschiede zwischen PE- und ME-Schweinen, die sich in klinischen, serologischen, hämatologischen und parasitologischen Befunden zeigten (Reiner et al. 2002a).

Als Zielstellung dieser Arbeit werden folgende Fragen formuliert:

1. Ist es möglich, eine Immunantwort des Schweins gegenüber *Sarcocystis miescheriana* zu charakterisieren?
2. Besteht eine Korrelation zwischen den immunologischen Vorgängen im Schwein und dem Lebenszyklus des Parasiten *Sarcocystis miescheriana* besteht?
3. Können unterschiedliche immunologische Reaktionen der reinrassigen Schweinerassen festgestellt werden?
4. Bestehen Korrelationen zwischen einer möglichen Immunantwort der reinrassigen Tiere im Vergleich zu den F2-Tieren?
5. Lässt sich auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse eine mögliche Vererblichkeit einer Krankheitsresistenz erwarten?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Bisheriger Erkenntnisse im Bereich der Nutzung von Krankheitsresistenzen in Bezug auf *S. miescheriana*

Bisher wurden natürliche Resistenzen gegenüber Infektionskrankheiten beim Schwein bei Virose (Oura et al. 1998; Reiner et al. 2002b), Bakteriosen (Bertschinger et al. 1993; Vogeli et al. 1997a) und Parasitosen (Lunney und Murrell 1988; Sciutto et al. 2003) beschrieben. Hierbei wurden Populationsunterschiede beobachtet, aber auch zugrunde liegende molekulare Mechanismen untersucht. In einigen Fällen gelang sogar der Einsatz von Resistenzgenvarianten in der Praxis (Reiner 2003).

Der Einsatz von gegen ausgewählte Krankheiten resistenten Schweinepopulationen kann in der Praxis zu einem verbesserten Gesundheitsstatus des Schweinebestandes und infolge dessen zu verminderten Leistungseinbußen sowie geringeren Tierverluste führen. Im Weiteren resultieren hieraus der verringerte Einsatz von Chemotherapeutika und eine verminderte Rückstandsproblematik, welches für den Verbraucher zusätzliche Sicherheit für den Verzehr von tierischen Lebensmitteln bedeutet. Allerdings ist die kommerzielle Nutzung von Krankheitsresistenzen problematisch. Zum einen gibt es vielfältige Möglichkeiten der Ausbildung von Resistenzmechanismen sowie der Immunantwort. Zum anderen erweist sich der Grad der Vererblichkeit oft als niedrig. Letzteres zwingt in konventionellen Zuchtprogrammen zu aufwendigen Nachkommensprüfungen (Hepp und Reiner 2006).

Bisherige Untersuchungen von Reiner et al. (2002) haben gezeigt, dass es unterschiedliche Empfindlichkeiten der Rassen ME und PE gegenüber einer *Sarcocystis miescheriana*-Infektion gibt. Die wesentlichen Unterschiede bestanden in bei den ME um den Faktor 20 und 200 geringeren Zystozoenmengen in der Skelettmuskulatur bzw. im Herzmuskel. Damit korreliert waren Unterschiede in den infektionsbedingt auftretenden Fieberschüben, d. h. die mit der Besiedlung der Muskulatur ansonsten auftretende Temperaturerhöhung unterblieb bei den ME (zur endogenen Entwicklung von *S. miescheriana* und zur Klinik siehe Kapitel 2.2).

Auf Grund dieser Voruntersuchungen wurden die beiden Rassen als Tiermodell zur Untersuchung natürlicher Resistenzunterschiede gegenüber einem parasitären Erreger als geeignet angesehen.

Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Rassen gegenüber einem Erreger bei identischen Infektionsbedingungen weisen auf die Beteiligung von auf Genen lokalisierten Resistenzfaktoren hin. Zur Ermittlung dieser sogenannten quantitativen Genorte (quantitativ trait loci; QTL) wird die Erstellung von F2-Familien aus zwei Ausgangsrassen mit unterschiedlicher Resistenzlage angestrebt. Dies konnte bereits anhand der F2-Familien aus PE und ME erfolgreich durchgeführt werden, wobei auch Daten aus dieser Arbeit einbezogen wurden (Reiner et al. 2007).

Als Teil des DFG-Projektes der „Analyse von QTLs, Kandidatengenen und beteiligten Faktoren für die Empfindlichkeit/Resistenz gegenüber *S. miescheriana* beim Schwein“ soll es die Aufgabe dieser Arbeit sein, vor allem die zelluläre Immunantwort des Schweines gegenüber *S. miescheriana* bei reinrassigen und F2-Tieren zu beschreiben.

## 2.2 Apicomplexa

### 2.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Apicomplexa

#### 2.2.1.1 Systematik, Aufbau und Biologie

Der Stamm Apicomplexa gehört zu den Protozoen. Alle Apicomplexa leben als intrazelluläre Parasiten. Das charakteristische Merkmal der Apicomplexa ist eine Gruppe von Organellen im apikalen Bereich, der so genannte Apikalkomplex. Er setzt sich zusammen aus dem Polring, subpellikulären Mikrotubuli, Konoid, Rhoptrien, Mikronemen und sogenannten Dichten Granula. Mikronemen und Rhoptrien sind auf die invasiven Stadien, die Sporozoiten und Merozoiten beschränkt (Levine 1973; Chobtar und Scholtyseck 1982a). Die Mikronemen stellen über von ihnen sezernierte Proteine die Verbindung zur Wirtszelle her und sind an der Bewegung des Parasiten auf der Wirtszellmembran beteiligt (Dubremetz 1993; Dubremetz 1998; Soldati et al. 2001; Tomley et al. 2001). Die Charakterisierung der Mikronemenproteine erfolgte besonders bei *Toxoplasma gondii* und *Eimeria tenella* (Tomley et al. 1991; Kawazoe et al. 1992; Fourmaux et al. 1996; Tomley et al. 1996; Carruthers et al. 1999; Brown et al. 2000; Brydges et al. 2000; Soldati et al. 2001; Tomley et al. 2001), aber auch für *Sarcocystis muris* sind drei Proteine beschrieben (Tomley und Soldati 2001; Klein et al. 2003). Sie sind vor allem durch Domänen mit adhäsiven Eigenschaften bestimmt. Die Rhoptrien sezernieren u. a. Moleküle, die beim Eindringen des Parasiten in die Wirtszelle eine Rolle spielen (Scholtyseck und Mehlhorn 1970; Perkins 1992; Dubremetz 1993). Rhoptrienkomponenten sind an der Bildung der Parasitophoren Vakuole beteiligt (Sam-Yellowe 1996). Dichte Granula liegen in der Regel dicht vor dem Kern (Scholtyseck 1979), werden nach der Invasion der Wirtszelle in der Parasitophoren Vakuole freigesetzt (Daszak et al. 1993; Dubremetz et al. 1998) und in die Wand sowie das tubulo-retikuläre Netzwerk der parasitophoren Vakuole integriert (Sibley et al. 1986; Dubremetz et al. 1998). Dichte Granula haben offenbar auch eine Funktion bei der Zellinvasion, da monoklonale Antikörper gegen Dichte Granula von *T. gondii* in vitro und in vivo das Eindringen von Tachyzoiten in Wirtszellen beeinträchtigen (Cha et al. 2001).

Bei den Apicomplexa können geschlechtlich differenzierte Formen unterschieden werden (Levine 1986). „Makrogamont“ bzw. „Makrogamet“ bezeichnen das unreife

bzw. reife weibliche Entwicklungsstadium, die männlichen Entwicklungsstadien sind Mikrogamonten bzw. -gameten.

### 2.2.1.2 Gattung *Sarcocystis*

Die Gattung *Sarcocystis* wurde 1843 erstmals von Miescher als „milchig-weiße Streifen“ in der Skelettmuskulatur der Hausmaus beschrieben (Miescher 1843). Kühn beschrieb einen ähnlichen Parasiten beim Schwein und nannte ihn *Synchrytium miescherianum* (Kühn 1865). Da dieser Gattungsname bereits vergeben war, wechselte der Name zu *Sarcocystis* (Lankester 1882) und Labbé schließlich legte den endgültigen Namen für die Art mit *Sarcocystis miescheriana* fest (Labbé 1899). Der von Miescher ursprünglich bei der Maus beschriebene Parasit wurde 1885 von Blanchard erneut beschrieben (Blanchard 1885) und 1886 von Raillet *Sarcocystis muris* genannt (Ashford 1978). Bis 1972 wurden zahlreiche Spezies von *Sarcocystis* benannt, aber erst Rommel und Mitarbeiter (Rommel und Heydorn 1972; Rommel et al. 1972) gelang es, den zweiwirtigen Lebenszyklus der Gattung zu beschreiben. Der indirekte ontogenetische Entwicklungsprozess ist gekennzeichnet durch den Wechsel von geschlechtlicher (Gametogonie) und ungeschlechtlicher (Sporogonie und Schizogonie) Vermehrung. Kurz darauf folgte die Entdeckung der vaskulären Phase und damit eine Erklärung der zum Teil hohen Pathogenität der Sarkosporidien im Zwischenwirt (Fayer und Johnson 1973). 1974 wurde der Hund als Endwirt für eine der Spezies beim Schwein erkannt (Rommel et al. 1974). Die Ausbildung einer schützenden Immunität vom Zwischenwirt Schwein gegenüber *Sarcocystis miescheriana* wurde 1981 erstmals von Dubey beschrieben (Dubey 1981).

#### 2.2.1.2.1 *Sarcocystis*-Arten beim Schwein

Beim Schwein existieren drei Sarkosporidien-Arten: *S. miescheriana* und *S. suis* sind als wirtschaftlicher Verlustfaktor, *S. suis* auch als Zoonoseerreger von Bedeutung; *S. porcifelis* hat keine klinische Rolle (Barrows et al. 1982a; Dubey et al. 1989; Tenter et al. 1989). Endwirte von *S. miescheriana* sind der Hund und andere Kaniden (Rommel et al. 1979). Bei *S. suis* ist der Mensch (Heydorn 1977), bei *S. porcifelis* die Katze (Dubey et al. 1989) der Endwirt.

Die Sporozysten von *S. miescheriana* im Hundekot sind ca. 12,6 x 9,6 µm groß (Rommel et al. 1974; Mehlhorn und Heydorn 1978; Zayed und El-Ghaysh 1998).

Die reifen Gewebszysten von *S. miescheriana* sind ca. 1500 µm lang und bis zu 200 µm dick. Sie besitzen eine dicke (3-6 µm) Zystenwand und sind gekammert. Die Protrusionen der Zystenwand sind bis zu 5 µm lang und 1,3 µm breit (Erber 1977; Mehlhorn und Heydorn 1978). Im Mikroskop erscheint die Wand palisadenartig. Unreife Gewebszysten sind ab dem 27 Tag p. i. mikroskopisch nachweisbar, ab dem 58. Tag sind die Zysten infektiös (Heydorn et al. 1981; Barrows et al. 1982a). Sie enthalten die auch als Bradyzoiten bezeichneten Zystozoit. Diese sind ca. 15 µm groß und „bananenförmig“. In einer Gewebszyste sind mehrere tausend Zystozoit enthalten.

#### **2.2.1.2.2 Entwicklungszyklus von *S. miescheriana***

Der Endwirt (Hund, Fuchs, Waschbär) nimmt rohes, zystenhaltiges Muskelfleisch oral auf. Im Duodenum werden dann die ca. 15 µm großen Zystozoit frei und siedeln sich in Zellen der Dünndarmwand an. Im Rahmen der Gamogonie reifen die Gamonten in den Enterozyten zu Gameten heran, und aus dem befruchteten Makrogameten entsteht die umschalte Zygote oder unsporulierte Oozyste. Ab dem 5. Tag p. i. erfolgt in der Darmwand die Sporogonie, bei der in der Oozyste zwei Sporozysten mit je vier Sporozoit entstehen. Die Sporozysten werden ab dem 8. Tag p. i. über den Kot ausgeschieden (Rommel et al. 1974). Diese Stadien stellen die infektionsfähigen Formen für den Zwischenwirt dar.

Im Zwischenwirt erfolgt nun die Schizogonie, eine ungeschlechtliche Vermehrung mit mehreren Schizontengenerationen. Das Schwein nimmt hierzu die Sporozysten oral auf, und im Darm werden die darin enthaltenen Sporozoit frei. Diese dringen in die Endothelzellen der venösen Gefäße des Darms und darmnaher Bereiche ein. Hier kommt es zwischen dem 5. und 7. Tag p. i. in Form einer Endopolygenie zur ersten Schizogonie. Die entstandenen Merozoiten werden unter Zerstörung der Wirtszellen frei, und befallen nun Endothelzellen von Kapillargefäßen aller Organe. Besonders betroffen sind hierbei das Herz und die Niere. Es erfolgt erneut eine Endopolygenie zwischen dem 12. und 14. Tag p. i. (2. Schizogonie). Die zweite Merozoitengeneration dringt ab dem 27. Tag p. i. in die Muskelzellen ein (Barrows et al. 1982a; Levine 1986) und bildet zunächst dünnwandige Zysten aus. Die in der



gestreiften Muskulatur erfolgende dritte Schizogonie läuft wieder in Form einer Endodyogonie (wiederholte Zweiteilung) ab. Bis zum 70. Tag p. i. reifen dickwandigen Sarkozysten heran. Für den Hund sind die Parasitenstadien aus den Zysten ab dem 58. Tag p. i. infektiös (Erber und Geisel 1979). Betroffen von der Zystenbildung ist vor allem die Zungen-, Kau- und Zwerchfellmuskulatur. Aber auch die übrige Skelettmuskulatur und das Herz werden besiedelt. Die Zysten sind makroskopisch als dünne weiße Linien erkennbar. Nach dem 120. Tag p. i. degenerieren sie (Schnieder und Rommel 1983; Rommel 1985; Heydorn und Weniger 1988).

Der Zyklus schließt sich, wenn der Endwirt Hund rohes, zystenhaltiges Fleisch aufnimmt.

### **2.2.1.2.3 Klinik, Diagnose, Pathologie und Behandlung der *S. miescheriana*-Infektion**

Beim Endwirt verläuft die Infektion meistens symptomlos. Nur nach Aufnahme einer großen Anzahl von Zystozoen können Diarrhöe und Störungen des allgemeinen Befindens auftreten. Die Präpatenz beträgt 9 bis 10 Tage, die Patenz kann mehrere Monate dauern (Rommel et al. 1974). Bis zu 5,8 Mio. sporulierte Oozysten oder Sporozysten werden mit der Zeit ausgeschieden. Nach einer einmaligen Infektion bildet der Endwirt eine geringe Immunität aus, die sich darin äußert, dass bei Reinfektionen nur über einen kurzen Zeitraum und nur noch sehr wenige Oozysten ausgeschieden werden (Rommel et al. 2000b).

*S. miescheriana* ist für Schweine als Zwischenwirte hochpathogen. Allerdings ist die Schwere der Erkrankung von der Zahl der aufgenommenen Sporozysten abhängig. Des Weiteren besteht eine zeitliche Korrelation zwischen dem Auftreten der beiden Schizontengenerationen und klinischer Symptome (Fayer und Kocan 1971; Erber und Geisel 1979; Heydorn et al. 1981; Barrows et al. 1982b; Schnieder und Rommel 1983). Liegt die aufgenommene Sporozystenanzahl bei  $10^6$  oder niedriger, erkrankt das Tier an einer milden Sarkozystose. Die Autoren wollten mit der Verabreichung einer solchen Infektionsdosis Feldbedingungen simulieren. Hier kommt es zwischen dem 12. und 15. Tag p. i. zu einem Anstieg der Körpertemperatur. Gleichzeitig ist die Futteraufnahme reduziert. Bei der anschließenden chronischen Muskelsarkozystose

steigen ab dem 28. Tag p. i. der CK- und der ASAT-Wert an (Dauguschies et al. 1988b).

Die akute Sarkozystose ist durch einen zweigipfeligen Fieverlauf charakterisiert, dessen Maxima zwischen dem 5. und 9. Tag p. i. (1. Schizogonie) und dem 11. und 14. Tag p. i. (2. Schizogonie) liegen. Während es in der ersten Phase nur zu einer geringen Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens kommt, treten ab dem 11. Tag p. i. Anämie, Dyspnoe, Apathie und Freßunlust auf. Bei schweren Verläufen kommt es auch zu zyanotischen Verfärbungen der Akren. Der Tod kann 2 bis 3 Tage später eintreten. In der Sektion zeigt sich eine generalisierte hämorrhagische Diathese mit petechialen Blutungen in Haut, Unterhaut, Serosen und Lymphknoten. Besonders ausgeprägt sind die Petechien im Epi- und Endokard sowie der Pleura pulmonalis (Zielasko et al. 1981; Dauguschies et al. 1989b). Bei mehr als  $3 \times 10^6$  aufgenommenen Sporozysten führt die Krankheit in den ersten 14 Tagen p. i. nahezu regelmäßig zum Tod (Becker et al. 1979; Erber und Geisel 1979).

Ein weiterer bisher wenig beachteter kleiner Schub kann sich mit dem Beginn der letzten Schizogonie in den Muskelzellen einstellen. Reiner et al. (2002) berichten bei PE in der 4. bis 6. Woche p. i. von einer stark erhöhten Herzfrequenz und Fieber, das dem mit dem Ende der zweiten Schizogonie um den 14. bis 17. Tag p. i. einsetzenden nicht wesentlich nachstand. Wie oben bereits angeführt, sind es gerade diese Erscheinungen, die beim ME ausbleiben.

Mastschweine, die eine schwere *Sarcocystis*-Infektion überlebt haben, zeigen vermindertes Wachstum und eine reduzierte Gewichtszunahme (Dauguschies et al. 1987; Dauguschies et al. 1988a; Dauguschies et al. 1988b). Nach Schlachtung der Tiere zwischen dem 70. und 120. Tag p. i. erscheint die Muskulatur wässrig, weich und grau-rosa. Zudem finden sich zahlreiche Zysten (Heydorn und Weniger 1988). Die Fleischqualität verbessert sich allerdings in dem Maß wie sich die Zahl der Zystozysten pro Gramm Muskulatur durch eine ab dem 120. Tag p. i. einsetzende Zystendegeneration vermindert; in einigen Fällen beginnt diese bereits ab dem 70. Tage p. i. (Schnieder und Rommel 1983). Bei einer Mastdauer von durchschnittlich 161 Tagen finden sich im Anschluss an eine *Sarcocystis*-Infektion in der Muskulatur kaum noch Zysten und Abweichungen in der Fleischqualität (Heydorn und Weniger 1988).

Eine Diagnose der akuten Sarkozystose über Serumantikörper ist schwierig, da diese erst nach dem Abklingen der klinischen Symptome auftreten. Der Nachweis

von zirkulierendem Antigen (O'Donoghue und Weyreter 1983) ist nicht bis zur Praxisreife entwickelt. Post mortem lässt sich die akute Sarkozystose am besten histologisch durch den Nachweis des Parasiten in den Kapillarendothelien der Herzmuskulatur feststellen. In der quergestreiften Muskulatur lassen sich später die Zystozoen durch Verdauungsmethoden und histologische Schnitte nachweisen (Zielasko et al. 1981).

Eine praxistaugliche Therapie ist zurzeit nicht bekannt. Als Prophylaxe können in einer Tagesdosis von 10 mg/KGW Toltrazuril über 4 Tage oder 4 mg/kg KGW Salinomycin täglich dem Futter beigegeben werden. Dies verhindert aber lediglich akute Erkrankungen und drastische Gewichtsverluste (Rommel et al. 2000a).

### **2.2.1.2.4 Epidemiologie und Bedeutung der *Sarcocystis*-Infektionen beim Schwein**

Die Gattung *Sarcocystis* ist in Mitteleuropa beim Schwein weit verbreitet. Trotzdem sind repräsentative Daten aus den letzten Jahren dürftig. Epidemiologische Untersuchungen hatten gezeigt, dass 18% bis 35% der Zuchtschweine in Süddeutschland Gewebezysten aufwiesen (Boch et al. 1978), doch waren in späteren Untersuchungen lediglich 4% der Mastschweine in Westdeutschland betroffen (Furmanski 1987). Außerhalb Deutschlands wurden in 32% von 348 geschlachteten Schweinen in Österreich (Hinaidy und Supperer 1979), in 18% von 893 geschlachteten Sauen in den USA (Dubey und Powell 1994) und in 16% von 104 Sauen in Japan (Omata et al. 1993) Gewebezysten bedingt durch *Sarcocystis* spp. nachgewiesen. Ein Nachweis von Antikörpern gegen *Sarcocystis* spp. gelang in Süddeutschland bei 15 bis 35% der geschlachteten Schweine (Neumayer 1982), in Spanien sogar bei 100% (Pereira und Bermejo 1988). Eine aktuelle Studie aus Hessen wies in 72% aller untersuchten Ferkelerzeugerbetriebe Antikörper gegen *Sarcocystis* spp. nach; 28% der Sauen war seropositiv (Damriyasa et al. 2004). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass das Vorhandensein von Antikörpern nicht unbedingt auch das Vorhandensein von Gewebezysten bedingt (Furmanski 1987). Auch ist es auf Grund des serologischen Nachweises nicht möglich zwischen den einzelnen *Sarcocystis*-Arten zu differenzieren.

Die Sporozysten von *S. miescheriana* sind sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen. Durch den Kot des Endwirtes werden Futterfelder oder

Weideflächen verunreinigt, und Sporozysten können von dort in Kläranlagen abgeschwemmt werden, welche sie unbeschadet überstehen; von dort gelangen sie dann in Bewässerungsanlagen oder wieder auf Weideflächen oder Futterfelder. Bei Trockenheit sind die Sporozysten bis zu 10 Wochen, bei Feuchtigkeit sogar jahrelang infektiös (Rommel et al. 2000c). Zur Verbreitung tragen auch koprophage Insekten und Regenwürmer bei (Rommel 1985).

Eine akute Erkrankung durch *S. miescheriana* wurde in der Praxis bisher nur gelegentlich beobachtet (Zielasko et al. 1981), obwohl nach den Prävalenzen anzunehmen ist, dass es in vielen Betrieben zu anhaltenden Infektionen kommt. Hier spielt eine Rolle, dass eine überstandene Infektion mit *S. miescheriana* zumindest zu einer kurzzeitigen Immunität führt, die allerdings ab dem 80. Tag p. i. nachlässt und ab dem 120. Tag so gut wie verschwunden ist, somit eine Präimmunität darstellt. Dennoch scheint dies für die Entwicklung eines enzootischen Gleichgewichts auszureichen (Schnieder und Rommel 1983).

Die Gewebszysten von *S. miescheriana* und *S. suis* in der Muskulatur lassen sich makroskopisch nicht unterscheiden (Heydorn und Weniger 1988). Dies bedingt im Rahmen der Fleischschau, dass alle makroskopisch erkennbar mit Sarkosporidien befallenen Tierkörper und Organe als untauglich beurteilt werden müssen (VO (EG) 854/2004 Anhang I Abschnitt II Kapitel V Nummer 1 Buchstabe h), obwohl nur *S. suis* als Zoonoseerreger eine Rolle spielt. Der Rohverzehr von infiziertem Fleisch kann beim Menschen nach 6 bis 10 Stunden zu Durchfällen, Übelkeit und Benommenheit führen. Besonders immunsupprimierte Personen sind stark gefährdet (Schnieder 2003). Die humanpathogene Art *S. suis* ist zwar nicht so weit verbreitet wie *S. miescheriana* (Hinaidy und Supperer 1979; Furmanski 1987), aber *Sarcocystis*-Infektionen spielen insgesamt auch eine wirtschaftliche Rolle durch Wachstumsbeeinträchtigungen und Mindergewichtszunahmen in der Schweinemast (Boch et al. 1980; Dauschies et al. 1988b; Dubey 1993).

Eine Bekämpfung der Sarkosporidiose kann nur durch straffe hygienische Maßnahmen erfolgen. Wichtig hierfür ist die Unterbrechung des obligat zweiwirtigen Entwicklungszyklus. Zur Vermeidung von *S. miescheriana*-Infektionen sollten Hunde nicht mit rohem Schweinefleisch gefüttert werden und keinen Zugang zum Stall der Schweine haben. Die Bekämpfung von *S. suis* ist etwas schwieriger. Die getrennte Sammlung tierischer und menschlicher Fäkalien könnte aber eine

Kontamination von Futteranbauflächen vermeiden (Boch et al. 1980; Heydorn und Weniger 1988).

Über das Vorkommen von *Sarcocystis* spp. bei Hund und Katze in Deutschland existieren Daten aus dem Probenaufkommen der Tierärztlichen Hochschule Hannover von 1984 bis 2003. Im Zeitraum von 1984 bis 1991 wurden 3329 Hundekotproben untersucht und in 3% der Fälle konnte *Sarcocystis* spp. nachgewiesen werden (Epe et al. 1993). Für den Zeitraum 1993 bis 1997 gelang der Nachweis nur sehr selten und unregelmäßig. Lediglich 0,19% der 2289 Kotproben waren *Sarcocystis* spp. positiv (Epe et al. 1998). Für den Zeitraum 1998 bis 2002 konnten in keiner von 1281 Kotproben *Sarcocystis* spp. nachgewiesen werden (Epe et al. 2004). Dagegen steht eine Veröffentlichung von Barutzki & Schaper (2003). Hier wurden von 1999 bis 2002 die Kotproben von 8438 Hunden und 3167 Katzen auf Endoparasiten untersucht. *Sarcocystis* spp. wurden bei 9% der Hunde und 2% der Katzen nachgewiesen. Junge und alte Tiere waren gleichermaßen betroffen (Barutzki und Schaper 2003).

### 2.2.2 Immunologische Eigenschaften der Gattung *Sarcocystis*

Die immunologische Antwort von Wirbeltieren wurde im Zuge der Phylogenie u.a. entwickelt, um einen Wirt vor infektiösen Erregern zu schützen. Gleichzeitig haben die Erreger, insbesondere Parasiten Mechanismen hervorgebracht, um sich der Immunantwort entgegenzusetzen.

Schweine, die mit *S. miescheriana*-Sporozysten infiziert werden, entwickeln nach der Infektion Serumantikörpern. Diese Antikörper können u. a. im ELISA nachgewiesen werden (O'Donoghue und Weyreter 1984). Spezifische IgM-Antikörper sind ab dem 8. Tag p. i. nachweisbar (Zimmermann et al. 1984) und erreichen beim ME zwischen dem 21. und 28. Tag p. i. sehr hohe Werte, während PE am 21. Tag p. i. zwar eine erhöhte Konzentration aufweist, jedoch den Level von IgM des ME erst um den 42. Tag p. i. erreicht (Reiner et al. 2002a). Spezifische IgG-Antikörper steigen während der Periode der Zystenbildung, drei bis fünf Wochen p. i., an und persistieren dann in hohen Konzentrationen während der chronischen Phase (Zimmermann et al. 1984; O'Donoghue et al. 1985; Reiner et al. 2002a). Anstieg und Persistenz von *Sarcocystis*-Antikörpern variieren je nach System. Beim *S. bovicanis*-infizierten Kalb

erfolgt ein Anstieg des IgM-Titers ca. 3 bis 5 Wochen p. i., nach 2 bis 3 Monaten befindet er sich dann wieder auf dem Kontrollniveau. Dann allerdings ist spezifisches IgG<sub>1</sub> in hoher Konzentration nachweisbar. Dessen hoher Spiegel hält über einen Zeitraum von bis zu 6 Monate p. i. an. In der gesamten Zeit sind weder IgG<sub>2</sub> oder IgA nachweisbar (Gasbarre et al. 1984). Beim *S. gigantea*-infiziertem Schaf konnten keine spezifischen IgM-Antikörper beobachtet werden, jedoch verhielt sich IgG<sub>1</sub>, verzögert um 6 bis 8 Wochen, ähnlich wie beim Kalb (Gasbarre et al. 1984).

Die vorwiegend vorhandenen Zellen bei einer Gewebereaktion auf eine *Sarcocystis miescheriana*-Infektion beim Schwein sind Lymphozyten, Makrophagen und Histozyten, welche Organe und Muskulatur ab dem 12. Tag p. i. infiltrieren (Zielasko et al. 1981). Ähnlich sieht es beim Kalb aus. Hier lassen sich zwischen dem 26. und 33. Tag p. i. Ansammlungen mononukleärer Zellen in nahezu allen Organen nachweisen (Johnson et al. 1975; Dubey et al. 1982). Bei einer *S. bovicanis*-Infektion des Kalbes kommt es offenbar sehr rasch zu einer zellulären Immunreaktion, aber auf Grund einer unspezifischen Hemmung der Proliferationsantwort der Lymphozyten können *Sarcocystis*-spezifische Reaktionen nicht anhaltend nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache für den Rückgang der Proliferationsantwort peripherer Blutlymphozyten wird die Auswanderung immunkompetenter Zellen in das umliegende Gewebe in Betracht gezogen (Frelier 1980; Gasbarre et al. 1984). Beim Schaf hingegen ist es möglich, die Proliferationsantwort *Sarcocystis*-spezifischer PBL über einen längeren Zeitraum zu zeigen (Gasbarre et al. 1984).

Die Zysten in der Muskulatur von mit *S. miescheriana*-infizierten Schweinen liegen in der Mehrzahl reaktionslos vor. Kommt es jedoch zur Degeneration der Zysten, ab dem 70. Tag p. i. möglich, ab dem 120. Tag p. i. auf jeden Fall, entsteht eine entzündliche Reaktion mit vorwiegender Beteiligung von Lymphozyten, Makrophagen und Histozyten (Zielasko et al. 1981). Die gleiche Beobachtung wurde bei *S. capricanis*-infizierten Ziegen gemacht, wo ab dem 5. Monat p. i. die Zysten abgebaut werden (Dubey 1983). Auf Grund der mononukleären Infiltration um die degenerierten Zysten wird eine zellvermittelte Immunantwort angenommen (Dubey 1983).

Kälber, Schafe, Ziegen und Schweine, die mit einer subklinischen Dosis von *Sarcocystis* - Sporozysten infiziert wurden, waren gegen eine homologe Belastungsinfektion mit einer ansonsten tödlichen Dosis geschützt (Dubey 1983;

Fayer und Dubey 1984; Ford 1985). Beim *S. miescheriana*-infizierten Schwein hält dieser Schutz mindestens bis zum 80. Tag p. i. an, ist aber 120 Tage p. i. nicht mehr nachweisbar (Weyreter et al. 1984). Wichtig für eine Immunprotektion ist die Größe der immunisierenden Dosis. Eine schützende Wirkung wird bereits durch eine Dosis von mehr als 100 *S. miescheriana*-Sporozysten erreicht; als optimal haben sich 1000 Sporozysten erwiesen (Zielasko et al. 1981; Schnieder und Rommel 1983; Weber et al. 1983; Schnieder et al. 1984; Rommel und Schnieder 1985). Bisher ist das Parasitenstadium, welches für die Ausbildung der Immunität verantwortlich ist, nicht eindeutig bestimmt. Der Versuch der Vakzinierung von Schweinen mit lebenden, toten oder Teilen von *S. miescheriana*-Bradyzoiten führte zwar zur Bildung von Antikörpern, aber eine schützende Immunität wurde nicht ausgebildet (O'Donoghue et al. 1985). Die Verabreichung geringer Mengen viabler Sporozysten über einen längeren Zeitraum führte hingegen zur Entwicklung eines gewissen Schutzes (Schnieder und Rommel 1983). Eine Kreuzimmunität zwischen *S. miescheriana* und *S. suihominis* besteht nicht (Erber und Geisel 1979).

Eine relativ detaillierte Analyse der Immunreaktion eines *Sarcocystis* sp.-infizierten Zwischenwirtes liegt für die *S. singaporensis*-infizierte Ratte vor. Hier kommt es bei einer akuten Infektion zu einem deutlichen Anstieg der IgM-, IgG<sub>2b</sub>- und IgG<sub>2c</sub>-Antikörper (Gracie und Bradley 1996); IgG<sub>1</sub> jedoch fehlt. Dieses Profil entspricht nach Gracie und Bradley (1996) bei der Ratte einer überwiegend Th<sub>1</sub>-gesteuerten Reaktion. Vorgenannte Autoren ordnen auf Grund ihrer Studie IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>2c</sub> einer Th<sub>1</sub>-abhängigen und IgG<sub>1</sub> einer Th<sub>2</sub>-abhängigen Immunantwort zu. Während der chronischen Phase kommt es hingegen eher zu einer Th<sub>1</sub>-Th<sub>2</sub>-Mischreaktion. IgG<sub>1</sub>-Antikörper sind hier in hoher Konzentration nachweisbar. Für ein Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Mischprofil spricht insbesondere, dass sich durch eine Stimulation von Lymphozyten aus infizierten Ratten mit spezifischem Antigen keine IL-2-Synthese, eine mäßige IFN- $\gamma$ -Produktion und eine hohe IL-4-Synthese erreichen lässt (Jäkel et al. 2001). Ebenso wie bei der *T. gondii*-Infektion der Ratte (Zenner et al. 1999) ist IgG<sub>2b</sub> das dominante Immunglobulin während einer akuten Infektion mit *S. singaporensis*. IgG<sub>2b</sub> gilt als das effektivste Immunglobulin bei der komplement-abhängigen Lysis (Hughes-Jones et al. 1983) und bindet über seinen Fc-Anteil hocheffizient an Makrophagen (Denham et al. 1987).

Im *S. gigantea*-Extrakt wurde bereits 1953 ein Agglutinin beschrieben (Holz 1953), das später als ein Lektin charakterisiert werden konnte (Tietz et al. 1986). Im Verlauf

zahlreicher Untersuchungen konnte mittels des Lymphozytenproliferationsassays gezeigt werden, dass ein aus *S. gigantea* gewonnener Extrakt eine polyklonale mitogene Wirkung auf humane Blutlymphozyten hat. Darüber hinaus gelang es, den *S. gigantea*-Extrakt in eine Lektin- und Toxinfraktion aufzutrennen (Montag et al. 1987; Tietz et al. 1989). Hierbei konnte allein dem Lektin-Anteil die zellstimulierende und aktivierende Eigenschaft zugeordnet werden (Montag et al. 1987). Allerdings kann das Lektin unter dem Einfluss von dem *S. gigantea*-Toxin gehemmt werden. Abhängig von der Konzentration dieser beiden Bestandteile ist *S. gigantea* in der Lage, sowohl als Stimulator oder auch als Hemmer auf die Wirtsimmunität gegen eine Infektion einzuwirken (Tietz et al. 1989). Das von *S. gigantea* isolierte Lektin erwies sich beim Menschen auch als potenter polyklonaler B-Zell-Aktivator. Als Zeichen für die B-Zell-Reifung war in vitro eine markante Erhöhung von IgG und IgM messbar (Tietz et al. 1990). Letztlich lässt sich hieraus der Schluss ziehen, dass ein Extrakt aus *S. gigantea*-Zystozoen, besonders aber der Lektin-Anteil, immunmodulierende Wirkung auf verschiedene humane immunkompetente Zellen hat (Drossig et al. 1996).

### **2.2.3 Antigene der Gattung *Sarcocystis***

#### **2.2.3.1 Allgemein**

Wichtige Antigene von Apicomplexa stammen aus Strukturen des Apikalkomplexes (siehe Kap. 2.2.1.1). Die Organellen dieses Komplexes spielen eine entscheidende Rolle bei der Parasit-Wirtszell-Interaktion während und nach der Invasion, und ihre Inhaltsstoffe finden sich nach Exozytose u. a. auf der Oberfläche des Parasiten. (Carruthers und Sibley 1997). Als grundlegende Modelle haben sich die Plasmodien als Beispiel für durch Insekten übertragene Parasiten etabliert, während Toxoplasma als Grundlagenmodell für die Erforschung über das Futter übertragener zystenbildender Parasiten gilt (Mercier et al. 2005). Die erfolgreiche intrazelluläre Etablierung ist im Wesentlichen bei allen Parasiten der Apikomplexa von zwei Eigenschaften abhängig:

1. Die effiziente und schnelle Invasion der Wirtszelle mittels aktiver Penetration erfolgt ohne das Zytoskelett der Wirtszelle zu verändern und ist abhängig vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Wirtszelle.



Die aktive Penetration von Zellen durch Apikomplexa ist Gegenstand vieler Studien gewesen, welche dem Gliding, der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Sekretion von Adhäsinen in Form von Mikronemenproteinen zur Wirtszellrezeptorerkennung sowie der Nutzung des parasitären Aktin-Myosin-Komplexes zur Bindung an die Wirtszelloberfläche und zur Bewegung große Bedeutung beimaßen (Pinder et al. 2000; Soldati et al. 2001; Sibley 2003).

2. Die Lokalisation des Parasiten innerhalb der Wirtszelle, umgeben von der Parasitophoren Vakuole. Letztere wird durch den Parasiten bei Eintritt in die Wirtszelle aus dessen eigener Zellmembran unter Einbau parasitärer (Rhoptrien-, Dichte Granula-) Komponenten geformt (Beyer et al. 2002).

Beide oben genannten Vorgänge sind demnach durch die sequentielle Sekretion der drei wichtigsten sekretorischen Organellen des Apikalkomplexes begleitet: Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula (Carruthers und Sibley 1997).

### 2.2.3.2 Oberflächenantigene

Oberflächenproteine sind in die Wirtszellerkennung und Invasion der Wirtszelle eingebunden (Augustine und Danforth 1985).

Mittels Oberflächenmarkierung von *S. muris*- und *S. miescheriana*-Sporozoiten mit N-Hydroxysuccinimid-Biotin konnten jeweils zwei Hauptoberflächenantigene für *S. muris* und *S. miescheriana* auf der Zelloberfläche lokalisiert werden. Zum einen ein 31 kDa (Zystozoiten) und ein 29 kDa (Sporozoiten) großes Oberflächenantigen bei *S. muris*, zum anderen ein 33 kDa (Zystozoiten) und ein 30 kDa (Sporozoiten) großes Oberflächenantigen für *S. miescheriana* (Sommer et al. 1991; Sommer et al. 1992). Eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Entwicklungsstadien (Sporozoiten und Zystozoiten) von *S. muris* und *S. miescheriana* konnte dabei beobachtet werden (Sommer et al. 1992). Eine Existenz von Hauptoberflächenantigenen ähnlicher Größe ist bereits bei *T. gondii* (Handman et al. 1980) und *E. nieschulzi* (Tilley und Upton 1990) beobachtet worden. Für *S. muris*-Zystozoiten wurden noch weitere drei Oberflächenantigene (M 27, 43, 90 kDa) durch  $^{125}\text{I}$ -Markierung und Immunpräzipitation identifiziert (Abbas und Powell 1983).

Für *S. cruzi* wurden Proteine und Antigene auf allen Stadien mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Immunsereum oder monoklonalen Antikörpern untersucht (Speer et al. 1986; Burgess et al. 1988; Speer und Burgess 1988). Gemeinsame Proteine von

Sporozoitien und Merozoitien hatten Molekulargewichte von 15.7, 29, 49.9 und 54 kDa. Lediglich zwei Proteine (15.7 und 16.5 kDa) waren auf allen drei Parasitenstadien (Sporozoitien, Merozoitien und Bradyzoitien) vorhanden. Verschiedene monoklonale Antikörper reagierten im IFAT mit acetoxifizierte Sporozoitien und Merozoitien und drei monoklonale Antikörper reagierten mit der Oberfläche von lebenden Sporozoitien und Merozoitien (Burgess et al. 1988; Speer und Burgess 1988). Monoklonale Antikörper die mit der Oberfläche von *S. cruzi*-Merozoitien reagieren, identifizieren auch Epitope auf Sporozoitien- und Bradyzoitien-Antigen. Dies weist nach Burgess et al. (1988) und Speer und Burgess (1988) daraufhin, dass einige von den 20 bis 60 kDa Sporozoitienmolekülen Vorläufer der Oberflächenantigene von Bradyzoitien sein könnten.

Die Oberflächenproteine SN14 und SN16 von *S. neurona* sind wichtig bei der Infektion von Zellen in vitro. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Sera mit Anti-SN14- und Anti-SN16-Antikörpern die Infektionsrate reduzieren (Liang et al. 1998). Als weitere Oberflächenantigene wurden 2A7-18 (Marsh et al. 2002) und Sn-SAG1 (Ellison et al. 2002) identifiziert.

### 2.2.3.3 Mikronemen

Mikronemen sind spindel- bis flaschenförmig und liegen meist in größerer Anzahl vor. Diese variiert allerdings zwischen den verschiedenen Genera. Während *Sarcocystis* sp. und *Eimeria* sp. über eine größere Anzahl verfügen, sind es bei *Plasmodium* sp. und *Toxoplasma* sp. eher weniger. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Mikronemen mit der Fähigkeit des Parasiten korreliert, wie weit und wie schnell er über die Zellen gleitet oder Substrate bindet (Tomley und Soldati 2001). Bisherige Analysen haben gezeigt, dass Sequenzhomologien der Mikronemen bei Plasmodien, *Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma* und *Sarcocystis* bestehen (Entzeroth 2000; Tomley und Soldati 2001). Die Mikronemen selbst beinhalten eine komplexe Mischung aus zahlreichen Proteinen (Kawazoe et al. 1992; Tomley et al. 1996). Viele dieser Proteine interagieren mit der Wirtszellmembran (Blackman und Bannister 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine der Mikronemen eingebunden sind in

- a) Erkennung und Anheftung an die Wirtszelle als adhäsive Moleküle (Peterson et al. 1989; Narum und Thomas 1994; Carruthers und Sibley 1997; Barnes et al. 1998),

- b) Komponenten des Aktin-Myosin-Komplexes (Chobtar und Scholtyseck 1982b; Sibley et al. 1998; Pinder et al. 2000),
- c) Abläufen von Signalkaskaden zur Erkennung, Anheftung und Penetration von Wirtszellen (Soldati et al. 2004),
- d) lokale Zerlegung der Wirtszellmembran, um das Eindringen sowie die Bildung der Parasitophoren Vakuolenmembran zu ermöglichen (Sam-Yellowe et al. 1988; Beckers et al. 1994; Blackman 2000; Kaneko et al. 2000),
- e) Ausübung einer Proteaseaktivität an parasitären bzw. Wirtszellproteinen (Blackman 2000; Soldati et al. 2004).

Ihren Inhalt, dessen Hauptziel die Oberfläche der Wirtszellmembran ist, sekretieren die Mikronemen direkt am apikalen Ende des Parasiten (Sam-Yellowe 1996; Carruthers und Sibley 1997; Preiser et al. 2000). Im Rahmen der Sekretion nimmt  $\text{Ca}^{2+}$  eine Triggerfunktion ein (Carruthers und Sibley 1997; Carruthers und Sibley 1999; Ngo et al. 2004). Gezeigt werden konnte, dass bei *T. gondii* die entscheidenden Schritte der Zellinvasion nicht nur von der Sekretion der Mikronemenproteine abhängig sind, sondern auch zeitgleich mit einem deutlichen Anstieg des zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  des Parasiten einhergehen (Moreno und Zhong 1996; Carruthers und Sibley 1999; Lovett und Sibley 2003).

Die erfolgreiche Isolierung von Mikronemenproteine erfolgte erstmals bei *Sarcocystis* sp. (Dubremetz und Dissous 1980; Entzeroth 1992; Eschenbacher et al. 1993), aber nur im Fall von *E. nieschulzi* war es bisher möglich, eine exakte Bestimmung der Zusammensetzung von Mikronemenproteinen durchzuführen (Dubremetz et al. 1989; Kawazoe et al. 1992). Anhand der vorliegenden Literatur kann aber davon ausgegangen werden, dass diese weniger dicht ist als bei Rhoptrien und Dichte Granula (Pohl et al. 1989). Die ausführlichsten Daten zu den Proteinen aus Mikronemen liegen derzeit für *T. gondii* vor (u. a. Mic I, 60 kDa; Mic II, 120 kDa; Mic III, 90 kDa (Fourmaux et al. 1996; Carruthers et al. 1999; Brydges et al. 2000; Soldati et al. 2001; Tomley und Soldati 2001)).

Die erstellten Mikronemenproteinprofile für *Sarcocystis* ergaben für *S. tenella* eine 22/24 kDa Doppelbande (Dubremetz und Dissous 1980), für *S. muris* war sie 17/16 kDa groß (Pohl et al. 1989). Das Mikronemenprotein SML von *S. muris* (*Sarcocystis-muris*-Lektin) entwickelt sich aus einem 23 kDa Protein. SML ist ein Polypeptid mit zwei Apple-Domänen, weist Lektin-Aktivitäten auf und erkennt N-Acetylgalactosamin als Hauptzucker (Klein und al. 1996; Klein und al. 1998; Klein et al. 2003). Da die

Lektine von *S. muris* nicht über adhäsive Eigenschaften verfügen, wird dies durch die spezifische Bindung von Zucker im Rahmen der Anheftung an die Wirtszelle ersetzt (Entzeroth 2000). Lektin-ähnliche Eigenschaften mit vergleichbarer Wirkung wurden auch bei *S. gigantea* und *C. parvum* beschrieben (Montag et al. 1987; Montag et al. 1997).

Das „Gliding“, das selbständige Bewegen des Parasiten auf der Wirtszellenoberfläche, stellt einen wichtigen Schritt der invasiven Parasitenstadien dar. Die Möglichkeit des Parasiten, sich unabhängig im Körper des Wirts bewegen zu können, erlaubt die Migration über Gewebe und somit das aktive Aufsuchen, Erkennen, Eindringen und Besiedeln von Wirtszellen (Soldati et al. 2004). Der Aktin-Myosin-Komplex gilt als wichtiger Faktor hierbei (Meissner 2002). Durch die Motilität des Parasiten werden koordinierte Interaktionen zwischen den Oberflächenadhäsinen sowie dem parasitären Zytoskelett möglich. Die Identifikation einer Aldolase als Aktin-bindendes Protein war der erste Hinweis auf eine Verbindung zwischen dem Aktin-Myosin-System und adhäsiven Molekülen der TRAP-Familie bei *Plasmodium* und *Toxoplasma* (Blackman und Bannister 2001; Buscaglia 2003; Jewett und Sibley 2003). Die TRAP-Familie (thrombospondin-related anonymous protein) stellt neben den Apple-Domänen die zweite Familie der Mikronemenproteine dar. Sie werden bei *Plasmodium* während der Invasion über die Parasitenoberfläche freigesetzt, und vermitteln die Verbindung zwischen Wirtszellrezeptoren, und damit der Unterstützung der parasitären Motilität bei der Invasion von Wirtszellen (Thompson 2004). Bei dem hierzu homologen TgMic2 von *T. gondii* konnten Ähnlichkeiten in Aufgabe und Funktion gefunden werden (Huynh 2003; Jewett und Sibley 2004). Die adhäsiven Eigenschaften von TRAP fehlen den Lektinen von *S. muris*.

Für jeden Parasiten ist die Entwicklung alternativer Wege zur Anheftung und Invasion von Wirtszellen überlebenswichtig angesichts der Entwicklung der spezifischen Immunantwort und dem Vorliegen von Rezeptorpolymorphismen, wie bei *Plasmodium* gezeigt werden konnte (Pandey 2002; Duraisingh 2003). Auch *T. gondii* kombiniert eine große Anzahl von Mikronemenproteinen mit adhäsiven Molekülen und eröffnen sich so die Möglichkeit zur Nutzung verschiedener Wirtszelltypen (Soldati et al. 2004).

### 2.2.3.4 Rhoptrien

Bei den Rhoptrien handelt es sich um die größten sekretorischen Organellen. Sie sind von flaschenähnlicher Gestalt, membrangebunden und beinhalten elektronendichtes Material (Sam-Yellowe 1996; Blackman und Bannister 2001). Die Anzahl variiert je nach Stadium und Spezies, in den meisten Fällen kann von zwei Rhoptrien pro Sporozoiten ausgegangen werden (Blackman und Bannister 2001). Die Rhoptrien weisen eine zweiteilige Struktur auf: zum einen den basalen Bulbus, zum anderen einen schmalen, apikalen Kanal. Die Art und der Gehalt an Proteinen unterscheiden sich hierbei (Sam-Yellowe et al. 1995; Bannister et al. 2000). Der bisherige Schwerpunkt der Analyse, der Rhoptrienproteinbestandteile lag bei *P. falciparum* und *T. gondii* (bisher neun Rhoptrienproteine von *T. gondii* bekannt: ROP 1-9) (Preiser et al. 2000; Blackman und Bannister 2001), aber auch bei *Sarcocystis* sp. wurde ein komplexer Proteinmix beschrieben (Sam-Yellowe 1996). Zwischen den einzelnen Genera bestehen Ähnlichkeiten in Struktur und Aufbau der Rhoptrienproteine, so dass auch ähnliche Funktionen vermutet werden (Sam-Yellowe 1996; Blackman und Bannister 2001; Ngo et al. 2004). Die *T. gondii*-Rhoptrien enthalten unter anderem ein Protein, welches an der Lyse der Wirtszellmembran beteiligt ist (Penetration Enhancement Factor, PEF) (Perkins 1992). Daneben sind auch Lipide enthalten, deren Funktion bisher nicht definiert ist und kontrovers diskutiert wird (Joiner 1991; Ward et al. 1993).

Die Sekretion bedarf, ähnlich wie bei den Mikronemen,  $Ca^{2+}$  als Trigger, und erfolgt zeitgleich mit der Invasion und der Bildung der Parasitophoren Vakuolenmembran (Dubremetz et al. 1998; Ngo et al. 2004) am apikalen Ende des Parasiten (Entzeroth et al. 1986). Erkenntnisse hierüber liegen besonders über *T. gondii* vor (Nichols et al. 1983; Kimata und Tanabe 1987), bei *S. muris* konnte dieser Vorgang ebenfalls beobachtet werden (Entzeroth 1985; Tomley und Soldati 2001). Die Bildung der Parasitophoren Vakuole ist die Hauptfunktion der Rhoptrienproteine. Sie schützt den Parasiten und bewahrt ihn so vor der Zerstörung durch den Wirtszellstoffwechsel (Sam-Yellowe 1996; Ngo et al. 2004; Soldati et al. 2004). Die Protein- und Lipidzusammensetzung der Parasitophoren Vakuole ist weitestgehend unbekannt (Mordue und al. 1999). Weitere Funktionen übernehmen die Rhoptrienproteine bei der Auswahl und Anheftung an die Wirtszelle und stellen Interaktionen zwischen der

Wirtszelle und dem Parasiten zur Nutzung der zytoplasmatischen Strukturen der Wirtszelle her (Sam-Yellowe 1996; Ngo et al. 2004).

### 2.2.3.5 Dichte Granula

Bei den Dichten Granula handelt es sich um kleine, membrangebundene Vesikel mit dicht gepacktem granulärem Inhalt (Blackman und Bannister 2001). Es gibt auch hier, wie bei Mikronemen und Rhoptrien, Variationen in Anzahl und Größe, je nach Stadium und Spezies. Zuerst wurde die Isolierung von Dichte Granula mittels eines Saccharose-Gradienten bei Merozoiten von *S. tenella* beschrieben (Dubremetz und Dissous 1980; Mercier et al. 2005). Hier liegen sie in reichlicher Zahl vor, allerdings korreliert die Anzahl der Dichte Granula bei *Sarcocystis* nicht mit der Anzahl der vorhandenen Proteine (Dubremetz und Dissous 1980; Entzeroth et al. 1986). Das Spektrum der Proteine ist eher klein.

In ihrer Hauptfunktion helfen sie bei der Umnutzung der intrazellulären Umgebung zu einem aktiven Stoffwechselelement unter Ausbildung eines komplexen tubulären Netzwerkes (Daszak et al. 1993; Dubremetz et al. 1998; Blackman und Bannister 2001). Im Gegensatz zu den Rhoptrien und Mikronemen erfolgt die Sekretion der Proteine bei *S. muris* nicht apikal, sondern auf der gesamten Oberfläche des Parasiten (Entzeroth et al. 1986; Entzeroth et al. 1991). Ähnlich wurde die Sekretion bei *T. gondii* (Leriche und Dubremetz 1990) und *P. falciparum* (Torii et al. 1989; Culvenor et al. 1991) beschrieben. Eine Besonderheit bei *S. muris* stellt die Bildung einer zweiten Parasitophoren Vakuole dar. Kurz nach dem Eindringen des Parasiten und Ausbildung der ersten Parasitophoren Vakuole entledigt sich der Parasit dieser, und formt eine neue Membranverbindung, die zweite Parasitophore Vakuole, aus (Entzeroth et al. 1986; Sam-Yellowe 1996).

Bisher wurden drei Dichte Granula-Proteine bei *S. muris* (Sm21, Sm26 und Sm32 (Strobel et al. 1992; Freyer et al. 1998; Freyer et al. 1999; Hansner et al. 1999)) und eines bei *S. tenella* (St41 (Dubremetz und Dissous 1980)) beschrieben. Sm21 ist mit einer Thiolprotease gekoppelt und wird in der zweiten Parasitophoren Vakuole exozytiert. Hierbei bildet es innerhalb des Kompartiments eine durchgehende Schicht um den sich entwickelnden Gamonten (Sam-Yellowe 1996; Hansner et al. 1999). Das Gen von Sm32 ist bisher das einzige auf Genomebene bekannte Dichte Granula-Protein von *Sarcocystis* (Freyer et al. 1998; Freyer et al. 1999).

### 2.2.4 Besonderheiten im Immunsystem des Schweins

Die Immunglobuline des Schweins wurden bereits in den sechziger Jahren klassifiziert. Drei Haupttypen konnten hierbei ermittelt werden: IgM, IgG und IgA. IgD scheint beim Schwein vollständig zu fehlen und das Vorkommen von IgE wird bisher lediglich vermutet. Schweine haben wie der Mensch sowohl eine leichte  $\lambda$ - als auch eine leichte  $\kappa$ - Kette und die Vorkommenshäufigkeit der Immunglobuline ist vergleichbar mit der des Menschen. Trotz ihrer stammesgeschichtlich unterschiedlichen Herkunft, weisen die genetischen Grundlagen der Immunglobuline von Mensch und Schwein einen hohen Grad an Ähnlichkeiten auf (Butler und Brown 1994; Butler 1998).

IgG stellt wie bei anderen Säugetieren das Hauptimmunglobulin im Serum dar (Rejnek et al. 1966). Bisher konnten fünf Subklassen charakterisiert werden: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub> und IgG<sub>4</sub> (Curtis und Bourne 1971; Olsovská et al. 1982; Bokhout et al. 1986; Van Zaane und Hulst 1987). IgG spielt die Hauptrolle bei der Antikörpervermittelten Immunabwehr. Auf Grund seiner geringen molekularen Größe kann es bei entzündlichen Prozessen problemlos aus Blutgefäßen in das umliegende Gewebe diffundieren (Tizard 2004). Beim Schwein wird eine Korrelation von IgG<sub>2</sub> mit Th<sub>1</sub>- sowie von IgG<sub>1</sub> mit Th<sub>2</sub>-Zellen vermutet (Crawley und Wilkie 2003). Für das Modell an Maus und Ratten liegen ausführlichere Informationen vor (Butler 1998).

IgM und IgA treten vor allem im Magen-Darm-Trakt beim Schwein auf. Hier finden sich die Immunglobuline in den Peyer'schen Platten. Aber auch die Sekretion von IgA über nasale und tracheale Schleimhäute wurde beschrieben (Butler und Brown 1994). Des Weiteren stellen IgA und IgG den Hauptbestandteil der Immunglobuline im porcinen Kolostrum (Butler 1998). Eine IgE-ähnliche Reaktion wurde bei Infektionen mit *Ascaris suum* beobachtet (Barriga und Ingalls 1984), Nachweise für IgD des Schweines basieren auf der Zell-Oberflächenerkennung eines Antikörpers, der gegen humanes IgD gerichtet war (Zikan et al. 1983).

Der Wissenstand zur Immunologie des Schweins hat sich in den letzten zehn Jahren stark weiterentwickelt.

Das Ergebnis einer internationalen Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Immunologie des Schweins war ein mittlerweile dritter internationaler Workshop über porcine Leukozytendifferenzierungsantigene. Im Verlauf eines Ringversuchs wurden monoklonale Antikörper analysiert und bestimmten Antigenen zugeordnet (Lunney

1993; Saalmüller et al. 1994b; Saalmüller und Bryant 1994; Saalmüller 1996; Saalmüller et al. 1998a; Saalmüller et al. 1998b; Haverson et al. 2001a; Haverson et al. 2001b; Saalmüller et al. 2001). Mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper ist es möglich, porcine Immunzellpopulationen zu erfassen, zu isolieren und ihre Funktion und Interaktion mit anderen Zellpopulationen zu analysieren. Als Folge hiervon war es möglich drei Hauptpopulationen von Immunzellen zu definieren (Saalmüller et al. 1998c; Saalmüller et al. 2002):

Monozyten bzw. myeloide Zellen exprimieren ein Oberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 200 kDa. Es ist für diese Zellen ein spezifischer Marker und wird als SWC (swine workshop cluster) 3-Antigen bezeichnet.

Porcine B-Lymphozyten verfügen über ein membranständiges Immunglobulinmolekül (surface Immunglobulin, slg) (van Zaane und Ijzerman 1984; Archetti et al. 1993) und lassen sich durch die Expression des B-Zell-spezifischen wCD21 erfassen (Saalmüller 1996; Saalmüller et al. 1996; Denham et al. 1998).

Die T-Lymphozyten des Schweins verfügen weder über slg noch über SWC3. Sie tragen im Ruhezustand das SWC1-Antigen (Saalmüller et al. 1994c), das bei aktivierten T-Zellen herabreguliert wird (Saalmüller et al. 1987a). SWC1 ist allerdings nicht T-Zell-spezifisch, da es in hoher Dichte auf Zellen der myeloiden Reihe und auch auf NK-Zellen exprimiert wird (Saalmüller und Reddehase 1988; Saalmüller und Bryant 1994).

Phänotypisch lassen sich somit die drei Zellpopulationen wie folgt darstellen:

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. myeloide Zellen, Monozyten | slg <sup>-</sup> SWC1 <sup>++</sup> SWC3 <sup>+</sup> |
| 2. B-Lymphozyten              | slg <sup>+</sup> SWC1 <sup>-</sup> SWC3 <sup>-</sup>  |
| 3. T-Lymphozyten              | slg <sup>-</sup> SWC1 <sup>+</sup> SWC3 <sup>-</sup>  |

Auffallend beim Schwein ist ein großer Anteil von T-Lymphozyten, die anstelle des  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptors (TcR) einen Rezeptor aus einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette aufweisen. Dieser  $\gamma\delta$ -TcR findet sich beim Menschen nur auf einer kleinen Zellfraktion, während  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut des Schafes (Mackay et al. 1986; Mackay und Hein 1991), Rindes (Mackay und Hein 1990) und Schweins wesentlich häufiger sind. Beim Schwein kann der Anteil bis zu 60% betragen (Hirt et al. 1990a; Saalmüller et al. 1990). Der Anteil dieser im Thymus gereiften  $\gamma\delta$ -TcR-Zellen an den mononukleären Zellen des peripheren Blutes ist altersabhängig, d.h. er ist umso größer, je jünger das Tier ist (Saalmüller et al. 1990). Während die Mehrzahl der humanen  $\gamma\delta$ -TcR-Zellen den Phänotyp CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> aufweisen und gleichmäßig im peripheren Blut und



Lymphgewebe verteilt sind (Groh et al. 1989), besitzen die porcinen  $\gamma\delta$ -TcR-Zellen im peripheren Blut den Phänotyp  $CD2^+CD4^+CD8^-$  (Saalmüller et al. 1990; Davis et al. 1998). Lediglich in den Lymphknoten und der Milz ist ein geringer Anteil von  $CD2^+CD4^+CD8^-$   $\gamma\delta$ -TcR-Zellen vorhanden (Saalmüller et al. 1989; Saalmüller et al. 1990). Biochemische Untersuchungen haben beim Schwein drei verschiedene Subtypen von  $\gamma\delta$ -TcR Molekülen aufgezeigt. Die Unterschiede liegen in der molekularen Masse der  $\gamma$ -Kette (37kDa, 38kDa, 46kDa), wohingegen die  $\delta$ -Kette mit 40kDa konstant zu sein scheint (Hirt et al. 1990a; Saalmüller et al. 1990; Thome et al. 1993). Über die Funktion dieser Zellpopulation ist trotz ihres hohen Anteils im Blut wenig bekannt. Bei Mensch und Maus wird eine Rolle im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr, etwa in Form eines Bindegliedes zwischen spezifischer und unspezifischer Immunreaktion vermutet (Raulet 1989; Allison und Havran 1991; Haas et al. 1993). Begründet wird dies u. a. durch die Lokalisation von  $\gamma\delta$ -Zellen in der Darmschleimhaut des Menschen, wo eine Art „Wächter“- Funktion im Rahmen der unspezifischen Abwehr sinnvoll erscheint (De Libero 1997). Eine ähnliche Aufgabe beim Schwein ist denkbar, da gerade beim jungen, schwach immunkompetenten Tier der Anteil der  $\gamma\delta$ -TcR-Zellen besonders hoch ist, und ein solches Bindeglied durchaus notwendig erscheint. Eine weitere Überlegung ist, dass  $\gamma\delta$ -TCR-Zellen bei Kokzidieninfektionen immunopathologische Reaktionen reduzieren oder sogar verhindern (Kaufmann et al. 1993; McMenemy et al. 1994). Untersuchungen haben gezeigt, dass  $\gamma\delta$ -TCR-Zell-depletierte Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren nach einer *E. vermiformis*-Infektion wesentlich schwerwiegendere pathologische Veränderungen im Darmgewebe aufwiesen (Roberts et al. 1996).

Als weitere Besonderheit des Immunsystems des Schweins ist die simultane Expression der Differenzierungsantigene CD4 und CD8 auf ruhenden, extrathymischen T-Lymphozyten anzusehen (Saalmüller et al. 1987b; Pescovitz et al. 1994b; Saalmüller und Bryant 1994), wodurch vier T-Zell-Subpopulationen entstehen. Das CD4-Antigen ist ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (Pescovitz et al. 1984; Pescovitz et al. 1985; Pescovitz et al. 1994a). Bei CD8 handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa (reduziert) und 70 kDa (nicht reduziert) (Jonjic und Koszinowski 1984; Saalmüller et al. 1996).

Die MHC-I-restringierte zytolytische Aktivität von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen kann durch monoklonale Antikörper blockiert werden (Saalmüller et al.

1994a), ebenso ist dies bei MHC-II möglich (Pescovitz et al. 1985; Summerfield et al. 1996b).

Der Anteil der  $CD4^+CD8^+$  T-Lymphozytensubpopulation ist bei neugeborenen Ferkeln äußerst gering (<1%), steigt mit zunehmendem Alter aber auf bis zu 60% der T-Zellpopulation an (Summerfield et al. 1996a; Zuckermann und Husmann 1996). Inzwischen wurde bewiesen, dass  $CD4^+CD8^+$ T-Zellen im Rahmen einer Aktivierung aus naiven  $CD4^+CD8^-$ T-Helferzellen entstehen (Saalmüller et al. 2002). Diese aktivierten T-Helferzellen behalten im Verlauf ihrer weiteren Differenzierung zu T-Helfer-Gedächtniszellen das exprimierte CD8-Antigen bei (Phänotyp  $CD4^+CD8^+$ ) (Summerfield et al. 1996a; Zuckermann und Husmann 1996; Ober et al. 1998a).

Die  $CD4^-CD8^-$  stellen eine weitere Subpopulation von T-Lymphozyten dar. Sie weisen in der Regel  $\gamma\delta$ -TcR auf und sind besonders bei jungen Tieren vorhanden (Saalmüller et al. 1998c).

Die Expression von CD8 ist heterogen. Wird CD8 stark exprimiert, handelt es sich um Vorläufer der CTL (Phänotyp  $CD4^-CD8^{+high}$ ), bei niedriger Expression handelt es sich um NK-Zellen (Phänotyp  $CD4^-CD8^{+low}$ ).  $CD4^-CD8^+$  T-Zellen sind  $CD2^+$  und lassen sich durch CD5 weiter unterteilen.  $CD4^-CD8^{+low}CD5^-$  T-Zellen zeigen eine spontane zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen und charakterisieren die Population der NK-Zellen. Der Phänotyp  $CD4^-CD8^{+high}CD5^+$  hingegen stellt die MHC-gebundenen zytolytischen T-Zellen dar. CD5 ist zudem in hoher Dichte auf  $CD4^+$  T-Zellen nachweisbar, während die Expression auf  $\gamma\delta$ -TcR<sup>+</sup>-T-Zellen nur minimal ist (Saalmüller et al. 1994d).

Das Zusammenspiel der vier CD4/CD8 Subpopulationen ist kombiniert mit einer extrathymischen Reifung und der Differenzierung von naiven Zellen zu Gedächtniszellen. Bei durchflußzytometrischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass das prozentuale Verhältnis der Subpopulationen zueinander altersabhängig ist. Das Verhältnis zwischen  $CD4^-CD8^-$  und  $CD4^+CD8^+$  Zellen ist invers. Durch monoklonale Antikörper kann MHC-II inhibiert werden (Pescovitz et al. 1985; Summerfield et al. 1996b). Dies zeigt sich sowohl bei Lymphozyten aus dem Blut, wie auch bei Lymphozyten aus den Organen. Dieser Zusammenhang der Subpopulationen weist auf eine postnatale, antigenabhängige Reifung des porcinen Immunsystems hin (Saalmüller et al. 1998c; Saalmüller et al. 1999; Saalmüller et al. 2002).

Bei Mensch, Nager und Schaf konnte im Rahmen einer vorübergehenden Hochregulation die Expression von MHC-II-Antigenen auf T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Evans et al. 1978; Bevan und Chisholm 1986; Hopkins et al. 1986). Beim Schwein hingegen tragen sowohl ruhende  $CD4^-CD8^+$  zytolytische T-Lymphozyten als auch  $CD4^+CD8^+CD45RC^-$  T-Helfer-Gedächtniszellen auf ihrer Oberfläche MHC-II-Antigene (Saalmüller et al. 1991; Saalmüller und Maurer 1994; Saalmüller et al. 2002). Bei den  $CD4^+CD8^+CD45RC^-$  T-Helfer-Gedächtniszellen wird die Expression der MHC-II-Moleküle vergleichbar mit der CD8-Expression im Rahmen einer Aktivierung hochreguliert (Summerfield et al. 1996a). Auf Grund der MHC-II-Expression sind porcine T-Lymphozyten in der Lage, sich selbst untereinander Antigen zu präsentieren (Saalmüller und Maurer 1994).

Trotz der im Vergleich zu Mensch und Maus noch begrenzten Nachweisreagenzien, ist es in den letzten Jahren gelungen, eine relativ detaillierte Vorstellung vom porcinen Immunsystem zu erhalten. Damit wurde eine Basis zur weiteren Aufklärung der komplexen Reaktionen innerhalb des porcinen Immunsystems geschaffen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Medikamente

Narcoren (Merial, BRD)

#### 3.1.2 Chemikalien / Reagenzien

85%ige NaCl-Lösung (Braun, BRD)  
 Biocoll (Biochrom AG, BRD)  
 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, BRD)  
 Bovines Serum Albumin (Roth, BRD)  
 Concanavalin A (ConA) (Biochrom, BRD)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, BRD)  
 Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Roth, BRD)  
 Essigsäure (Roth, BRD)  
 Fötale Kälberserum (FKS) (Biochrom, BRD)  
 Kaliumchlorid (KCL) (Merck, BRD)  
 Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck, BRD)  
 Lipopolysaccharid E. coli O111B4 (LPS) (Sigma, BRD)  
 Natriumchlorid (NaCl) (Merck, BRD)  
 Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD) (Sigma, BRD)  
 Percoll (Amersham, Schweden)  
 Propium iodide (HPLC) (Sigma, BRD)  
 Rotizint (Roth, BRD)  
 Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck, BRD)  
 Sigma Fast DAB Tablet Sets (Sigma, BRD)  
 Trypan blue solution (0,4 %) (Sigma, BRD)  
 Trypsin 1:250 (Sigma, BRD)  
 Tween 20 (Sigma, BRD)  
 Wasserstoffperoxid, 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Roth, BRD)

### 3.1.3 Puffer, Lösungen, Medien

#### 3.1.3.1 Puffer

##### **PBS**

8,0 g NaCl

1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g KCL

ad 1 l mit A. dest., pH 7,4

##### **Blockierlösung für ELISA**

Grundrezept PBS

5,0 g BSA, Fraktion V

ad 1 l mit A. dest., pH 7,4

##### **Standardlösung für ELISA**

Grundrezept PBS

5,0 g BSA, Fraktion V

1 ml Tween 20

ad 1 l mit A. dest., pH 7,4

##### **Waschpuffer für ELISA**

Grundrezept PBS

1 ml Tween 20

ad 1 l mit A. dest., pH 7,4

##### **Stoplösung für ELISA**

1,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### 3.1.3.2 Lösungen

##### **0,25%ige Trypsin-Lösung**

2,5 g Trypsin ad 1 l mit PBS, pH 7,2

**Isotonische Stammlösung**

Verdünnung 1:10 von Percoll + 1,5 m NaCl

**3.1.3.3 Medien****Lymphozytenkulturmedium**

RPMI 1640	(Sigma, BRD)
Penicillin-Streptomycin Solution (50 IU/ml, bzw. 5 mg/ml)	(Sigma, BRD)

**RPMI+**

500 ml RPMI  
50 ml FKS  
5 ml Penicillin (50 IU/ml) / StrPEtomycin(5 mg/ml)

**Einfriermedium**

100 ml DMSO  
900 ml RPMI+

**3.1.4 Antikörper, Konjugate****3.1.4.1 Monoklonale Antikörper gegen porcine Zellmarker**

CD2	MSA4 (Maus-IgG <sub>2a</sub> )	} Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Saalmüller, Institut für klinische Immunologie, Veterinär- medizinische Universität Wien (A) (BD PharMingen, USA)
CD4	mAK 74-12-4 (Maus-IgG <sub>2b</sub> )	
CD5	B53b7 (Maus-IgG <sub>1</sub> )	
CD8	11/295/33 (Maus-IgG <sub>2a</sub> )	
SWC3	74-22-15 A (Maus-IgG <sub>2b</sub> )	
CD21	B-ly4 (Maus-IgG <sub>1</sub> )	

**3.1.4.2 Antikörper gegen porcine Zytokine**

Anti-Schwein IFN- $\gamma$ monoklonaler Antikörper	(Perbio Deutschland GmbH, BRD)
Anti-Schwein IFN- $\gamma$ polyklonaler Antikörper	(Perbio Deutschland GmbH, BRD)

#### 3.1.4.3 Konjugate

##### Fluorochrommarkierte Antikörper

Ziege-anti Maus-IgG1, PE-konjugiert	(Biozol, BRD)
Ziege-anti-Maus-IgG2a, PE-konjugiert	(Biozol, BRD)
Ziege-anti Maus-IgG2a, FITC-konjugiert	(Biozol, BRD)
Ziege-anti-Maus-IgG2b, FITC konjugiert	(Biozol, BRD)

##### Peroxidase markierter Antikörper

Peroxidase konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG	(Dianova, BRD)
--	----------------

#### 3.1.5 Radioaktive Substanzen

Methyl- <sup>3</sup> H Thymidin	(Amersham, Schweden)
---------------------------------	----------------------

#### 3.1.6 Testkits

Swine IL2 CytoSets	(Biosource, Belgien)
Swine IL4 CytoSets	(Biosource, Belgien)

#### 3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Dispenser-Tips, 5 ml, 2,5 ml, 0,5 ml	(Ritter, BRD)
EDTA-Röhrchen (9 ml)	(Sarstedt, BRD)
Einmalpipetten, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml	(Nunc, BRD)
FACS-Röhrchen	(Greiner, BRD)
Filtermatten für Zellerntegerät	(Fa. Malar, BRD)
Kanülen	
TSK-Supra, 15 x 100 und 1,2 x 75	(Luer, BRD)
Kryoboxen	(Ratiolab, BRD)
Kryoröhrchen, (1,8 ml)	(Nunc, BRD)
Lithium-Heparin-Röhrchen (9 ml)	(Sarstedt, BRD)
Mikrotiterplatten 96-well, Flachboden	(Nunc, BRD)

Mikrotiterplatten 96-well, Rundboden	(Nunc, BRD)
Mikrotiterplatten 96-well, V-Form	(Greiner, BRD)
Multiscreen-HA für Elispot	(Millipore, USA)
Nunc- Röhrchen (15 ml, 50 ml)	(Nunc, BRD)
Nunc-Immuno Plate Maxisorb für ELISA	(Nunc, BRD)
Pipettenspitzen (100 µl, 200 µl)	(Sarstedt, BRD)
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	(Eppendorf, BRD)
Sterilfilter Millex-GV	(Millipore, USA)
Szintillationsgefäße Mini Vials B	(Roth, BRD)
Gaze / Verbandsmull	(Noba, BRD)

### 3.1.8 Geräte

Brutschrank	
Typ B5060 EC/CO 2	(Heraeus, BRD)
Durchflußzytometer	
PEICS ELITE	(PEICS Division of Coulter corporation, USA)
ELISA-Meßgerät	
Enux Molecular Devices	(MWG-Biotech, BRD)
ELISPOT-Meßgerät	
AID Elispot Reader V3.Ob3	(Autoimmune Diagnostika GmbH, BRD)
Feinwaagen	
216 MP	(Sartorius, BRD)
Mikroskop	
Dialux 20 EB	(Leica, BRD)
Standmixer MX 32	(Braun, BRD)
Sterilbank	
Gelaire Flow Laboratories Typ HF A72	(Heraeus, BRD)
Wasserbad GFL	(W. Vogel, BRD)
Zählkammer nach Neubauer improved	(Optik Labor, BRD)
Zellerntegerät	
Semiautomatic Cell Harvester	(Skatron, Norwegen)



Zentrifugen	
Minifuge RF	(Heraeus, BRD)
Multifuge 3 L-R	(Heraeus, BRD)
Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2700 TR	(Packard Instrument Company, BRD)

#### 3.1.9 Computerprogramme

##### **ELISA**

Softmax für Windows Version 2.31	(Molecular Devices GmbH, BRD)
----------------------------------	-------------------------------

##### **ELISPOT**

AID Elispot Reader System Version 2.**	(Autoimmune Diagnostika GmbH, BRD)
--	---------------------------------------

##### **FACS**

FCS-Express 2	(De Novo Software, Kanada)
---------------	----------------------------

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Klinische und diagnostische Methoden**

#### **3.2.1.1 Versuchstiere**

Bei den Versuchstieren handelte es sich um insgesamt 8 Schweine der Rasse Europäisches PE (PE), 7 Schweine der Rasse Chinesisches ME (ME) und um 43 Kreuzungstiere aus den Rassen PE und ME (F2). Die ME und die Kreuzungstiere der F2-Generation wurden an der Versuchstierstation Unterer Lindenhof der Universität Hohenheim erzeugt und aufgezogen. Als Elterntiere für die F1-Generation dienten ein reinerbig stressstabiler Eber der Rasse PE sowie mehrere Sauen der Rasse ME. Die F1-Generation wurde untereinander verpaart, um die benötigte F2-Generation zu erstellen.

Die Schweine der Rasse PE stammen aus der spezifisch-pathogen-freien (spf) Zucht der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU Giessen.

4 PE, 4 ME und 39 F2 wurden für den Versuch mit *S. miescheriana*-Sporozoitien infiziert, während 4 PE, 3 ME und 4 F2 als nicht infizierte Kontrolltiere eingesetzt wurden.

Die Schweine waren durch Tätowierung und Ohrmarke dauerhaft und individuell gekennzeichnet.

#### **3.2.1.2 Aufstallung der Versuchstiere**

Im Alter von 8 bis 12 Wochen wurden die Tiere in Gruppen von 6 bis 11 Tieren im Versuchstierstall der Professur für Schweinekrankheiten der JLU Giessen aufgestellt. Es handelte sich um einen Außenklimastall mit vier gefliesten Buchten und Stroheinstreu.

Als Kontrollgruppen dienten je 4 Tiere der Rasse PE und der F2-Generation sowie 3 ME-Schweine. Diese Tiere wurde im Stall des Instituts für Parasitologie der JLU Giessen aufgezogen. Eine räumliche Trennung der Kontrolltiere von den infizierten

Gruppen war notwendig, um eine mögliche Infektion der Tiere durch verunreinigtes Arbeitsgerät oder Arbeitskleidung zu vermeiden.

Das Betreten der Ställe war nur mit separater Arbeitskleidung erlaubt. Vor Betreten des Stalles musste eine Wanne mit Desinfektionslösung durchquert werden. Der Infektionsstall wurde durch Tierpfleger der Professur für Schweinekrankheiten betreut, während die Kontrollgruppen von den Tierpflegern des Instituts für Parasitologie versorgt wurden. Dies war nötig, um eventuelle Übertragungen von Krankheitserregern zu vermeiden.

#### **3.2.1.3 Klinische Untersuchung**

Am Tag nach der Einstellung wurde eine gründliche klinische Untersuchung der Tiere vorgenommen (Gesundheitsstatus). Hierbei wurde Blut für die Erstellung eines Differentialblutbildes entnommen. Des Weiteren wurden Sammelkotproben für die parasitologische und bakteriologische Diagnostik eingesammelt. In den folgenden 2 Wochen wurden die Tiere täglich untersucht. Beurteilt wurden das Allgemeinbefinden, der Ernährungszustand, die Haut- und Schleimhautfarbe sowie die Parameter von Atmung, Herz und Temperatur.

Im Alter von ca. 12 Wochen erfolgte die orale Infektion mit 50.000 Sporozysten von *Sarcocystis miescheriana* pro Tier. Im weiteren Verlauf der Infektion erfolgte eine klinische Kontrolle des Gesundheitszustandes der Tiere an den Tagen 0, 7, 14, 28, 42, und 70 post infectionem (p. i.).

Am 70. Tag p. i. erfolgte die Euthanasie der Tiere mittels einer Überdosis Narcoren intravenös. Alle Tiere wurden im Anschluss unverzüglich im Institut für Veterinärpathologie der JLU Giessen seziiert. Hierbei wurden Proben aus der Herzmuskulatur und dem *Musculus longissimus dorsi* (M.l.d.) zur histologischen Beurteilung und zur Bestimmung der Zystozoenzahl entnommen.

#### **3.2.1.4 Fütterung und Medikation der Versuchstiere**

Die Tiere wurde mit einem pelletiertem Alleinfuttermittel für Schweine (RWZ-Universal Mast gepr. 12,6 MJ ME/kg, Raiffeisen, Waren-Zentrale Rhein-Main eG) *ad libitum* über Trockenfutterautomaten gefüttert. Als Einstallmetaphylaxe wurde über

einen Zeitraum von 6 bis 9 Tagen das Futter ab Werk mit Tiamulin (0,2 g/kg Futter) und Tetrazyklin (1 g/kg Futter) gemischt verabreicht. Die Tränke erfolgte ebenfalls *ad libitum* über Tröge und Nippeltränken.

### **3.2.1.5 Blutgewinnung**

Die Blutgewinnung erfolgte durch Punktion der *Vena jugularis* an den Tagen 0, 14, 28, 42 und 70 p. i. nach Fixierung der Tiere mit einer Oberkieferschlinge. Hierbei wurden 18 ml Blut mit Lithium-Heparin-Röhrchen der Firma Sarstedt entnommen. Des Weiteren wurde 9 ml Vollblut für die Gewinnung von Serum benötigt. Aus dem Vollblut wurde nach Gerinnung durch Zentrifugation (400 x g, 10 min) Serum gewonnen, und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

### **3.2.1.6 Gewinnung von Parasiten**

Die Gewinnung des benötigten Infektionsmaterials erfolgte am Institut für Parasitologie der Universität Leipzig. Es handelte sich um ein Feldisolat von *S. miescheriana*. Zwei Schweine wurden mit 50.000 Sporozysten oral infiziert und am 70. Tag p. i. getötet. Das zystenhaltige Muskelfleisch wurde an zwei Hunde verfüttert. Aus dem Kot der Hunde wurden mittels Flotation mit ZnSO<sub>4</sub>-Lösung die infektiösen Sporozysten gewonnen. Die Sporozysten wurden dann in Wasser mit Penicillin (200 IU/ml), StrPEtomycin (200µg/ml) und Amphotericin B (1 µg/ml) konserviert und bei 4°C gelagert (Rommel et al. 1995).

### **3.2.1.7 Gewinnung und Konservierung von Zystozoen**

Die Gewinnung von *S. miescheriana*-Zystozoen erfolgte aus der Muskulatur infizierter Schweine. Hierzu wurden bei der Sektion der *Musculus longissimus dorsi* in toto und die linke Herzkammer entnommen.

Für die enzymatische Isolierung wurde das Fleisch von jeglichem Fett gesäubert und zu Aliquots von 100 g portioniert. Jedes Aliquot wurde mit 600 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung versetzt und im Standmixer 20 s zerkleinert. Die entstandene Muskelmasse wurde im Folgenden im Wasserbad 15 min bei 37° C gerührt. Die

Muskelmasse wurde dann durch dreilagige Gaze filtriert, wobei das Filtrat aufgefangen wurde. Es folgten eine Verdünnung des Filtrats 1:1 mit PBS und die Zentrifugation bei 2500 x g für 10 min. Das entstandene Pellet wurde dreimal mit PBS 10 min bei 2500 x g gewaschen und schließlich in PBS resuspendiert.

Um die Zystozoen vom Zelldetritus zu reinigen, wurde ein Reinigungsgradient erstellt. Hierzu wurde eine isotonische Stammlösung aus Percoll und 1,5 M NaCl hergestellt. Die isotonische Stammlösung wurde im Verhältnis 2:1 mit der nach der Verdauung erhaltenen Suspension gemischt und zu je 15 ml in Nunc-Röhrchen abgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte bei 1500 x g für 15 min bei 20° C. Der Gradient wies nun folgende Schichtung von oben nach unten auf: Fett und Zellreste → Percoll und Zellreste → Zystozoen und in der Spitze des Röhrchens kleinste Zelltrümmer. Mit einer Pipette wurde der Überstand bis auf die Sporozoitenschicht abgesaugt und verworfen. Die Fraktionen mit den Sporozoiten wurden gesammelt und in PBS resuspendiert. Es folgten drei Waschgänge mit PBS für 10 min bei 1500 x g. Schließlich wurden die gewonnenen Zystozoen in einer möglichst kleinen Menge PBS suspendiert.

Die Zystozoen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Zystozoen wurden möglichst konzentriert in PBS bei -80°C eingefroren (O'Donoghue und Weyreter 1983; Farooqui et al. 1987).

#### 3.2.1.8 Antikörper-Nachweis

Der Nachweis von *S. miescheriana*-spezifischem IgM, IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> wurde mittels ELISA an der Universität Hohenheim (Prof. Dr. Ute Mackenstedt) durchgeführt (Reiner et al. 2002b).

Für den Nachweis von IgM und IgG wurden ELISA-Platten (NUNC ImmunoPlate MaxiSorp) mit je 3 und 1 µg Antigen-Lösung beschichtet. Je 100 µl Serum-Verdünnung (1:300 in 1% BSA/PBS) pro Vertiefung wurden 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Inkubation mit jeweils 100 µl horseradish peroxidase-konjugiertem Anti-Schwein IgG oder IgM (Serotec) pro Vertiefung, gelöst 1:50.000 in 1 % BSA/PBS.

*S. miescheriana*-spezifische IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub>- Antikörper wurden über einen doppelten Sandwich-ELISA nachgewiesen (0,75 und 1,5 µg Antigen pro Vertiefung). Ansonsten glich die Durchführung dem obengenannten Verfahren. Als erstes Konjugat wurden Maus-Anti-Schwein IgG<sub>1</sub> (1:500) bzw. Anti-Schwein IgG<sub>2</sub> (1:300, beide Biozol), als

zweites Anti-Maus IgG-horseradish peroxidase-gbeundene Antikörper (Biozol) verwendet (IgG<sub>1</sub> 1:1000 bzw. IgG<sub>2</sub> 1:500).

Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Mikroplatten-Reader.

### 3.2.2 Immunologische Methoden

#### 3.2.2.1 Herstellung von Parasitenantigenen

Die Parasitologische Abteilung der Universität Hohenheim stellte über Prof. Dr. Ute Mackenstedt freundlicherweise für die Antigengewinnung einen Teil der bei ihnen gewonnenen Zystozoitien von *S. miescheriana* zur Verfügung. Des Weiteren lieferte sie für den gleichen Zweck dankenswerterweise Zystozoitien von *S. singaporensis* aus der Ratte.

Nachdem eine ausreichende Menge Bradyzoitien von *S. miescheriana* und *S. singaporensis* gesammelt worden war, wurden diese aufgetaut und einmal mit PBS bei 1500 x g für 10 min gewaschen. Mindestens 200 µl Bradyzoitien suspension wurden dann in Eppendorfgefäße abgefüllt und auf Eis gestellt. Jedes Gefäß wurde nun mindestens dreimal 20 s mit dem Ultraschallgerät bei einer Amplitude von 4 bis 6 µm bearbeitet. Zwischen den einzelnen Beschallungen lag mindestens eine Minute Pause, um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden. Mit dem Mikroskop wurde überprüft, ob alle Zystozoitien lysiert wurden. War dies der Fall, wurde die Suspension bei 28.000 x g 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände (Überstand 1) wurden gesammelt, das Pellet mit PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (28.000 x g ,15 min, 4° C). Auch hier wurde der Überstand (Überstand 2) gesammelt und das Pellet verworfen.

Im weiteren Verlauf wurden die erhaltenen Überstände sterilfiltriert. Zur Proteinbestimmung wurde der Bradford-Assay durchgeführt. Im Doppelansatz wurde eine Farbreihe von BSA-Standard (1 mg/ml) mit Bio-Rad Protein-Assay-Lösung angelegt. Eine entsprechende Verdünnungsreihe wurde mit einem Aliquot der filtrierten Überständen durchgeführt. Anhand einer Farbübereinstimmung von Überstand und BSA-Farbreihe konnte der Proteingehalt bestimmt werden.

Das Antigen wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml aliquotiert und bei –80°C eingefroren (O'Donoghue und Weyreter 1983; Farooqui et al. 1987).

### **3.2.2.2 Isolierung und Stimulation von porcinen Lymphozyten**

#### **3.2.2.2.1 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten**

Zur Gewinnung peripherer Blutlymphozyten (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus den infizierten Schweinen und den Kontrolltieren wurde das gewonnene heparinisierte Blut (siehe 3.2.1.5) im Verhältnis 1:1 mit einer sterilen 0,85%igen NaCl-Lösung versetzt. In einem 50 ml Nunc-Röhrchen wurden je 20 ml verdünntes Blut auf 10 ml Ficoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Dieser Gradient wurde dann 45 min bei 1500 U/min und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren die PBMC als grauweiße Interphase erkennbar und wurden vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die PBMC wurden in RPMI+ gelöst und dreimal 10 min bei 400x g gewaschen. Abschließend wurden die PBMC in 5 ml RPMI+ suspendiert (Pescovitz et al. 1985; Summerfield et al. 1996b).

#### **3.2.2.2.2 Bestimmung der Anzahl lebender Zellen und der Gesamtlymphozytenzahl**

Zur Bestimmung der Gesamtlymphozytenzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 3%iger Essigsäure im Verhältnis 1:10 versetzt. Durch die Essigsäure wurden die Zellen lysiert, und die Anzahl der Zellkerne konnte in der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

Um den Anteil der lebenden und toten Lymphozyten festzustellen, wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit 0,25%iger Trypanblaulösung durchgeführt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde nach Anfärben mit der 0,25%igen Trypanblaulösung (1:10) in einer Neubauer-Zählkammer untersucht. Zur weiteren Präparation wurden nur Proben mit mehr als 95 % lebenden, d.h. ungefärbten Zellen verwendet.

#### **3.2.2.2.3 Einfrieren von Zellen**

Ein Teil der Zellen wurde eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt die anstehenden FACS-Analysen sowie den ELISPOT durchführen zu können.  $2 \times 10^6$ /ml Zellen wurden hierzu mit Einfriermedium versetzt und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

#### 3.2.2.2.4 Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden zügig im 37° C Wasserbad aufgetaut, sofort in 5 ml RPMI aufgenommen und zweimal gewaschen (10 min, 400 x g). Anschließend wurden sie in RPMI+ resuspendiert.

#### 3.2.2.2.5 Lymphozytenproliferationsassay

Mit dem Lymphozytenproliferationsassay lassen sich antigenspezifische T-Zellen nachweisen. Die Zellen treten als Reaktion auf einen Stimulus durch Antigen in den Zyklus ein, d.h. sie proliferieren und inkorporieren Vorläufer der DNA-Synthese. Bei Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin nehmen die aktiven Zellen dieses auf und bauen es in die DNA ein. Das eingebaute <sup>3</sup>H-Thymidin wird im β-Szintillationszähler gemessen und erlaubt eine Aussage darüber, ob die Lymphozyten eine Transformation durchgemacht haben und somit für das entsprechende Antigen sensibilisiert waren.

Für den Lymphozytenproliferationsassay wurden die PBMC nach ihrer Isolierung auf eine Dichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Lymphozytenkulturmedium suspendiert. Je Probe wurden 100 µl Zellsuspension in jede Vertiefung auf einer Rundbodenmikrotiterplatte verteilt. Für jedes Stimulans und für die Negativkontrollen wurden jeweils Triplets angesetzt.

Für die Positivkontrollen wurde von den unspezifischen Mitogenen Concanavalin A (Con A: 5 µg/ml) und Lipopolysaccharid (LPS: 10 µg/ml) je 100 µl hinzugegeben und 48 h bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die optimalen Konzentrationen für Con A und LPS wurden mittels Schachbrettverfahren austitriert.

Die Stimulation mit den spezifischen Antigenen aus *S. miescheriana* (10 µg/ml) oder *S. singaporensis* (10 µg/ml) dauerte 96 h unter sonst gleichen Bedingungen. Als Negativkontrollen dienten Triplets, welche nur Zellsuspension und RPMI+ enthielten. Als weitere Kontrolle wurden Zellen mit MOCK (10 µg/ml) stimuliert. Dieses Antigen wurde aus nicht-infizierten Schweinemuskeln gewonnen, welche genauso behandelt wurden wie das mit *S. miescheriana* infizierte Gewebe. Die Differenz zwischen der Stimulationsrate von spezifischem Antigen und MOCK lässt eine Aussage über die Spezifität des Antigens zu.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden vorsichtig 100 µl Überstand pro Well abgenommen, welche bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurden.



Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin markiert und für weitere 18 h inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf Filterpapier geerntet. Nach dem Trocknen wurden die einzelnen Filterteilchen mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und luftdicht verschlossen. Die Messung der Proben im  $\beta$ -Szintillationszähler erfolgte am Strahlencentrum der JLU Giessen. Ermittelt wurde die Radioaktivität in counts per minute (CPM). Die Differenz aus dem Mittelwert eines stimulierten Triplets und dem CPM-Mittelwert eines Kontrolltriplets stellt den Stimulationsindex (SI) dar.

#### **3.2.2.3 Phänotypisierung von Lymphozytenpopulationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie**

Lymphozytensubpopulationen können durch Fluoreszenzmarkierung von zellspezifischen Oberflächenantigenen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern phänotypisch charakterisiert werden.

##### **3.2.2.3.1 Durchflußzytometrische Analysen**

Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden mit einem Durchflußzytometer, welches mit einem Argon-Laser ausgerüstet ist, analysiert. Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen werden mit Hilfe spezifischer Detektoren gemessen. Die Streulichtparameter sind fluoreszenzunabhängig und beinhalten das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) definiert die Zellpopulation aufgrund ihrer Größe. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) stellt ein relatives Maß für die intrazelluläre Granulation der Zellen dar.

Für die spezifische Markierung wird Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Diese emittieren nach Anregung mit einem Laser Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge, das nach Auftrennung durch unterschiedliche Filter und dichroische Spiegel von den spezifischen Detektoren analysiert werden kann.

Für die Analysen wurden zwei unterschiedliche Farbstoffe verwendet: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). FITC emittiert grünliches Licht und PE gelbes. Die Achsen der beiden Fluoreszenzsignale wurden so gewählt,

dass sie orthogonal zueinander standen. Dies erlaubte die Durchführung von 3 Doppelfärbungen, welche eine bessere Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen ermöglichte.

### 3.2.2.3.2 Verwendete Antikörperkombinationen

Für die Erkennung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen wurden verschiedene Antikörperkombinationen zur Identifikation von CD-Antigenen (Cluster of Differentiation, CD) auf Leukozyten des Schweins verwandt. Fünf der verwendeten monoklonalen Primär-Antikörper stammen aus der Maus und wurden freundlicherweise von PD Dr. Saalmüller, BFAV Tübingen, zur Verfügung gestellt. Anti-CD21 wurde über die Firma BD PharMingen bezogen. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte über Sekundär-Antikörper mit dem jeweiligen Isotyp des Primär-Antikörpers. Tabelle 1 gibt einen Gesamtüberblick über die verwendeten Doppelmarkierungen.

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörperkombinationen**

	Primär-Antikörper (Maus anti Schwein)			Sekundär-Antikörper (Ziege anti Maus)	
	Spezifität	Klonname	Isotyp	Spezifität	Konjugat
1. Doppel- Markierung	Anti-CD4	74-12-4	IgG <sub>2b</sub>	Anti-IgG <sub>2b</sub>	FITC
	Anti-CD8	11/295/33	IgG <sub>2a</sub>	Anti-IgG <sub>2a</sub>	PE
2. Doppel- Markierung	Anti-CD2	MSA4	IgG <sub>2a</sub>	Anti-IgG <sub>2a</sub>	FITC
	Anti-CD5	B53b7	IgG <sub>1</sub>	Anti-IgG <sub>1</sub>	PE
3. Doppel- Markierung	Anti-SWC3	74-22-15 A	IgG <sub>2b</sub>	Anti-IgG <sub>2b</sub>	FITC
	Anti-CD21	B-ly4	IgG <sub>1</sub>	Anti-IgG <sub>1</sub>	PE

### 3.2.2.3.3 Zweifarbenimmunofluoreszenz

Die eingefrorenen PBMC wurden zügig aufgetaut, gewaschen und in Lymphozytenkulturmedium suspendiert. Jeweils 100 µl einer Gebrauchssuspension mit  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung wurden in eine V-Form-Platte abgefüllt. Diese wurde bei 300 x g, 7 min zentrifugiert und anschließend ausgeschlagen. Die Zellen wurden dann in

50 µl des Primär-Antikörpers (Verdünnung 1:10 mit PBS) resuspendiert und 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte zentrifugiert (300 x g, 7 min) und ausgeschlagen. Das Sediment wurde mit 100 µl PBS aufgemischt und erneut zentrifugiert. Nach Ausschlagen der Platte wurden 50 µl/Vertiefung des Sekundär-Antikörpers hinzugegeben (Austitrierung der Gebrauchsverdünnung erfolgte im Schachbrett-Verfahren). Diesem war zur Unterscheidung der toten und lebenden Zellen Propidiumiodid (2 µg/ml) beigemischt worden. Propidiumiodid färbt tote Zellen ein, während lebende Zellen den Farbstoff aktiv aus ihrem Zellinneren entfernen können. Die Inkubation erfolgte wie oben beschrieben. Im weiteren Verlauf wurde die Platte zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 50 µl PBS resuspendiert und in Teströhrchen mit 200 µl PBS überführt. Die Teströhrchen wurden zum Messen in das FACS-Gerät eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche nur mit PBS inkubiert worden waren. Die Konjugatkontrollen enthielten nur den Sekundär-Antikörper.

Alle Antikörper und Konjugate wurden vor der Verwendung in der Durchflußzytometrie austitriert und in PBS entsprechend verdünnt. Kreuzreaktivitäten mit anderen Isotypen bestanden nach Saalmüller et al. (1989) nicht.

#### **3.2.2.3.4 Auswertung der Durchflußzytometriedaten**

Die in der FACS-Analyse erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogrammes FCS Express 2.0 ausgewertet. Es wurden bei jeder Probe mindestens 5000 Zellen analysiert. Die Fluoreszenzen einer Doppelmarkierung wurden gegeneinander aufgetragen und als zweidimensionales Konturenbild dargestellt (contour plot). Im Konturenbild konnten vier Quadranten definiert werden, die doppelnegative (Quadrant III), einfachpositive (Quadranten I und IV) und doppelpositive (Quadrant II) Zellpopulationen enthielten. Der Anteil jeder Zellpopulation wurde als Prozentsatz ausgedrückt.

### **3.2.2.4 Funktionelle Tests**

#### **3.2.2.4.1 Zytokinnachweise**

##### **3.2.2.4.1.1 Bestimmung des Interleukin-2 und Interleukin-4-Gehaltes in Zellkulturüberständen**

Die Bestimmungen erfolgten in Inkubationsüberständen (vgl. 3.2.2.2.5) mittels ELISA. Dazu wurden die Testkits Swine IL-2 CytoSets und Swine IL-4 CytoSets der Firma Biosource, USA, verwendet. Die Tests wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die ELISA-Platten wurden mit 100 µl/Vertiefung Coating-Antikörper 18 h bei 4° C inkubiert, einmal gewaschen und 2 h bei RT mit RPMI+ geblockt. Nach vier Waschgängen wurden je 100 µl der gesammelten Überstände sowie 100 µl Standardlösung-IL-2 oder -IL-4 im Doppelansatz aufgetragen und mit je 50 µl Nachweis-Antikörper versetzt. Hierauf folgte eine Inkubation über 2 h bei RT auf einem Schüttler (700 rpm). Anschließend wurde die Platte viermal gewaschen, dann mit je 100 µl Streptavidin-HRP versetzt und 30 min inkubiert (RT, auf Schüttler, 700 rpm). Nach vier Waschgänge folgten die Zugabe von 100 µl OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1,8 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Extinktion wurden bei 490 nm gemessen.

##### **3.2.2.4.1.2 Bestimmung der Interferon-γ-Produktion im ELISPOT**

Beim ELISPOT handelt es sich um einen enzymatischen Test, der den Nachweis funktioneller T-Zellen anhand der löslichen Zytokine ermöglicht. Durch die Bindung des Zytokins an die Nitrozellulose auf der Platte, lässt sich der Komplex anfärben und wird als punktartige Fläche, der so genannte Spot, sichtbar. Das vorliegende Protokoll wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Saalmüller an der BFAV Tübingen entwickelt.

Bei diesem Test wurde eine Nitrozelluloseplatte mit einem aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörper gegen Schwein IFN-γ (5 µg/ml) inkubiert (18 h bei 4° C). Es folgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS. Nach dem Auftragen von 200 µl RPMI+ je Vertiefung wurde die Platte 2 h bei RT geblockt. In der Zwischenzeit

wurden aufgetaute Zellen zu einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI+ suspendiert. Nach Beendigung der Inkubation der Platte wurde das RPMI+ abgesaugt und durch 100  $\mu$ l der Zellsuspension pro Vertiefung ersetzt ( $5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung). Des Weiteren wurden die bereits beim Lymphozytenproliferationsassay verwendeten Stimulantien zu je 100  $\mu$ l im Doppelansatz zugegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 48 h wurden die Platten dreimal gewaschen und mit je 100  $\mu$ l Kaninchen-Anti-Schwein IFN- $\gamma$ -Serum (2,5  $\mu$ g/ml) 1 h bei RT inkubiert. Es folgten ein dreimaliger Waschgang und die Inkubation mit peroxidase-konjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen IgG (1:200, 1 h, RT). Schließlich wurden je 100  $\mu$ l DAB + Urea (Sigma Fast DAB Tablet Sets gemäß Gebrauchsanweisung angemischt) zugegeben (4 bis 7 min). Zum Abschluss wurde die Platte fünfmal mit PBS und dreimal mit A. dest. gewaschen und bei RT getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem AID ELISPOT-Reader an der BFAV Tübingen (Armengol et al. 2002)

### 3.3 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung von BMDP/Dynamic durchgeführt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichungen ( $s$ ), Minima ( $x_{\min}$ ), Maxima ( $x_{\max}$ ) und Stichprobenumfänge ( $n$ ) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die Daten wurden in Form von Verlaufskurven und Balkendiagrammen graphisch dargestellt. Für diesen Zweck wurde das PC-Programm Microsoft Excel verwendet.

Um zu prüfen, ob sich die Gruppen untereinander bezüglich ihrer Rasse, der Infektion und des Messzeitpunktes unterscheiden und eine Wechselwirkung zwischen diesen Faktoren besteht, wurden sowohl eine dreifaktorielle als auch eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Für die Bewertung der Signifikanz von Unterschieden wurde folgende Bezeichnungsweise verwendet:

$p < 0,05$  = signifikant

$p < 0,001$  = hoch signifikant

# 4 Ergebnisse

Hinweis: Sämtliche Ergebnisse der nicht infizierten Kontrollgruppen werden auf Grund der Übersichtlichkeit in Kapitel 8.1 des Anhangs dargestellt.

## 4.1 Ergebnisse der klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen

### 4.1.1 Klinische Eignung der Versuchstiere

Die Tiere wurden am Tag nach ihrer Einstellung einer gründlichen klinischen Untersuchung unterzogen.

Für labordiagnostische Untersuchungen wurden Blut-, Nasentupfer- und Kotproben entnommen. Im Blut wurden neben einem Differentialblutbild die Gesamtleukozytenzahl sowie der Hämatokrit bestimmt. Bei einem gesunden Schwein liegt der Normalbereich für die Gesamtleukozytenzahl zwischen 10,5 und 21,4 G/l und der Normalbereich für den Hämatokrit zwischen 33 und 45 Vol.-% (Plonait und Bickhardt 1988). Die Blutwerte sämtlicher Tiere lagen zum Zeitpunkt der Einstellung im angegebenen physiologischen Bereich.

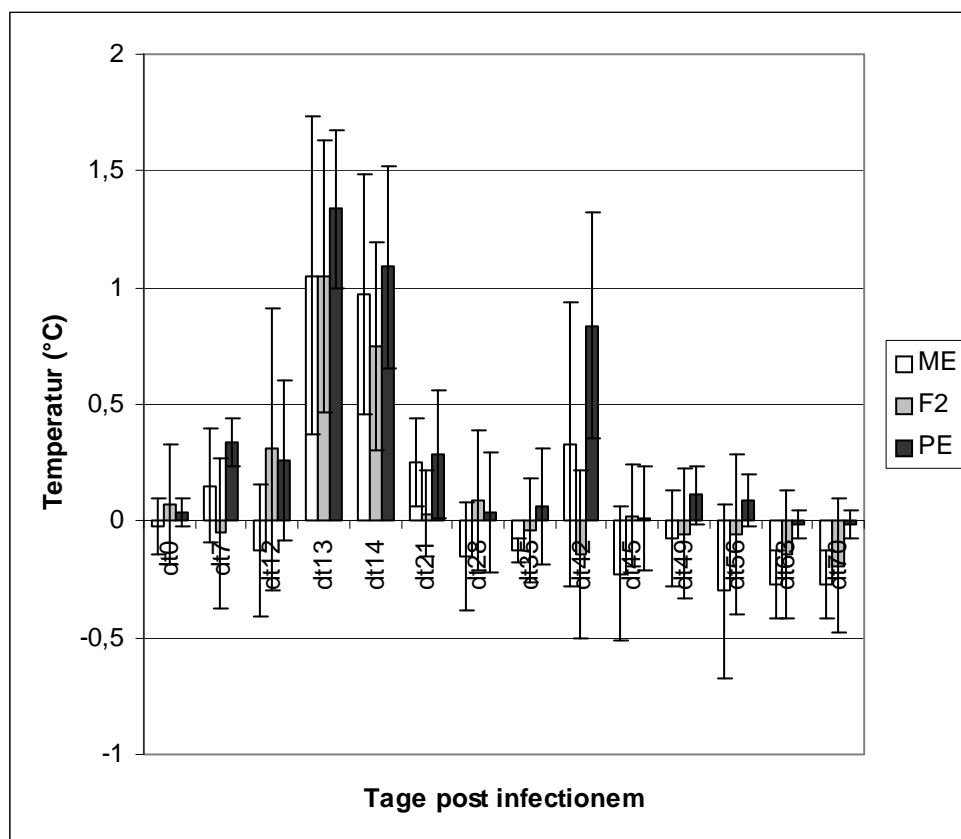
Die bakteriologische und mykologische Untersuchung der Nasentupferproben u. a. auf *E. coli*, hämolysierende Streptokokken, *Pasteurella multocida*, *Staphylokokkus Epidermidis*, *Bordetella bronchiseptica* und Schimmelpilze ergab eine Mischflora. Da die Tiere jedoch prophylaktisch mit Antibiotika behandelt wurden (vgl. Kap. 3.2.1.4), wurde das Vorhandensein dieser Keime als nicht relevant angesehen.

In den untersuchten Kotproben waren keinerlei Parasitenstadien nachweisbar. Auch die bakteriologische Untersuchung (gleiches Profil wie Nasentupferproben) ergab keine Anhaltspunkte für eine bestehende Infektion zu Versuchsbeginn.

### 4.1.2 Körpertemperatur der Versuchstiere im Verlauf der *S. miescheriana*-Infektion

Die durchschnittliche Körpertemperatur unmittelbar vor der Infektion mit *S. miescheriana* lag bei allen Gruppen zwischen 39,1°C und 39,6°C (Abb. 1). In den Kontrollgruppen kam es im Untersuchungszeitraum zu einem leichten, altersbedingten Rücklauf der Körpertemperaturen ( $p < 0,005$ ). Insgesamt lagen dabei die Körpertemperaturen der PE signifikant ( $p < 0,05$ ) über denen der ME- und F2-

Schweine. Die infizierten Tiere zeigten 14 Tage p. i. eine Temperaturerhöhung auf durchschnittlich 40,5 °C (PE), 40,2 °C (ME) und 40 °C (F2) (Abb. 1). Um den 21. Tag p. i. erreichte die Körpertemperatur wieder den Ausgangswert und blieb bei F2-Tieren bis zum Ende der Untersuchung (70. Tag p. i.) stabil. Bei PE konnte ein zweiter Fieberschub auf über 40,2 °C zwischen den Tagen 42 und 45 p. i. beobachtet werden. Die ME wiesen hier nur eine leichte Erhöhung auf 39,5 °C auf. Unabhängig von diesen offensichtlich infektionsbedingten Veränderungen lagen die Körpertemperaturen bei PE generell und signifikant ( $p < 0,001$ ) über denen der übrigen Tiere. Die Veränderungen im Zeitverlauf waren bei allen Gruppen mit  $p < 0,0001$  signifikant.



**Abbildung 1: Entwicklung der mittleren Körpertemperatur bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***



### 4.1.3 Veränderungen im Blutbild im Verlauf der Infektion

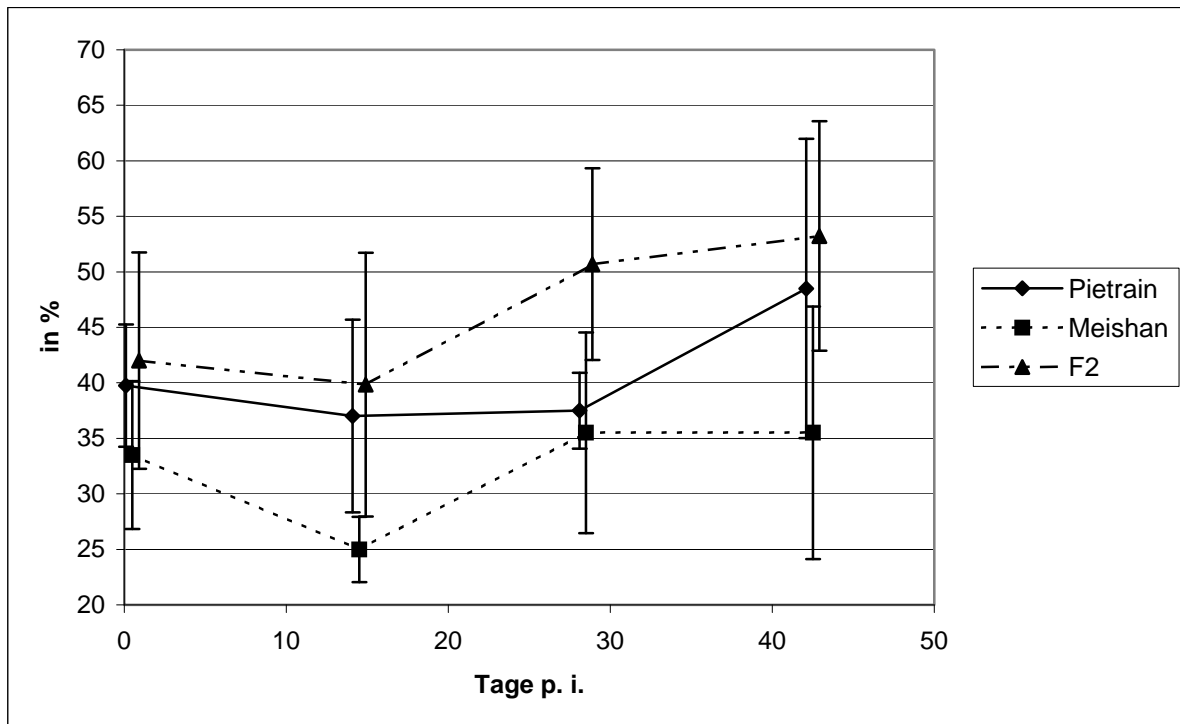
#### 4.1.3.1 Lymphozyten

Die Ergebnisse des Differentialblutbildes wurden im Rahmen des Forschungsprojektes an der Professur für Schweinekrankheiten der JLU Giessen ausgewertet (Hepp und Reiner 2006). Mit Hilfe eines nach Pappenheim gefärbten EDTA-Blutausstriches wurde durch Auszählung von 100 Zellen mikroskopisch der prozentualen Anteile der Lymphozyten, segmentkernigen Granulozyten, stabkernigen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, Monozyten, das Ausmaß an Polychromasie, Poikilozytose und Anisozytose der Erythrozyten sowie das Vorhandensein von Jollykörpern bestimmt.

Für die Auswertung der vorliegenden Arbeit sind jedoch lediglich die prozentualen Veränderungen der Lymphozyten im Verlauf der Infektion von Interesse.

In den ersten vierzehn Tagen nach der Infektion sank die Lymphozytenverlaufskurve bei ME ab und stiegen vom 21 - 42 Tag p. i. wieder auf das Niveau von vor der Infektion an (Abb. 2). Bei PE und F2-Tieren lagen die Zellzahlen von Beginn an höher als beim ME. Auch hier kam es zu einer geringen Absenkung innerhalb der ersten vierzehn Tage, bei PE sogar bis zum 28. Tag p. i., danach zeigte sich jedoch ein kontinuierliches Ansteigen der Verlaufskurve.

In der nicht infizierten Kontrollgruppen der ME kam es über den Versuchszeitraum zu keinen Veränderungen. Die PE hingegen zeigten ein kurzes Absinken der Kurve um den 14 Tag p. i., während die F2-Tiere zwischen dem 28. Tag p. i. und dem 42. Tag p. i. einen deutlichen Zellzahlabstieg aufwiesen (nicht dargestellt).



**Abbildung 2: Veränderungen des Anteils der Lymphozyten im Differentialblutbild bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***

## 4.2 Ergebnisse immunologischer Untersuchungen

### 4.2.1 Antikörperspiegel

#### 4.2.1.1 IgM-Antikörper

Die Bewertung der IgM-Antikörperspiegel und der Verlauf sind dadurch kompliziert, dass a) bei den nicht-infizierten Kontrollen relativ hohe OD zu verzeichnen waren und b) bei den Kontrollen Rasseunterschiede in der Höhe der OD und im Verlauf auftraten. Zusätzlich lagen die Ausgangswerte der PE erheblich über denen der anderen Gruppen, blieben danach aber konstant, während die OD bei den übrigen Kontrollen signifikant ( $p < 0,001$ ) mit dem Alter zunahm. Dies erlaubte nicht, einen gemeinsamen Schwellenwert festzulegen. Mit der dadurch notwendigen Zurückhaltung interpretiert, sprechen die Ergebnisse bei den infizierten Tieren für einen Anstieg der spezifischen IgM-Antikörper zwischen der 2. und 4. Woche p. i., einen anschließenden plateauartigen Verlauf mit einem Rückgang der Antikörperspiegel nach der 6. Woche p. i.. Die Veränderungen über die Zeit waren signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Antikörperspiegel der F2-Schweine lagen signifikant ( $p < 0,001$ ) über denen der reinrassigen Tiere (Abb. 3).

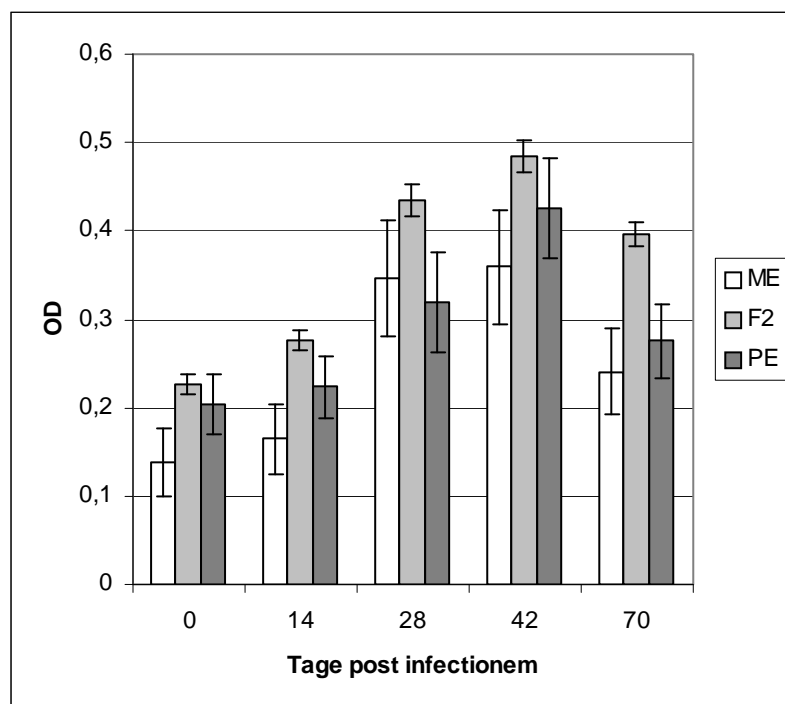


Abbildung 3: IgM-Antikörperspiegel bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana*

#### 4.2.1.2 IgG<sub>1</sub>-Antikörper

In der Entwicklung von IgG<sub>1</sub>-Antikörpern zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den infizierten Tieren und den Kontrollgruppen. Während bei den Kontrollgruppen keinerlei Veränderungen über den Versuchszeitraum auftraten, stiegen die Antikörperspiegel bei den infizierten ME zwischen dem 14. und 42. Tag p. i. deutlich an. Das Niveau wurde bis zum Versuchsende weitestgehend beibehalten. Die Entwicklung bei PE und F2-Tieren hingegen war nahezu parallel, hier stiegen die Werte ab dem 42. Tag p. i. konstant an. Bei den F2-Schweinen kam es zu einem leicht höheren IgG<sub>1</sub>-Antikörperspiegel als bei den ME. Die PE reagierten zwar gleichfalls, aber deutlich schwächer (Abb. 4). Es ergaben sich sowohl für die Rassenabhängigkeit ( $p < 0,0001$ ) als auch für den Zeitverlauf ( $p < 0,0001$ ) hochsignifikante Unterschiede.

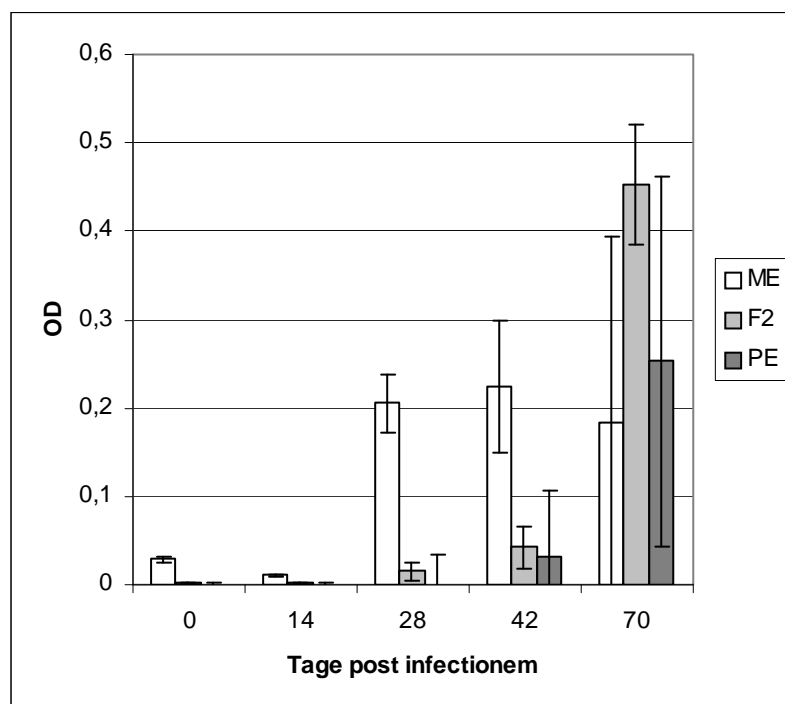
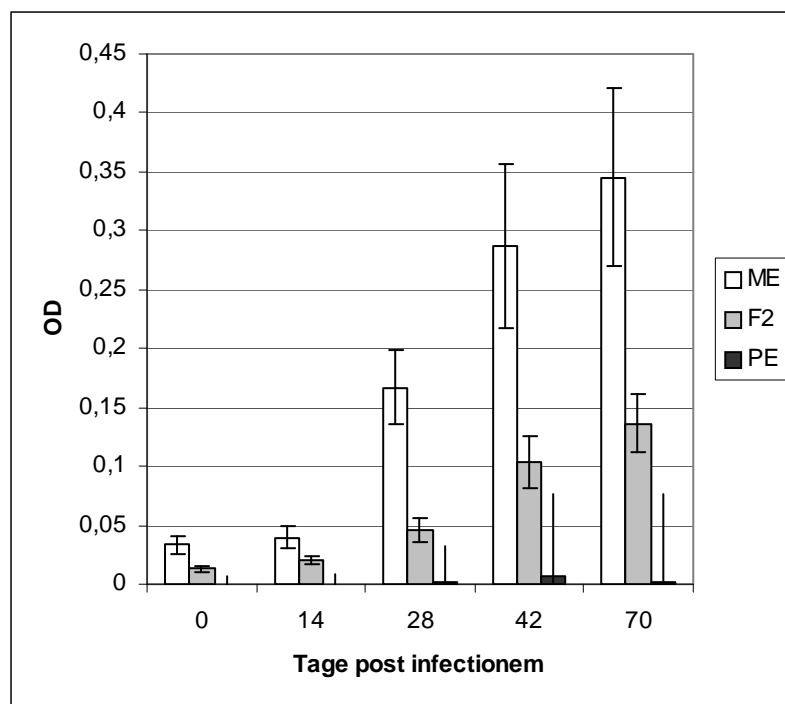


Abbildung 4: IgG<sub>1</sub>-Antikörperspiegel bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana*

#### 4.2.1.3 IgG<sub>2</sub>-Antikörper

Spezifische Ig<sub>2</sub>-Antikörper ließen sich in hohen Spiegeln nur bei den ME-Schweinen nachweisen, bei denen es nach dem 14. Tag p. i. zu einem nahezu kontinuierlichen Anstieg bis Versuchsende kam. In PE-Schweinen traten keine nachweisbaren Antikörper auf. Bei F2-Tieren kam es zu einem minimalen Anstieg der IgG<sub>2</sub>-Spiegel (Abb. 5). Ebenso wie bei IgG<sub>1</sub> ergaben sich hochsignifikante Werte für die Rassenabhängigkeit ( $p < 0,0001$ ) und die zeitliche Entwicklung ( $p < 0,0001$ ).

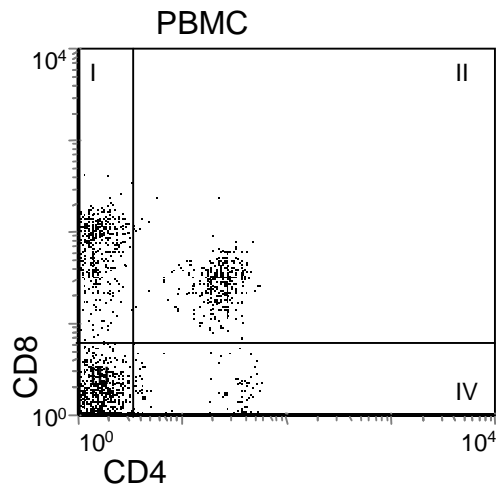


**Abbildung 5: IgG<sub>2</sub>-Antikörperspiegel bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***

## 4.2.2 Phänotypisierung der Lymphozyten im peripheren Blut

### 4.2.2.1 Expression von CD4 und CD8

Mittels mAk gegen CD4 und CD8 ist es möglich, in einer Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse einzelne Populationen von PBL zu definieren und darzustellen (vgl. Abb. 6). In Quadrant III finden sich die doppelt negativen Zellen ( $CD4^-CD8^-$ ) wie TcR $\gamma/\delta$ -Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten. Der hohe Anteil der TcR $\gamma/\delta$ -Zellen stellt eine Besonderheit des porcinen Immunsystems dar (vgl. Kap. 2.2.4). Natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen exprimieren CD8 und sind in Quadrant I dargestellt. Die beiden Zellpopulationen unterscheiden sich dabei auf Grund ihrer unterschiedlichen Antigendichte (CTL  $\rightarrow$   $CD8^{high}$ ; NK  $\rightarrow$   $CD8^{low}$  (Pauly et al. 1998)). Beim Schwein werden die T-Helferzellen an Hand ihres Phänotyps  $CD4^+CD8^-$  (Quadrant IV) und  $CD4^+CD8^+$  (Quadrant II) unterschieden. Die  $CD4^+CD8^+$  T-Zellen entstehen vermutlich aus einfachpositiven T-Helferzellen und besitzen die Funktion von T-Helfer-Gedächtniszellen (Summerfield et al. 1996b; Zuckermann und Husmann 1996; Ober et al. 1998b). Der Phänotyp  $CD4^+CD8^+$  ist eine Besonderheit des porcinen Immunsystems (Pescovitz et al. 1985; Saalmüller et al. 1987b).



**Abbildung 6: CD4- und CD8-Expression auf porcinen PBL. Die Abbildung zeigt eine Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse von PBL, die mit mAK gegen CD4 und CD8 markiert wurden. Das Diagramm gibt die logarithmische Fluoreszenzaktivität der analysierten Zellen wieder, wobei die FITC-Fluoreszenzintensität auf der Abszisse und die PE-Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen sind.**

Quadrant I	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>
Quadrant II	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Quadrant III	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> , B-Zellen, Monozyten und tote Zellen
Quadrant IV	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>

Bei den infizierten Tieren ergaben sich deutliche Unterschiede für den CD4<sup>-</sup>CD8<sup>high</sup>-Anteil ( $p < 0,05$ ). ME und F2-Tiere besaßen von Untersuchungsbeginn an einen leicht höheren Anteil CD8<sup>high</sup>-T-Zellen als PE. Im Infektionsverlauf nahm der Anteil dieser Zellen von ca. 6 % auf, am 28. und 42. Tag p. i. 8 – 9 % zu. Bei PE blieben abgesehen von einem Abfall 14 Tage p. i. die Werte weitgehend konstant. Bei beiden Rassen waren die Veränderungen im Zellverlauf signifikant ( $p < 0,0005$ ).

Die infizierten F2-Tiere glichen im Infektionsverlauf weitgehend den ME (Abb. 7).

Die Kontrolltiere wiesen keine wesentlichen Abweichungen während des Versuchszeitraums in ihrer Populationsgröße auf. Bei den nicht-infizierten ME-Tieren ist ein leichter Anstieg der CD8<sup>high</sup> am 42. und 70. Tag p. i. zu verzeichnen (Abb. 39).

Bei der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup>-T-Zellpopulation waren bei PE anfangs höhere Werte als bei den ME und F2-Tieren zu verzeichnen. Bei allen Gruppen zeigte sich 14 Tage p. i. ein Abfall, gefolgt von einem erneuten Anstieg. 70 Tage p. i. zeigten sich vor allem bei den PE hohe Anteile (Abb. 8).

Die Größe der Zellpopulation der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup> T-Zellen veränderte sich bei allen nicht-infizierten Kontrolltieren nicht (Abb. 40).

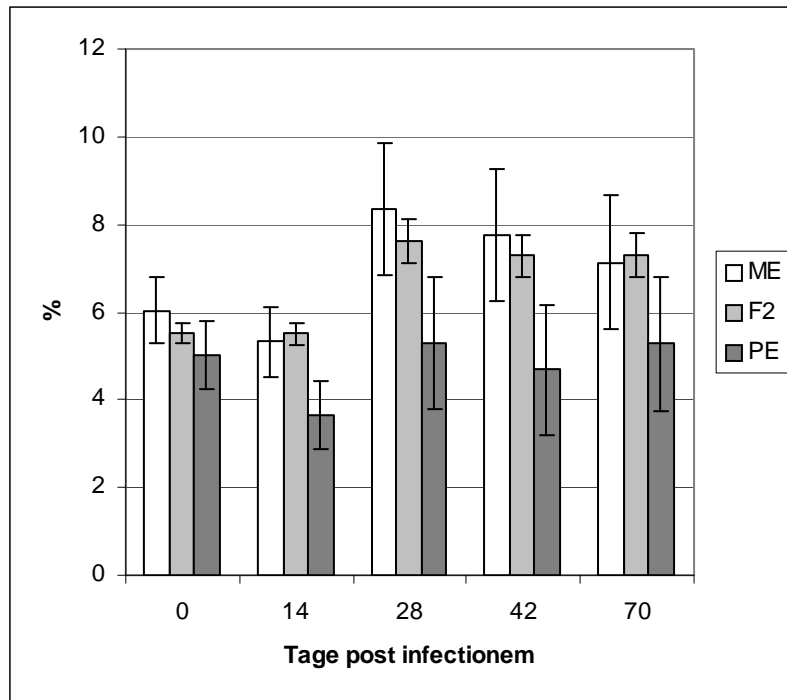
Im Anteil der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten sich weder bei den Kontrollen noch bei den Infektionsgruppen vor der Infektion rassespezifische Besonderheiten (Abb. 41 und Abb. 9). Auch mit zunehmendem Alter der Kontrollen ergaben sich keine wesentlichen Veränderungen. Im Verlauf der Infektion nahm der Anteil dieser Zellen bei den PE rasch zu und hatte sich bis 42 Tage p. i. mit ca. 15 % nahezu verdoppelt. Bei ME zeigte sich 14 Tage p. i. ein leichter Rückgang des CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Anteils, gefolgt von einem eher mäßigen Anstieg. Bei F2-Tieren kam es im Vergleich zu PE zu einem verzögerten Anstieg, doch hatten sich die Werte bis zum 28. Tag p. i. angeglichen (Abb. 9).

Bei den CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen bestand generell eine signifikante Rasseabhängigkeit ( $p < 0,05$  bei nicht infizierten Kontrollen,  $p < 0,0005$  bei infizierten Tieren). Die niedrigsten Werte zeigten sich bei ME, die höchsten Werte wurden von den infizierten Tieren am Tag 70 p. i. bei den PE beobachtet. Zudem zeigte sich im Fall des ME keine besondere Dynamik im Infektionsverlauf (Abb. 10). Bei F2-Tieren wurde bei Kontrollen i. d. R. eine intermediäre Situation beobachtet (Abb. 42), bei infizierten Schweinen variierten die Anteile im Verhältnis zu PE, lagen aber stets über denen der ME. Der Einfluss der Zeit im Infektionsverlauf war insgesamt mit  $p < 0,05$  signifikant (Abb. 10).

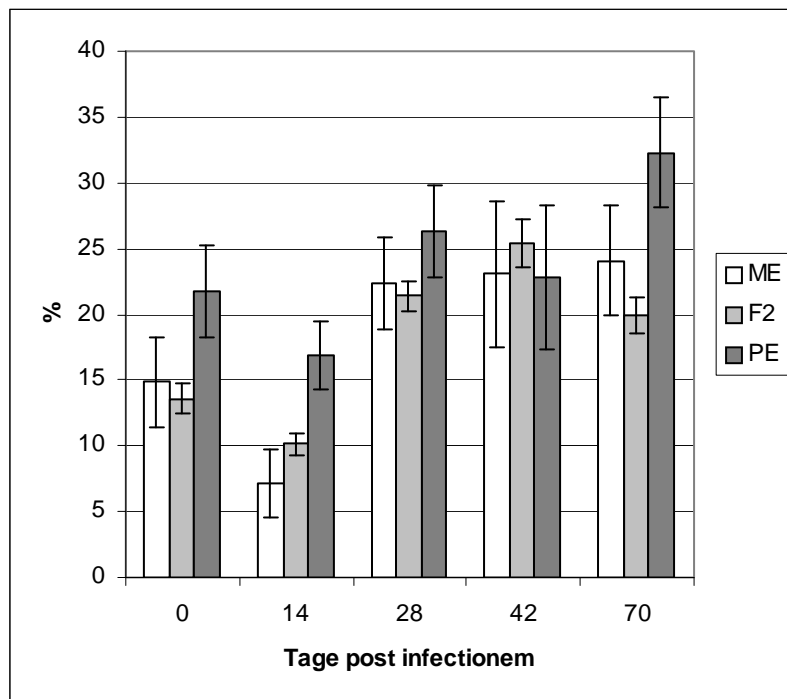
Das Verhältnis der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>high</sup> zeigte rasseabhängige Unterschiede im Infektionsverlauf (Abb. 11). Bei den PE wuchs das Verhältnis um das Vierfache am 14. Tag p. i. an. An den anderen Tagen glich das Verhältnis wieder dem Verhältnis an Tag 0. Weder ME noch F2-Tiere zeigten einen ähnlichen Verlauf. Bei einem hohen Verhältniswert wurde davon ausgegangen, dass viele T-Helfer-Zellen vorhanden sind, während ein niedriges Verhältnis auf wenige CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und viele CD8<sup>high</sup>-T-Zellen schließen lässt.

Der Anteil der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen konnte mit der in der FACS-Analyse gewählten Kombination nicht gezielt gemessen werden. Die i. d. R. im 3. Quadranten des Scattergramms angesiedelten doppelt negativen Zellen waren dort zusammen mit B-Zellen, Makrophagen, toten Zellen und Zelltrümmern erfasst worden. Die einzelne Erfassung von CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> wäre nur über eine hier technisch nicht mögliche Dreifarbenfluoreszenzanalyse möglich gewesen. Diese Aussage gilt auch für die Bestimmung der Expression von CD2<sup>-</sup>CD5<sup>-</sup>.

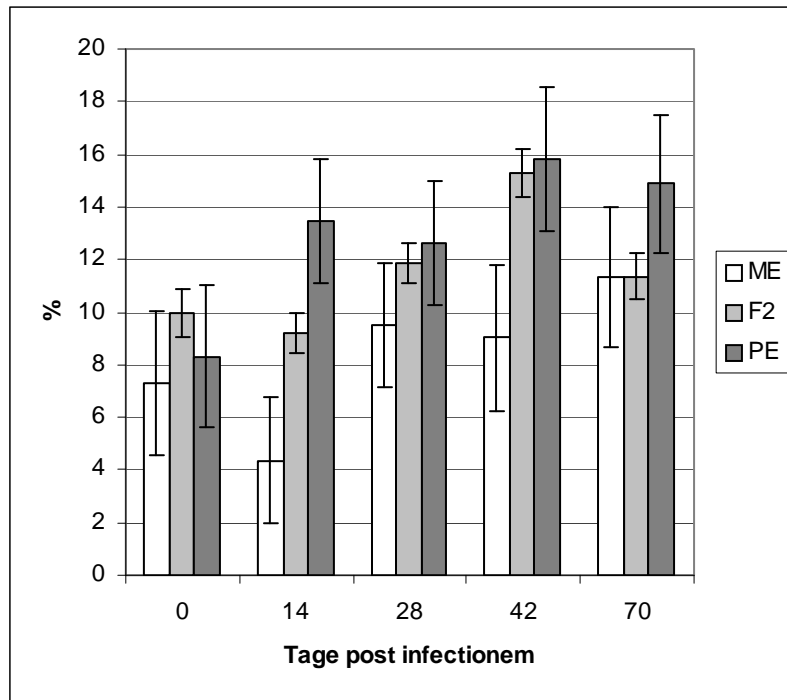




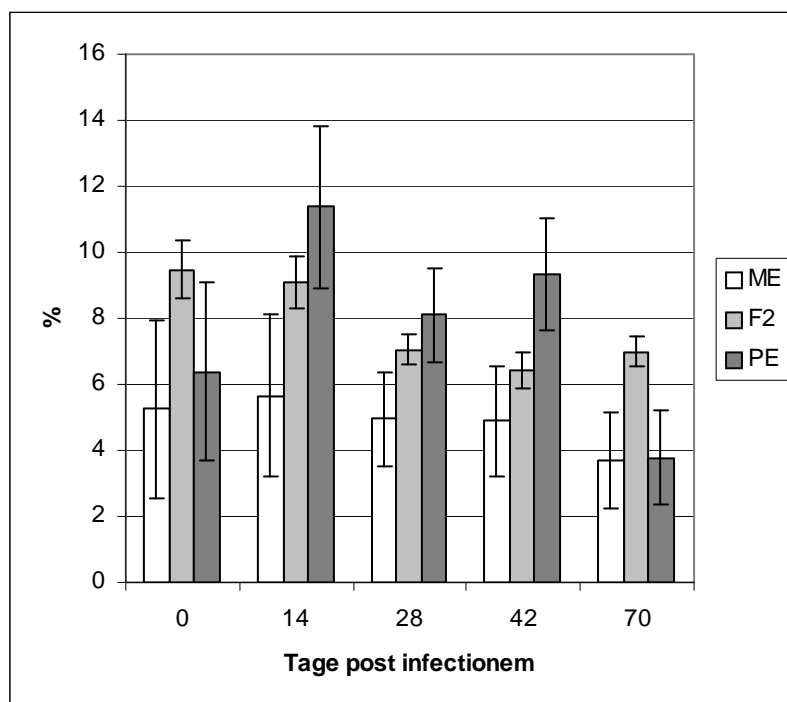
**Abbildung 7:** Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



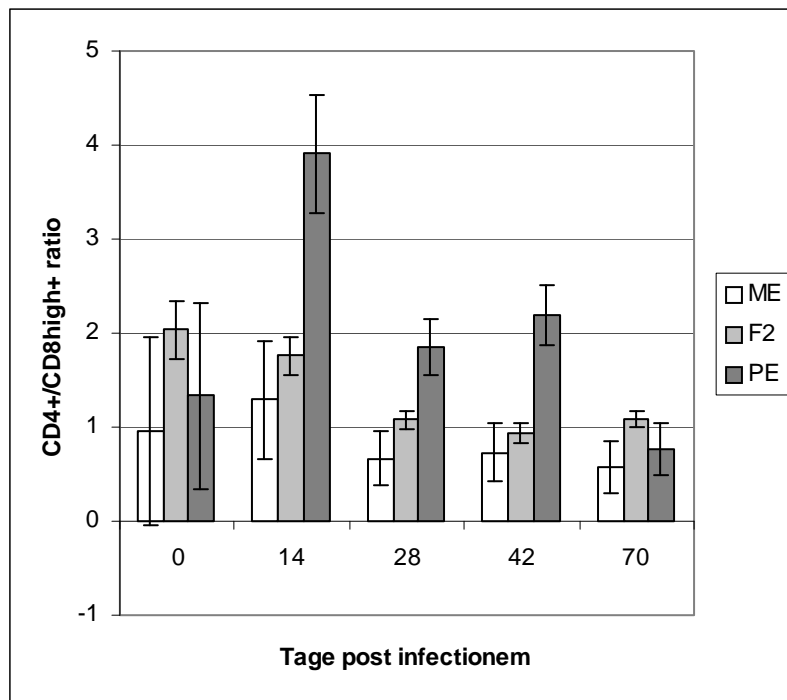
**Abbildung 8:** Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 9:** Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 10:** Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 11:** Darstellung des Verhältnis von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>high</sup> auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

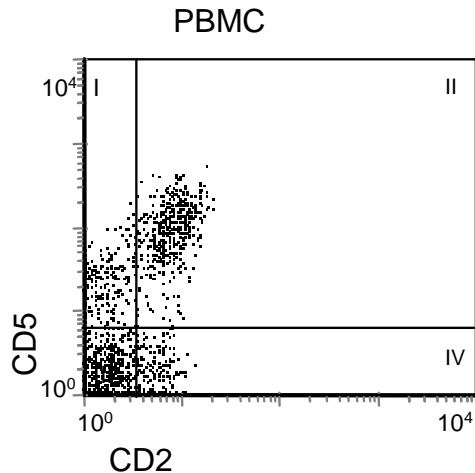
#### 4.2.2.2 Expression von CD2<sup>+</sup> und CD5<sup>+</sup>

CD2 macht die Unterscheidung von Nullzellen (CD2<sup>-</sup>) und „Nicht“-Nullzellen (CD2<sup>+</sup>) möglich. Es ist an der Signaltransduktion und der damit verbundenen Aktivierung ruhender T-Zellen beteiligt. CD2<sup>+</sup> -T-Zellen exprimieren CD4 und/oder CD8 (CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> oder CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) und weisen die funktionale Aktivität von MHC- restringierten T-Lymphozyten auf. CD2<sup>-</sup> T-Lymphozyten gehören zur CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulation und exprimieren den  $\gamma\delta$ -TcR. Sie zeigen keine antigenspezifischen Reaktionen, wohl aber eine hohe Proliferationsrate nach Stimulation mit Mitogen (Saalmüller 1998; Saalmüller et al. 1998c).

CD5 weist eine biphasische Antigendichte auf und ermöglicht durch seinen Einsatz als mAK die Unterscheidung zwischen NK-Zellen (CD8<sup>low</sup>CD5<sup>-</sup>), CTL's (CD8<sup>high</sup>CD5<sup>high</sup>) und  $\gamma\delta$ -TCR-Zellen (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD5<sup>low</sup>) (Saalmüller et al. 1994d).

**Tabelle 2: Übersicht der durch die Paarung CD2/CD5 darstellbaren Zelltypen mit Angabe ihrer Platzierung in dem Scattergramm der FACS-Analyse**

Zelltyp	Phänotyp	Platzierung im Scattergramm (Abb. 8)
NK	CD2 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>low</sup> CD5 <sup>-</sup>	Quadrant IV
CTL	CD2 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>high</sup> CD5 <sup>+</sup>	Quadrant II
$\alpha\beta$ -TcR-Zellen	CD2 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD5 <sup>high</sup> CD2 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD5 <sup>high</sup> CD2 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> CD5 <sup>high</sup>	Quadrant II
$\gamma\delta$ -TcR-Zellen	CD2 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD5 <sup>low</sup>	Quadrant I
Sonstige	CD2 <sup>-</sup> CD5 <sup>-</sup> -Zellen, Makrophagen, B-Zellen, tote Zellen, etc.	Quadrant III



**Abbildung 12: CD2- und CD5-Expression auf porcinen PBL. Die Abbildung zeigt eine Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse von PBL, die mit mAK gegen CD2 und CD5 markiert wurden.**

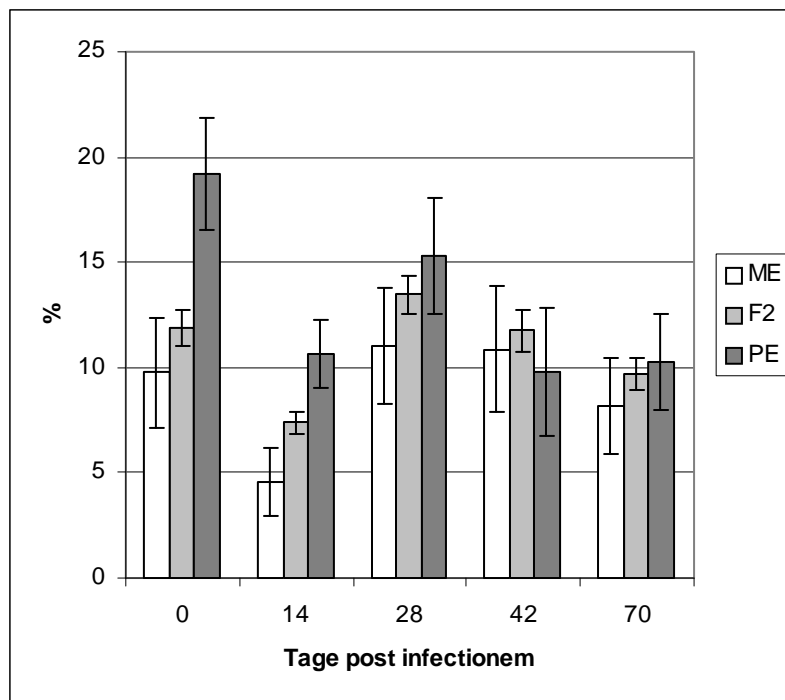
**Das Diagramm gibt die logarithmische Fluoreszenzaktivität der analysierten Zellen wieder, wobei die FITC-Fluoreszenzintensität auf der Abszisse und die PE-Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen sind.**

Für die  $CD2^+CD5^-$  T-Zellen zeigte sich, dass Beziehungen zwischen Rasse, Bestehen einer Infektion und dem Zeitverlauf existieren ( $p < 0,001$ ). Sowohl die Kontrolltiere als auch die später infizierten ME und F2-Tiere wiesen an Tag 0 eine  $CD2^+CD5^-$ -Zellpopulation von um die 10% auf, die später infizierte PE hatten allerdings einen höheren Anteil um ca. 7% (Abb. 13). Während sich im Untersuchungszeitraum bei den Kontrolltieren nichts änderte (Abb. 43), fiel der Anteil der  $CD2^+CD5^-$ -Zellen bei allen infizierten Tieren um fast 50% ab. Bis zum 28. Tag p. i. pendelte sich die Zellzahl wieder auf einen Level von 10% ein, und wies bis zum Versuchende keine größeren Schwankungen mehr auf.

Bei den  $CD2^+CD5^+$ -Zellen der infizierten Tiere (Abb. 14) zeigte sich eine deutlich andere Entwicklung über den Versuchszeitraum als bei den Kontrolltieren ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 44). Tendenziell vermehrten sich die  $CD2^+CD5^+$ -Zellen bis zum Versuchsende stetig. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Tag der Infektion und der jeweiligen Rasse ( $p < 0,019$ ). Besonders ausgeprägt waren hierbei die Unterschiede zwischen ME und PE im Zeitraum vom 14. bis 42. Tag p. i. Während die Zellpopulation ab dem 42. Tag p. i. bei den ME weitestgehend stabil blieb, stieg sie bei den PE-Schweinen deutlich an.

Im Anteil der  $CD2^-CD5^+$   $\gamma\delta$ -Zellen ergaben sich einerseits bei den nicht infizierten ME- und F2-Kontrollen offensichtlich altersbedingte Zunahmen sowie

rassenabhängige Unterschiede ( $p < 0,05$ ), andererseits, mit Ausnahme der ME, bei den infizierten Tieren signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 15). Während der Anteil  $CD2^+CD5^+$  T-Zellen bei den infizierten ME über den gesamten Zeitraum bei 15% lag, veränderte er sich bei den PE und F2-Tieren. Bei den PE, die von vornherein einen höheren Anteil  $CD2^+CD5^+$  T-Zellen aufwiesen, deutete sich ein Verlauf an, der bei den F2-Tieren relativ deutlich wurde: Hier kam es bis 14 Tage p. i. zu einer deutlichen Zunahme, gefolgt von geringeren Werten 28 und 42 Tage p. i. und einem leichten Wiederanstieg bis zum 70. Tag p. i..



**Abbildung 13: Darstellung der  $CD2^+CD5^+$ -Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana***

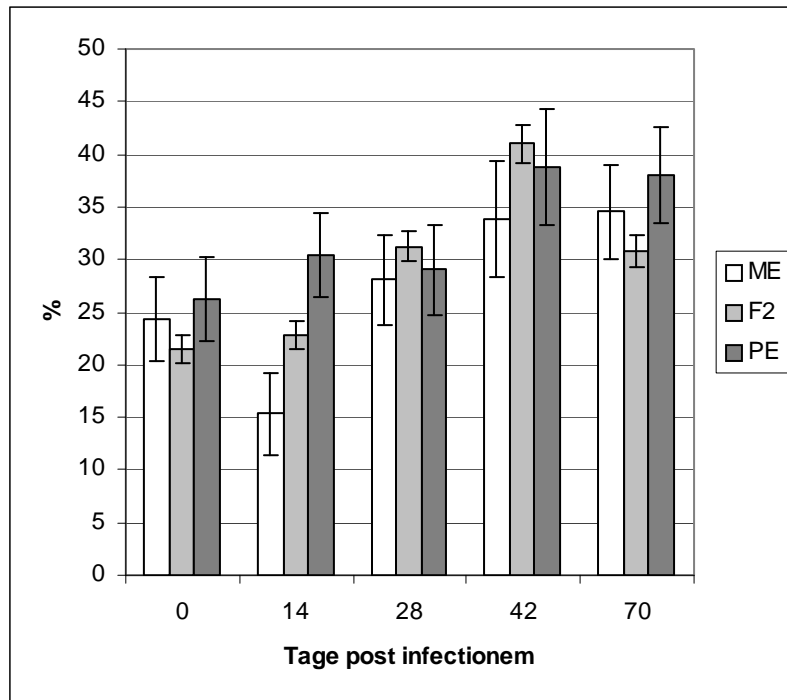


Abbildung 14: Darstellung der CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

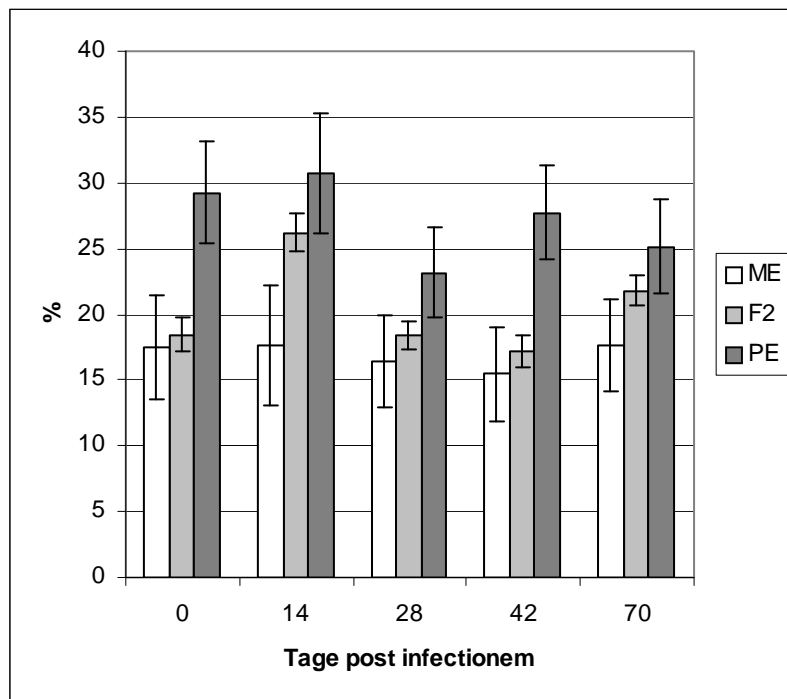
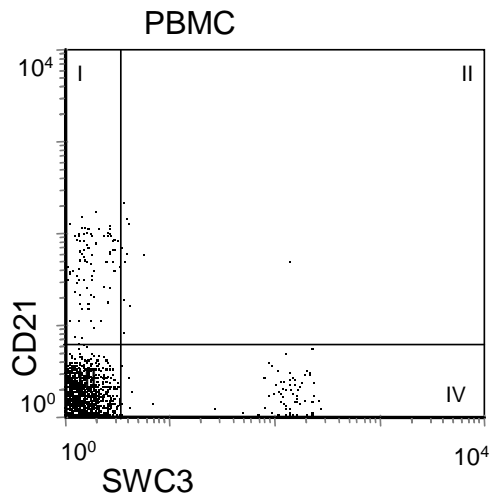


Abbildung 15: Darstellung der CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

#### 4.2.2.3 Expression von SWC3<sup>+</sup> und CD21<sup>+</sup>

Mittels des Einsatzes von mAK gegen CD21 lassen sich die Oberflächenantigene von B-Lymphozyten, mit SWC3 entsprechend die der Monozyten / Makrophagen markieren. Graphisch erscheinen die B-Lymphozyten im ersten und die Monozyten / Makrophagen im vierten Quadranten. Im dritten Quadranten befinden sich entsprechend alle T-Lymphozyten und toten Zellen (Abb. 16).



**Abbildung 16: CD21- und SWC3-Expression auf porcinen PBL. Die Abbildung zeigt eine Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse von PBL, die mit mAK gegen CD21 und SWC3 markiert wurden.**

**Das Diagramm gibt die logarithmische Fluoreszenzaktivität der analysierten Zellen wieder, wobei die FITC-Fluoreszenzintensität auf der Abszisse und die PE-Fluoreszenzintensität auf der Ordinate aufgetragen sind.**

Im Anteil der CD21<sup>+</sup>-Population ergaben sich weder bei den infizierten Gruppen noch bei den Kontrollgruppen signifikante Veränderungen über den Versuchszeitraum. Tendenziell lagen die Zellzahlen der ME höher als die der PE, und die der Kreuzungstiere lagen in etwa dazwischen (Abb. 17 und Abb. 46).



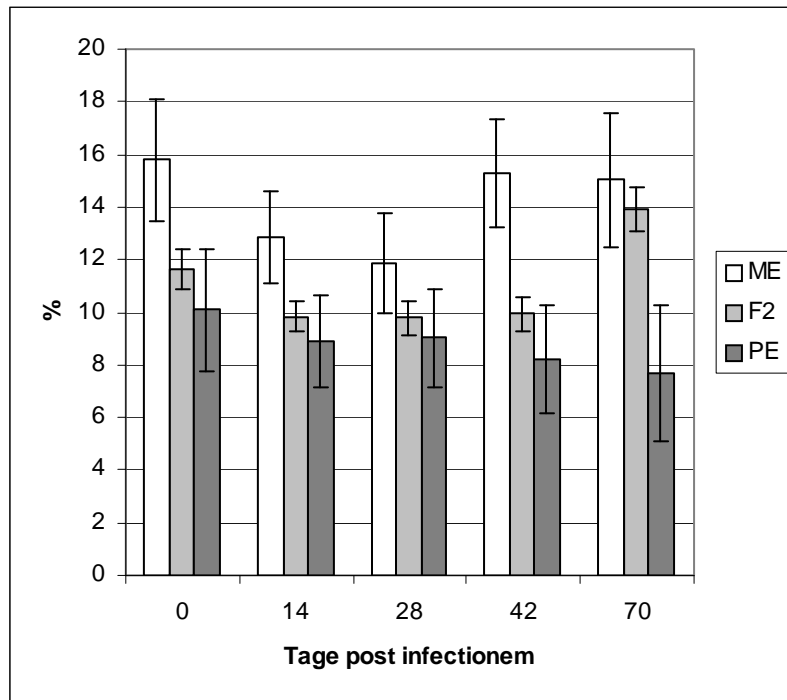


Abbildung 17: Darstellung der CD21-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

Anhand der Kontrolltiere wurde sichtbar, dass die ME über einen wesentlich höheren Monozyten / Makrophagen-Anteil verfügten ( $p < 0,0001$ ) als die PE und Kreuzungstiere (Abb. 47). Nach den Ausgangswerten der infizierten Gruppen ist anzunehmen, dass auch zwischen PE und F2-Tieren ein Unterschied besteht und dem letztere ungefähr eine Mittelstellung zwischen den reinen Rassen einnehmen (Abb. 18). Die Veränderungen im Verlauf der Infektion waren hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) und drückten sich am deutlichsten bei den ME aus (Abb. 12). Hier kam es bis zum 14. Tag p. i. zu einem Anstieg, dem bis zum Tag 42 p. i. ein kontinuierlicher, deutlicher Rückgang folgte. 70 Tage p. i. ließ sich bei allen Gruppen wieder ein leichter Anstieg verzeichnen.

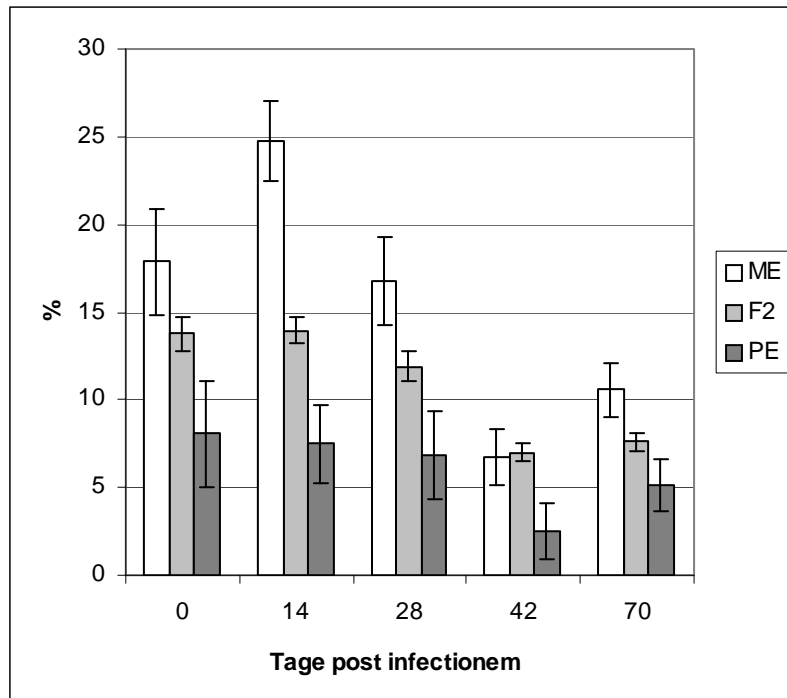
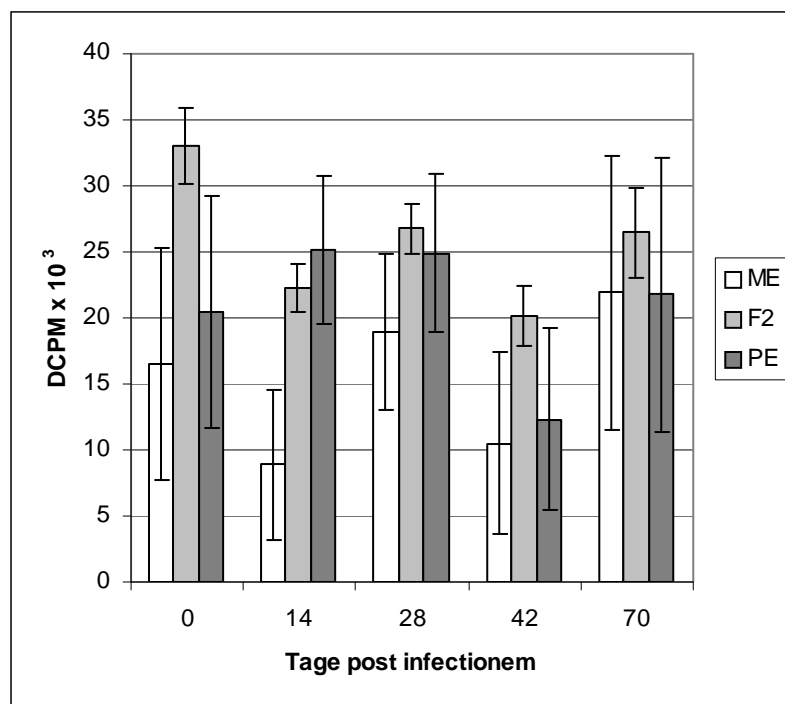


Abbildung 18: Darstellung der SWC3-Expression auf PBL bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

### 4.2.3 Proliferationsreaktionen peripherer Lymphozyten

#### 4.2.3.1 Stimulation mit Con A

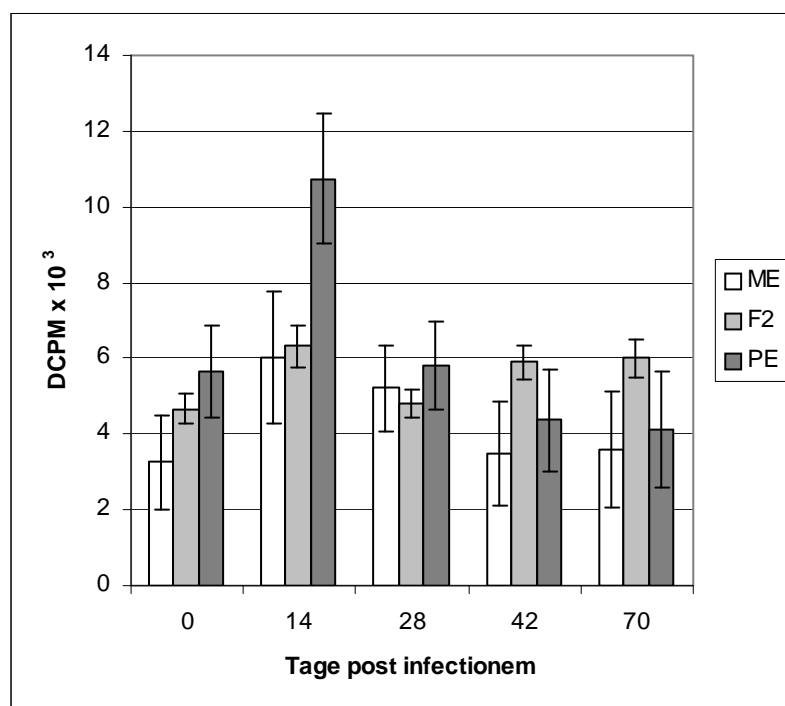
Nach Stimulation von PBL mit Con A zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten Tieren (Abb. 19) und den Kontrollen (Abb. 48) in der Proliferationsleistung der Zellen. Allerdings unterschieden sich die Rassen unabhängig von der Infektion signifikant ( $p < 0,005$ ). Daher lagen die Stimulationsindizes (SI) der ME bei nahezu allen Terminen im Durchschnitt niedriger als die Werte der PE und F2-Tiere.



**Abbildung 19: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach Stimulation mit Con A bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***

#### 4.2.3.2 Stimulation mit LPS

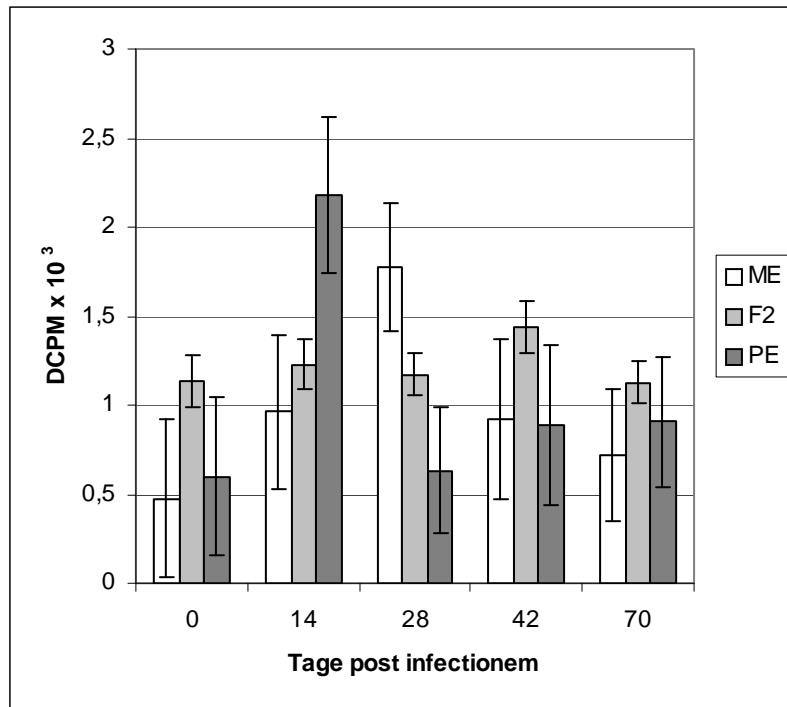
Die Stimulation mit LPS ergab ebenso wie die mit Con A in der Reaktion signifikante Rassenunterschiede ( $p < 0,005$ ). Diese Unterschiede zeigten sich deutlich bei den Kontrolltieren (Abb. 49). Die ME und die F2-Tiere lagen hier deutlich unter dem Niveau der PE ( $p < 0,05$ ) (Abb. 20). Bei den infizierten Tieren bestanden signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ) im Zeitverlauf. Auffallend waren die starken Reaktionen der PE am Tag 14 p. i. (Abb. 20).



**Abbildung 20. Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit LPS bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***

#### 4.2.3.3 Stimulation mit Mock

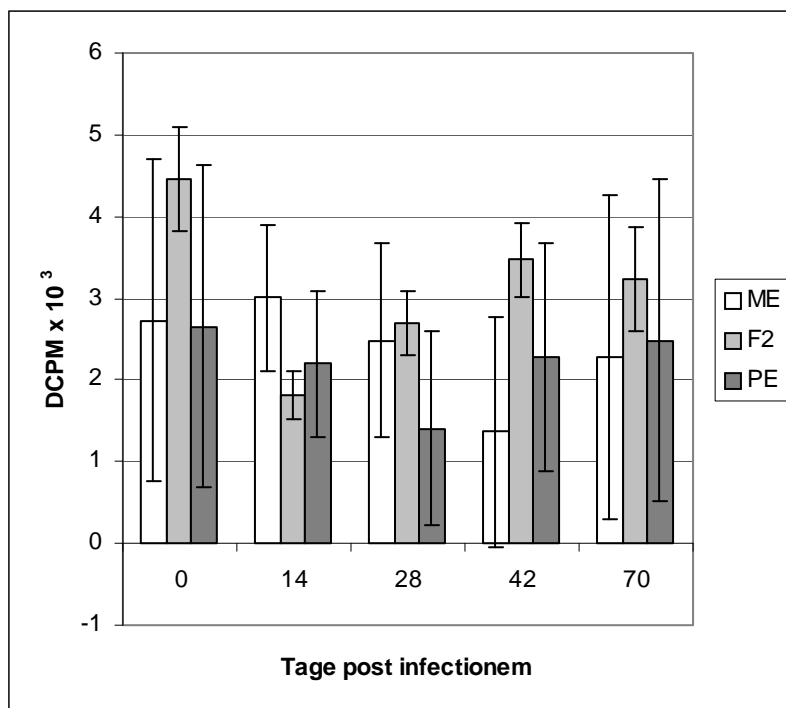
Mock stimulierte die Lymphozyten allenfalls unregelmäßig und schwach. Die Stimulationsindizes lagen über den gesamten Versuchszeitraum unter 2, größtenteils sogar unter 1 (Abb. 21). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass es keine Einflüsse im spezifischen Antigen (*S. miescheriana* und *S. singaporensis*) durch Muskelproteine oder präparationsbedingte Verunreinigungen gab.



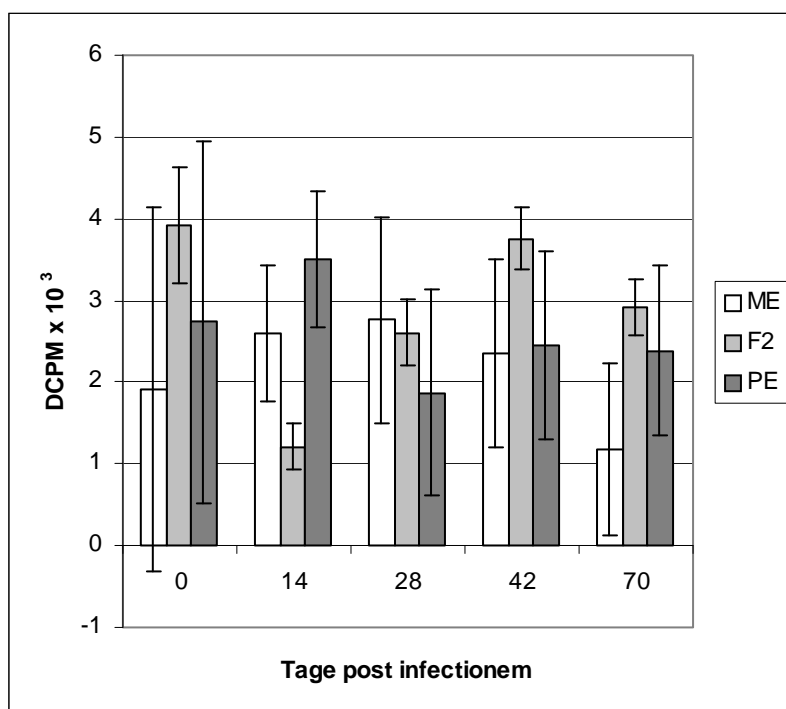
**Abbildung 21: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation von PBL der Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen mit Mock nach Infektion mit *S. miescheriana***

#### 4.2.3.4 Stimulation mit *Sarcocystis*-Antigen

PBL aus infizierten Schweinen ließen sich im Vergleich mit nicht infizierten Kontrollen weder mit *S. miescheriana*- noch mit *S. singaporensis*-Antigen verstärkt zur Proliferation anregen. Auch im Zeitverlauf konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 22 und 23).



**Abbildung 22: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit *Sarcocystis miescheriana*-Antigenen bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***



**Abbildung 23: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit *Sarcocystis singaporensis*-Antigenen bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana***

### 4.2.4 Zytokinsynthese peripherer Blutlymphozyten

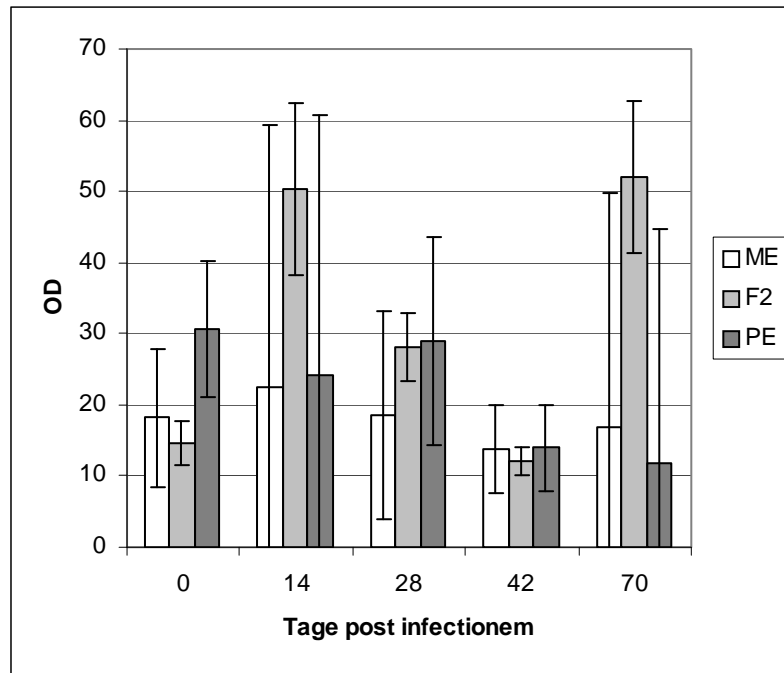
Ziel dieses Versuches war es, eine mögliche Freisetzung von IL-2 und IL-4 in Zellkulturüberständen bzw. eine Produktion von IFN- $\gamma$  durch PBL direkt nachzuweisen. Dabei sollte untersucht werden, ob es unter dem Einfluss von unspezifischen und spezifischen Antigenen zu einer Produktion der betreffenden IL-2 und IL-4 bzw. IFN- $\gamma$  durch die PBL kommt. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob es im zeitlichen Verlauf der *S. miescheriana*-Infektion zu Unterschieden in der Zytokinsekretion kommt.

#### 4.2.4.1 Interleukin-2

##### 4.2.4.1.1 Stimulation mit Con A und LPS

Im Fall der F2-Tiere wurden nach Stimulation mit Con A relativ einheitliche Werte erhalten, während bei den reinrassigen Tieren relativ heterogene, hochvariable Ergebnisse auftraten.

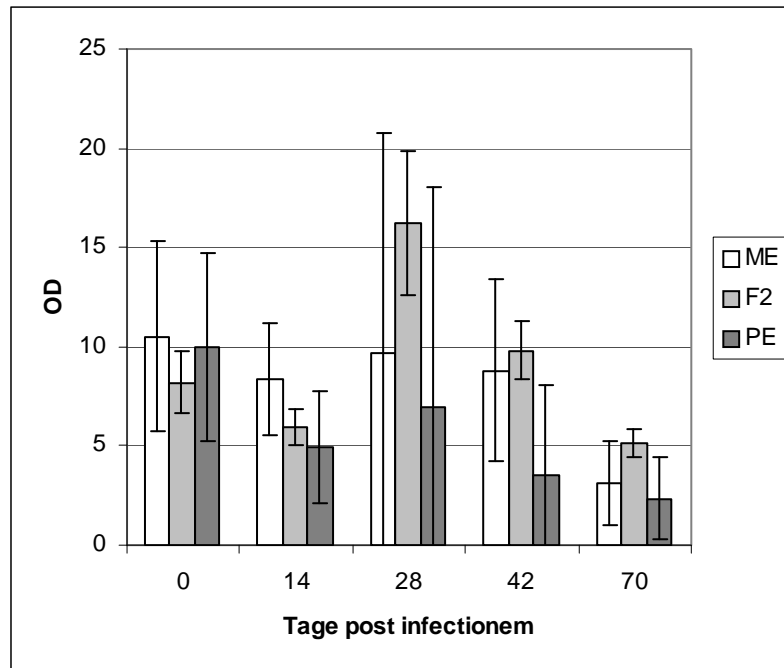
Der Vergleich aller infizierten Tiere (Abb. 24) mit den nicht infizierten Kontrollgruppen (Abb. 53) ergab signifikante Unterschiede unter Berücksichtigung der Zeit ( $p < 0,05$ ) unabhängig von einer Infektion. Bei den infizierten Tieren ergab sich ein unregelmäßiger Verlauf ohne erkennbaren Bezug zur Parasitenentwicklung. Bei beiden reinrassigen nicht-infizierten Kontrollgruppen hingegen fand ein kontinuierlicher Anstieg der IL-2-Produktion über den Versuchszeitraum statt ( $p < 0,0001$ ). Die Zytokin-Produktion der F2-Generation hingegen verlief auf einem sehr niedrigen, größtenteils gleichbleibenden Niveau.



**Abbildung 24:** Darstellung der durch Con A induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

Nach Stimulation mit LPS wurden generell sehr niedrige IL-2-Werte gemessen. Abb. 25 zeigt im Fall beider reinerbiger Gruppen mit voranschreitender Zeit p. i. ( $p < 0,005$ ) einen Abfall der IL-2-Produktion, während bei Zellen aus F2-Schweinen eine gleichbleibend schwache Synthese zu beobachten war. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Ausgangswerte bei den reinrassigen Tieren deutlich über denen der Kreuzungstiere lagen. Das Bild bei den Kontrollgruppen ähnelt dem, das nach Con A-Stimulation auftrat, wenngleich die Werte bei den reinrassigen Tieren zum Versuchsende nach unten tendierten (Abb. 54).

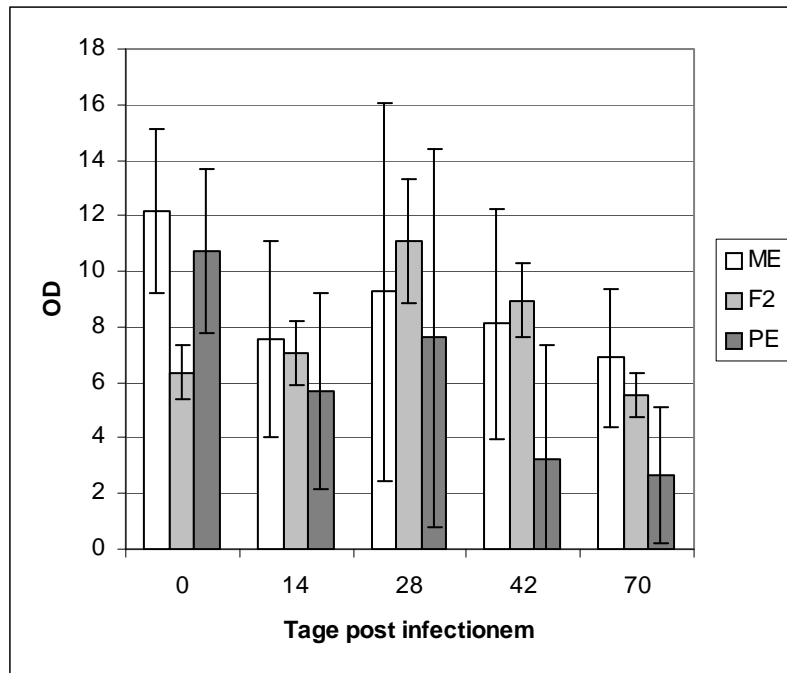




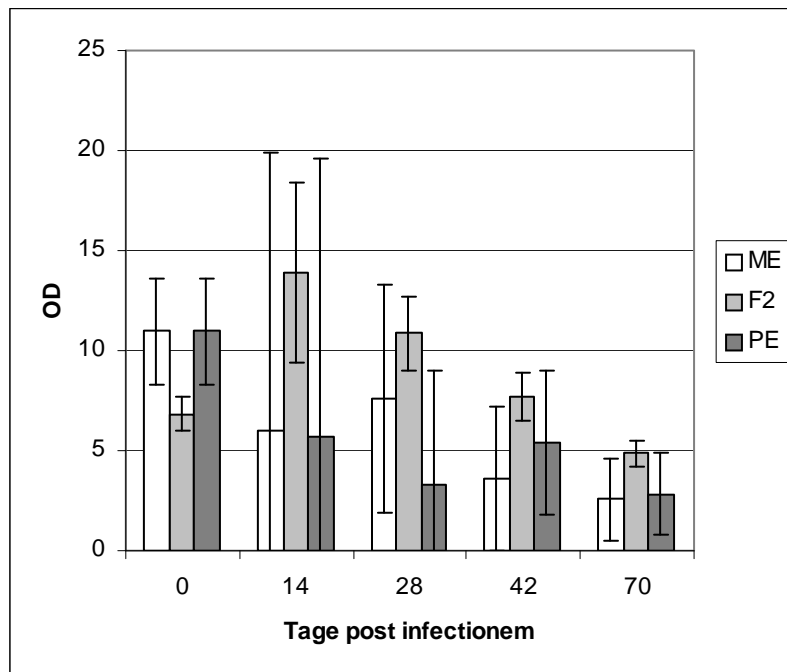
**Abbildung 25:** Darstellung der durch LPS induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

#### 4.2.4.1.2 Stimulation mit *Sarcocystis*-Antigenen

Unter dem Einfluss von homologen und heterologen *Sarcocystis*-Antigenen ergaben sich auf sehr niedrigem Niveau nahezu identische Verläufe für die einzelnen Gruppen (Abb. 26 und 25). Sowohl Infektion als auch Zeit (*S. miescheriana*:  $p < 0,005$ , *S. singaporensis*:  $p < 0,005$ ) hatten Einfluss auf die Zytokin-Synthese. Allerdings bestehen bereits signifikante Unterschiede nur durch die Rassezugehörigkeit (*S. miescheriana*:  $p < 0,005$ , *S. singaporensis*:  $p < 0,0005$ ).



**Abbildung 26:** Darstellung der durch *Sarcocystis miescheriana*-Antigen induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 27:** Darstellung der durch *Sarcocystis singaporensis*-Antigen induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

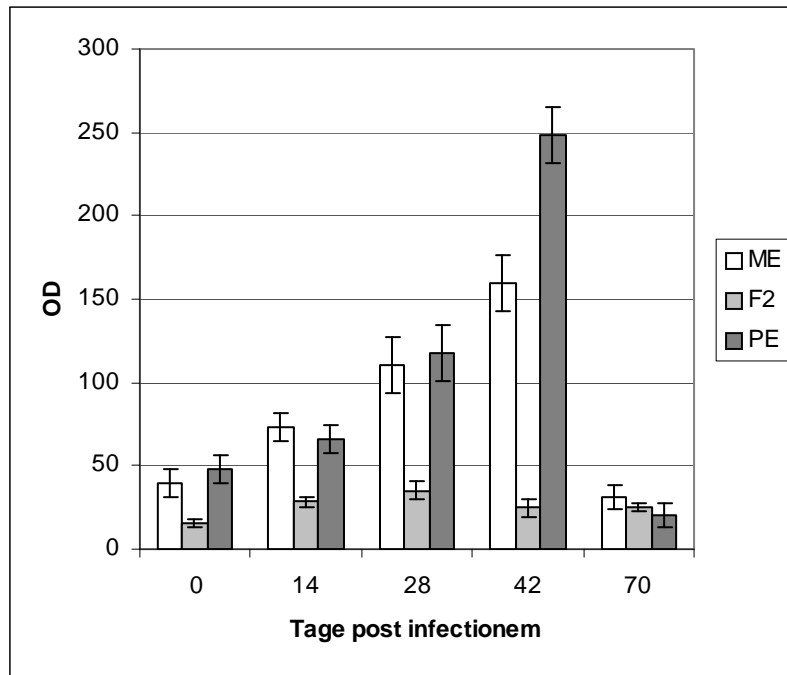
### 4.2.4.2 Interleukin-4

#### 4.2.4.2.1 Stimulation mit Con A, LPS und *Sarcocystis*-Antigenen

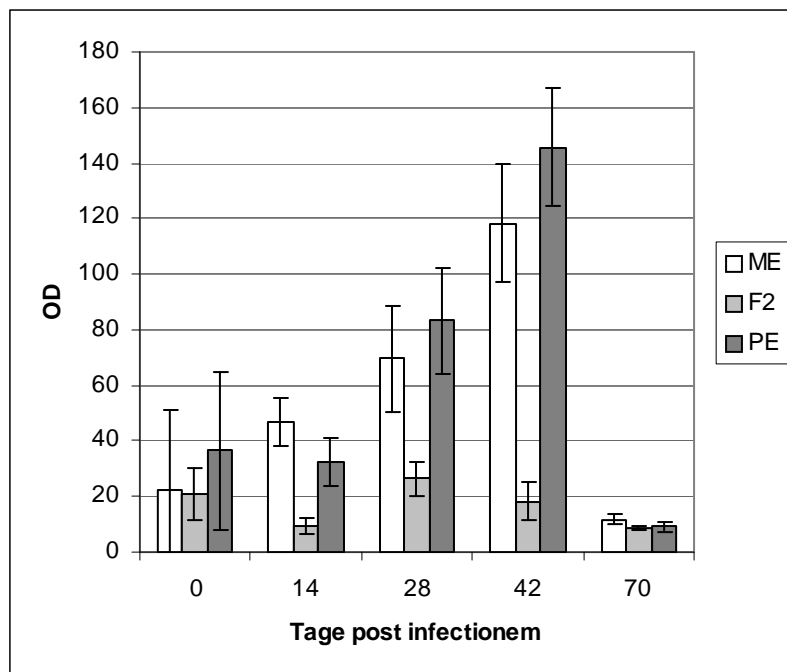
Bei den nicht infizierten Kontrollen kam es weder durch Stimulation mit Con A noch durch die eingesetzten Antigene zu einer nennenswerten Freisetzung von IL-4 (Abb. 61 - 64).

Eine sehr niedrige Syntheserate von IL-4 war auch bei den infizierten F2-Tieren zu beobachten (Abb. 28 bis 31). Über den gesamten Infektionsverlauf zeigten sich hier keinen nennenswerten Abweichungen. Allerdings ließen sich für alle eingesetzten Stimulantien Rassenunterschiede (Con A:  $p < 0,0001$ ; LPS:  $p < 0,0001$ ; *S. miescheriana*:  $p < 0,0001$ ; *S. singaporensis*:  $p < 0,0001$ ) feststellen. Die PBL infizierter reinerbiger Tiere reagierten auf eine Stimulation mit Con A abhängig vom Zeitpunkt p. i. ( $p < 0,0001$ ). Dabei kam es nach der Infektion zu einer kontinuierlich zunehmenden IL-4-Synthese. Am 42. Tage p. i. wurden Maxima ermittelt. Am Tag 70 p. i. waren wieder Kontrollwerte erreicht (Abb. 28).

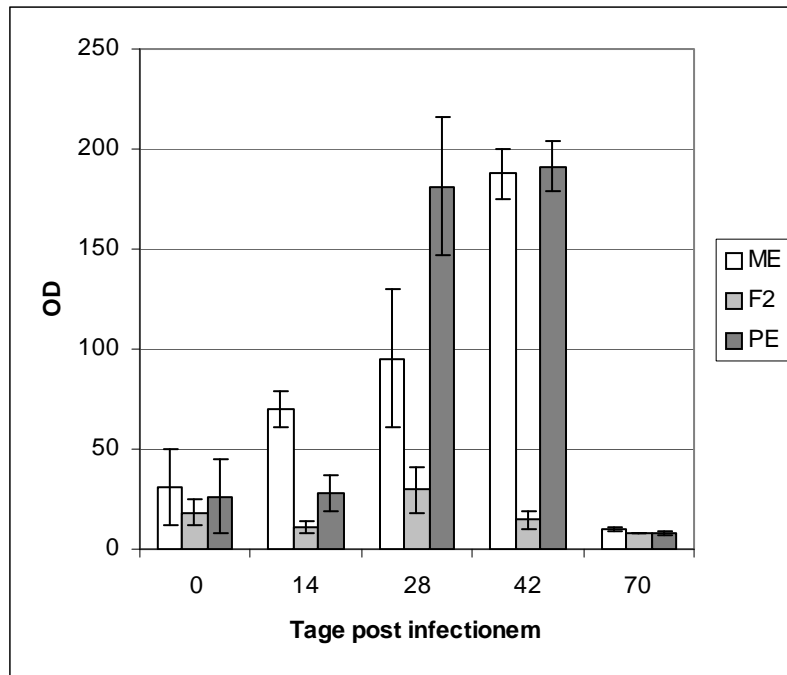
LPS wirkte sich weitgehend analog zu Con A auf die IL-4-Freisetzung aus (Abb. 29). Die Stimulation der PBL mit *Sarcocystis*-Antigenen resultierte nur bei den reinrassigen Tieren in einer IL-4-Synthese. Bei beiden Antigenen ergaben sich ähnliche, rassespezifische ( $p < 0,0001$ ) Verläufe (Abb. 30 und 31) mit bis zum 28. Tag p. i. (PE) bzw. 42. Tag p. i. (ME) zunehmenden Werten. Ab dem 42. Tag p. i. bzw. 70 Tag p. i. entsprechen die Werte wieder der Ausgangssituation.



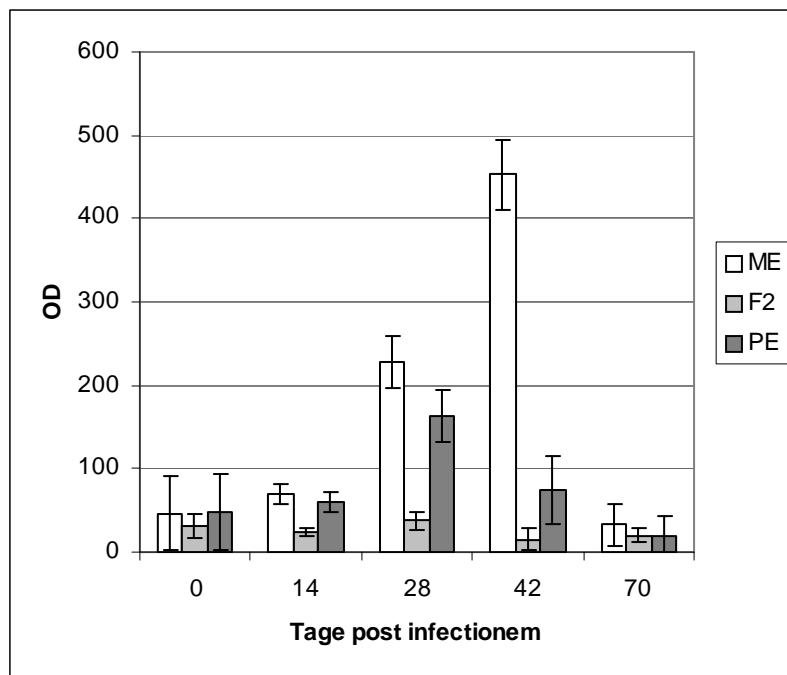
**Abbildung 28:** Darstellung der durch Con A induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 29:** Darstellung der durch LPS induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 30:** Darstellung der durch *Sarcocystis miescheriana*-Antigen induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 31:** Darstellung der durch *Sarcocystis singaporensis*-Antigen induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

### 4.2.4.3 Interferon- $\gamma$

#### 4.2.4.3.1 Stimulation mit Con A

Unter dem Einfluss von Con A zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rassen (Kontrolltiere:  $p < 0,0001$ ; infizierte Tiere:  $p < 0,005$ ) sowie dem zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss einer bestehenden Infektion ( $p < 0,005$ ). Bei den Kontrollen blieb der Anteil IFN- $\gamma$  synthetisierender Zellen über den Untersuchungszeitraum weitgehend konstant. Die niedrigsten und höchsten Werte wurden bei den F2-Tieren bzw. den ME beobachtet (Abb. 69). Gleiches galt für infizierte ME und F2-Tiere (Abb. 32). Die infizierten PE zeigten einen eher unregelmäßigen Verlauf und wiesen eine fünffach höhere Produktionsrate von IFN- $\gamma$  auf als die infizierten ME, welche noch unter der Syntheserate der nicht-infizierten ME lagen. Die infizierten F2-Tiere lagen mit der Zahl der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen fast doppelt so hoch wie die nicht-infizierten F2-Tiere.

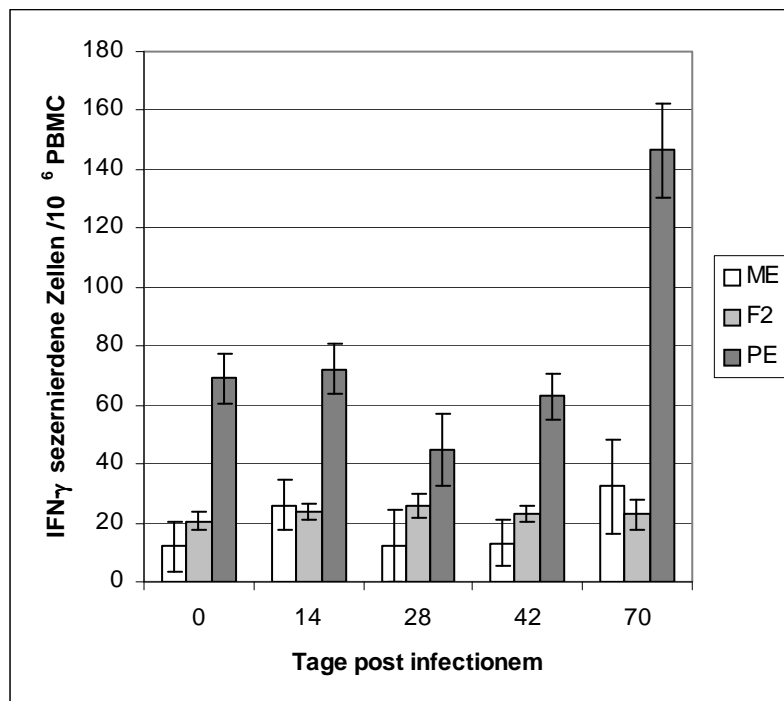
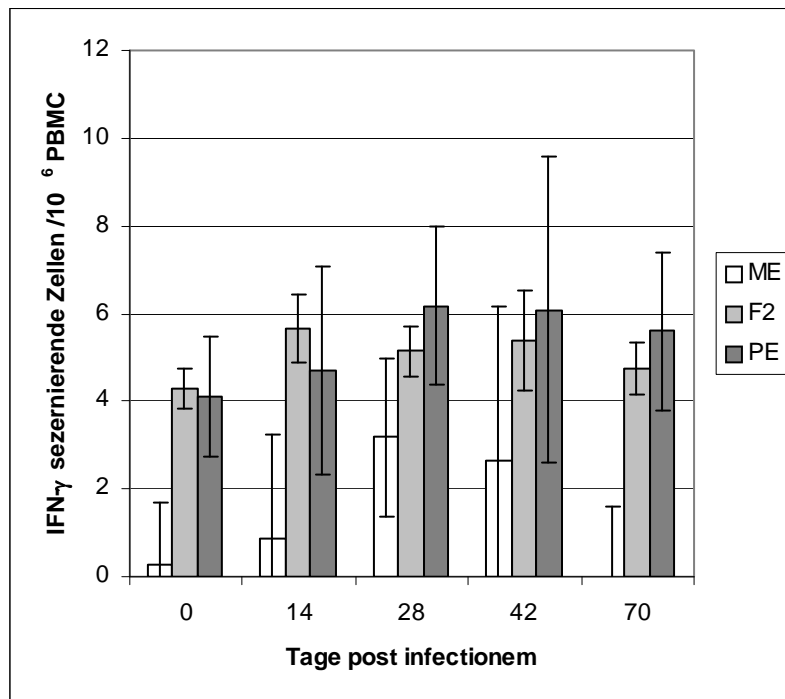


Abbildung 32: Darstellung der durch Con A zur Freisetzung von IFN $\gamma$  angeregten PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

#### 4.2.4.3.2 Stimulation mit *Sarcocystis*-Antigen

Ebenso wie bei der Stimulation mit Con A zeigten sich unter dem Einfluss von *S. miescheriana*-Antigenen rassebedingte Unterschiede unabhängig vom Bestehen einer Infektion ( $p < 0,005$ ). Die Verläufe waren bei den drei Gruppen sehr gleichmäßig und wiesen über den Versuchszeitraum keine größeren Schwankungen auf (Abb. 33). Leichte Veränderungen waren statistisch nicht verifizierbar. Auffällig war, dass die Zahl der produzierenden Zellen im Vergleich zu der Stimulation mit Con A fast um ein zehnfaches niedriger lag.



**Abbildung 33: Darstellung der durch *S. miescheriana*-Antigenen zur Freisetzung von IFN $\gamma$  angeregten PBL von Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana***

Anhand der Durchführung des Tests mit verschiedenen Stimulantien wurde deutlich, dass die Rassezugehörigkeit für die Höhe der IFN $\gamma$ -Synthese von Bedeutung war (Con A:  $p < 0,001$ ; *S. miescheriana*:  $p < 0,005$ ; RPMI+:  $p < 0,005$ ).

### 4.3 Sektionsergebnisse

#### 4.3.1 Makroskopische und Histologische Untersuchung der Muskulatur sowie Beurteilung der Intensität des Befalls mit *S. miescheriana*

Die am 70. Tag p. i. bei den euthanasierten Tieren entnommenen Proben aus dem *M. longissimus dorsi* und dem Herzen, wurden sowohl makroskopisch als auch histologisch untersucht. Makroskopisch fielen keine Veränderungen der Organstruktur auf. Die histologischen Proben der Kontrolltiere waren frei von Zysten. Bei den infizierten PE konnten histologisch in der Skelettmuskulatur keine Zysten nachgewiesen werden während im Herz von zwei Tieren zahlreiche Zysten und einem dritten vereinzelte Zysten vorlagen. Bei den infizierten ME fanden sich keine Zysten. Von den F2-Tieren wiesen 65% zahlreiche und 12% wenige Zysten im *M. longissimus dorsi* auf. Im Herzmuskel fanden sich bei 16% der Tiere zahlreiche Zysten.

In wenigen Fällen wies das umgebende Gewebe der Zysten eine geringgradige lymphohistiozytäre Infiltration mit Eosinophilen auf. Mononukleäre Zellen konnten im Umfeld der Zysten bei den reinrassigen Tieren nicht nachgewiesen werden, und traten bei den Kreuzungstieren nur in 11 Fällen auf. Hier fanden sich in der Mehrzahl mittel- bis hochgradige Zellzahlen.

Eine hyalinschollige Zellinfiltration konnte bei 2 PE in der Skelettmuskulatur bzw. bei 1 Tier im Herzen festgestellt werden. Bei den ME fanden sich bei 3 Tieren im Herzen derartige Veränderungen. Eine Degeneration der Muskelfasern fand sich bei 6 der F2-Tiere, wobei dies bei 5 Tieren im Herzen festgestellt wurde.

Die Zahl der Zystozoen variierte deutlich zwischen den einzelnen Proben, Tieren und Rassen. Die PE zeigten um bis zu 100fach (M. l. d.) bzw. 1000fach (Herz) höhere Zystozoenwerte als die ME. Die F2-Generation nahm eine Mittelstellung ein. Die Unterschiede waren für die verschiedenen Muskelproben in Bezug auf die Rasse signifikant (M. l. d.  $p < 0,05$ ; Herz  $p < 0,0001$ ) (Abb. 24). Die Unterschiede bei den einzelnen Tieren einer Rasse wurden bei der statistischen Auswertung in Form der Standardabweichung berücksichtigt. Hier gibt es nur größere Abweichungen bei den ME.



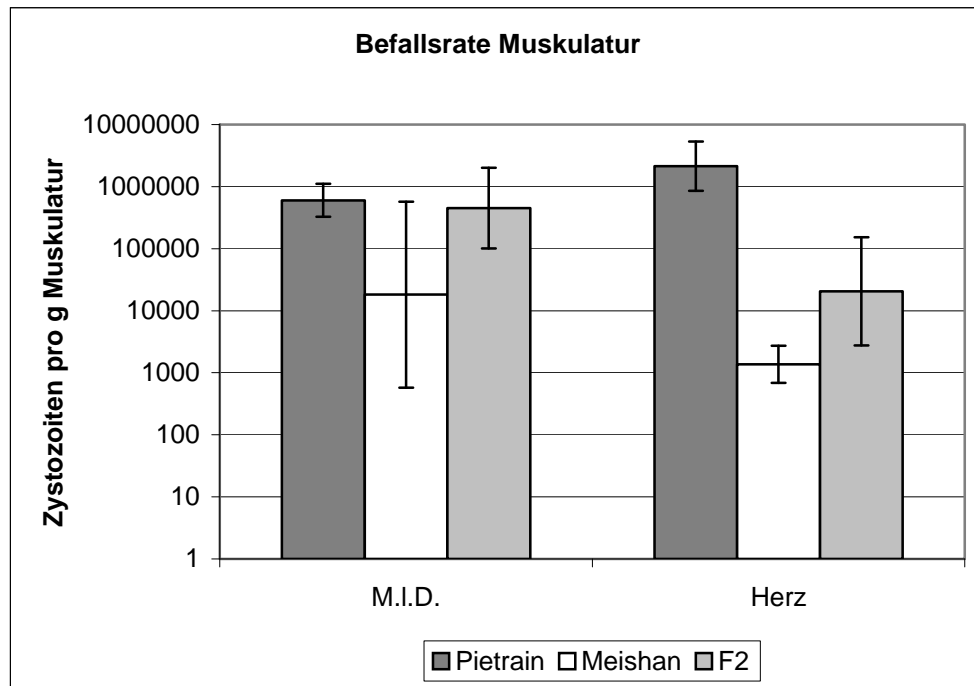


Abbildung 34: Befall des *M. longissimus dorsi* und des Herzmuskels am 70. Tag p. i. bei Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen nach Infektion mit *S. miescheriana*

## 5 Diskussion

Im Rahmen eines Projektes sollten am Tiermodell Schwein die Resistenzunterschiede zwischen zwei unterschiedlichen Schweinerassen, europäisches Pietrain und chinesisches Meishan, gegenüber einem protozoischen Erreger, *Sarcocystis miescheriana*, als Hinweis auf eine differierende genetische Ausstattung zur Erregerabwehr erfasst werden. In verschiedenen aufeinander aufbauenden Arbeiten wurde hierzu die Variabilität der klinischen und immunologischen Merkmalsäußerungen auf eine experimentelle Infektion untersucht. Erste Untersuchungen ergaben bereits Resistenzunterschiede zwischen PE- und ME-Schweinen, die sich in klinischen, serologischen, hämatologischen und parasitologischen Befunden zeigten (Reiner et al. 2002a).

Nachdem bei *S. singaporensis*-infizierten Ratten von Jäkel et al. (2001) beobachtet worden war, dass eine immunsuppressive Behandlung zu einer ungebremsen Proliferation von Bradyzoiten führte, lag der Schluss nahe, dass bei der *S. miescheriana*-Infektion des Schweins immunologische Mechanismen für die unterschiedlichen Resistenzen einzelner Rassen verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, bei chinesischen Meishan- und Europäischen Pietrain-Schweinen sowie in Tieren der F2-Generation Immunreaktionen nach einer *S. miescheriana*-Infektion zu charakterisieren und mit Entwicklungsschritten des Parasiten in Bezug zu setzen.

Das Schwein im Tiermodell hat in den letzten Jahren eine große Bedeutung erlangt. Die für die verschiedenen immunologischen Reaktionen zur Verfügung stehenden Nachweissysteme sind mittlerweile recht vielfältig, so dass sie phänotypische und funktionelle Studien des porcinen Immunsystems ermöglichen.

In der Empfänglichkeit für *S. miescheriana* zeigte sich bei den reinrassigen Tieren der nach Reiner et al. (2002a) zu erwartende signifikante Unterschied im Befall der Muskulatur, d. h. in den PE wurden im *M. l. d.* und im Herzmuskel 100- bzw. 1000fach mehr Zystozoen gefunden als bei den ME. Die Tiere der F2-Generation nahmen hier im Prinzip eine Mittelstellung ein, doch wirkten sich die Unterschiede

gegenüber den PE im Skelettmuskel relativ gering aus. Möglicherweise muss hier die doch recht geringe Anzahl der zur Verfügung stehenden ME berücksichtigt werden. Bei der klinischen Untersuchung zeigte sich im Verlauf der Körpertemperaturen bei den PE der typische, zweigipflige Verlauf, wie ihn Reiner et al. (2002a) beschrieben hatten.

Der erste Schub zwischen dem 12. und 16. Tag p. i. ist im Zusammenhang mit der Freisetzung der 2. Merozoitengeneration aus den disseminiert im Organismus in Endothelzellen herangereiften Schizonten II zu verstehen (vgl. Barrows et al. (1982a)). Diese Freisetzung ist zwangsläufig mit einer massenhaften Zerstörung von Endothelzellen verbunden, als deren Folge Fieber neben anderen klinischen Erscheinungen auftritt (Daugschies et al. 1989a; Daugschies et al. 1989b). Diese Fieberreaktion wurde bereits von Zielasko et al. (1981) dokumentiert und tritt in den vorliegenden Untersuchungen praktisch bei allen infizierten Tieren auf, d. h., wie auch bei Reiner et al. (2002a), unabhängig von der Rasse. Im Gegensatz dazu ließ sich ein zweiter Fieberschub zwischen dem 42. und 45. Tag p. i. ausschließlich bei den PE beobachten. Diesen Unterschied zwischen den beiden verwendeten Rassen hatte bereits Reiner et al. (2002a) beschrieben.

Vom Infektionsverlauf her gesehen ereignete sich dieser Fieberanfall, der bei den PE immerhin durchschnittliche Werte von  $> 40$  °C erreichte, in einer Phase, in der die Zysten in der Muskulatur ausreifen (Gobel et al. 1978; Barrows et al. 1982b). Daugschies et al. (1988) wiesen bei nicht näher definierten Schweinen in dieser Phase über erhöhte Plasma-Kreatininkinase-Werte (KC) eine Muskelschädigung nach, und Reiner et al. (2002a) konnten zeigen, dass hier zwischen *S. miescheriana*-infizierten PE- und ME-Schweinen ein signifikanter Unterschied besteht, d. h. dass massiv erhöhte KC-Werte ausschließlich bei PE auftraten, also den Tieren, die später hohe Merozoitenmengen in der Muskulatur enthielten. Diese Unterschiede spiegelten sich allerdings weder in den eigenen Untersuchungen noch bei denen von Reiner et al. (2002a) im Blutbild wieder, wie es bei einer Myositis zu erwarten gewesen wäre.

Wenn, was offensichtlich ist, der zweite Fieberschub mit der Zystenreifung im Zusammenhang steht, evtl. im Ausmaß mit der Zahl sich entwickelnder Merozoiten korreliert, so spricht einerseits sein Ausbleiben bei den ME dafür, dass bei dieser Rasse in oder bereits vor dieser Phase Mechanismen greifen, die eine Proliferation der Bradyzoiten behindern oder bereits zuvor zur Elimination der Merozoiten II

führen, so dass es überhaupt nicht zum Befall der Muskulatur kommt. Allerdings besteht für diese Interpretation eine gewisse Einschränkung. So verwundert es, dass bei den F2-Tieren trotz nicht unerheblichen Befalls der Muskeln mit Zystozoen die durchschnittliche Körpertemperatur im fraglichen Zeitraum noch unter der der ME blieb. Weiterhin ergab sich auch bei früheren Untersuchungen an Deutschen Landschweinen trotz hoher Infektionsdosen und entsprechend starkem Befall mit Bradyzoiten kein Fieberschub im fraglichen Zeitraum (Zielasko et al. 1981). Bei QTL („quantitative trait loci“) –Analysen fanden Reiner et al. (2007a) die dominierenden Merkmale in einer gemeinsamen Position mit einem Interleukin-Cluster und spekulieren, dies könne darauf hinweisen, dass bei den empfänglichen Tieren eine langsamere Interleukin-vermittelte Immunreaktion einsetzt (Reiner et al. 2007a).

Erwartungsgemäß ergaben sich bei den vorliegenden Untersuchungen aber rasseabhängige Unterschiede in den Immunreaktionen der Tiere nach einer *S. miescheriana*-Infektion, die allerdings im Zusammenhang mit der Parasitenbürde bei der Sektion nicht immer einfach zu interpretieren sind.

Dies betrifft bereits die Spiegel spezifischer IgM-Antikörper. Hier hatten Reiner et al. (2002a) zumindest temporär höhere Werte bei den ME als bei den PE beobachtet. Dieser Befund konnte in den vorliegenden Experimenten nicht bestätigt werden, auch wohl wegen hoher, unspezifischer IgM-Spiegel, wie sie die Kontrollen zeigten und evtl. wegen der geringen Gruppengrößen bei den reinrassigen Tieren. Allerdings lagen die Werte der infizierten Kreuzungstiere hoch signifikant über denen der ME und PE, wobei sich bei F2-Tieren ein hoher Heritabilitätsfaktor ergeben hatte (Reiner et al. 2007). Es bleibt zu klären, ob hinter den hohen IgM-Werten der Kreuzungstiere ein Heterosiseffekt zu sehen ist. Unabhängig davon ist jedoch IgM-Antikörpern mit Sicherheit keine Schutzfunktion zuzurechnen. Sie erwiesen sich vielmehr bei F2-Tieren als in der Höhe direkt korreliert mit der später vorgefundenen Bradyzoitenzahl (Reiner et al. 2007) und sind vielmehr als Spiegel des Ausmaßes der immunologischen Auseinandersetzung des Wirts mit antigenen Reizen zu sehen.

Erheblich markanter und eindeutig waren die rasseabhängigen Unterschiede bei den IgG-Antikörpern. Bereits Reiner et al. (2002a) hatten bei ME in Reaktion auf die *S. miescheriana*-Infektion in der chronischen Phase höhere spezifische IgG-Spiegel beobachtet. Die vorliegende Arbeit belegt, dass hierfür im wesentlichen IgG<sub>2</sub>- und nicht IgG<sub>1</sub>-Antikörper den Unterschied ausmachen. Während bei den IgG<sub>1</sub>-Antikörpern zumindest zum Versuchsende die Spiegel bei allen Gruppen

angestiegen waren (bei hohen Streuwerten ließen sich keine Rasseunterschiede absichern), fehlten IgG<sub>2</sub>-Antikörper bei den PE praktisch ganz. ME erreichten dagegen, beginnend zwischen 14. und 28. Tagen p. i., bei kontinuierlicher Zunahme zum Versuchsende hohe spezifische IgG<sub>2</sub>-Spiegel. Bei den F2-Tieren traten zwar im Durchschnitt nur moderate Mengen an Antikörpern dieses Idiotyps auf, doch lagen die Werte schließlich deutlich über denen der PE, allerdings bei hohen Streuungen. Mit diesen Ergebnissen wird eine grundsätzlich stärkere IgG-Reaktion bei den ME als bei den anderen Gruppen deutlich. Zusätzlich sprechen die Unterschiede bei den IgG<sub>2</sub>-Spiegeln eindeutig dafür, dass bei den ME die Reaktion nach anfänglicher Th<sub>2</sub>-Dominanz mit dem Ablauf der 2. Schizogonie in hohem Maß Th<sub>1</sub>-dominiert wird. Crawler und Wilkie (2003) konnten zeigen, dass beim Schwein ein hohes IgG<sub>1</sub>:IgG<sub>2</sub>-Verhältnis durch die Einwirkung von IL-10 zustande kommt, während die mit Th<sub>1</sub>-Reaktionen assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 zu einem umgekehrten Verhältnis führen. Der Schluss liegt nahe, dass die mit den Unterschieden in der Zystozoenzahl zum Ausdruck kommende hohe Resistenz der ME gegen *S. miescheriana* durch Th<sub>1</sub>-assoziierte Reaktionen zumindest mitbedingt ist, die zur Elimination der Parasiten vor oder mit Beginn der Muskelphase führen. Dabei müssen vor allem zwei Mechanismen, und zwar solche zellulärer als auch humoraler Natur, in Betracht gezogen werden. So setzen spezifische Th<sub>1</sub>-Zellen nach antigener Stimulation Zytokine frei, z. B. IFN- $\gamma$ , das Schlüsselzytokin von Th<sub>1</sub>-Zellen, die u. a. Makrophagen und zytolytische T-Zellen aktivieren und sie in die Lage versetzen, intrazelluläre Erreger abzutöten. Über Makrophagen kann es z. B. zur Freisetzung von reaktiven und zytotoxischen N- und/oder O-Verbindungen kommen, die zur Elimination extra- und intrazellulärer Erreger führen können (Ovington und Smith 1992; Ovington et al. 1995). Dem entspricht, dass Knockout-Mäuse, die kein IFN- $\gamma$  synthetisieren können im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren einer Infektion mit *S. neurona* erliegen (Dubey et al. 2001).

Die humoralen Konsequenzen des Umschaltens von der Th<sub>2</sub>-dominierten Immunreaktion in der Frühphase auf eine Th<sub>1</sub>-dominierte Immunantwort in der Phase der Zystenbildung dürften sich über die Eigenschaften der damit assoziierten Isotypen ergeben. Crawler und Wilkie (2003) beobachteten gerade bei den Th<sub>1</sub>-assoziierten IgG<sub>2</sub>-Isotypen des Schweins (IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>) sowie bei IgG<sub>4</sub> eine deutlich stärkere Complement-Aktivierungs- und -Bindungsaktivität als bei den Subklassen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub>. Mit den bei ME und teilweise auch bei den F2-Kreuzungstieren

auftretenden IgG<sub>2</sub>-Antikörpern könnte es somit zur gegenüber PE verstärkten Lyse und Phagozytose freier Merozoiten kommen, in deren Folge weniger Muskelzellen befallen werden. Dass Reiner et al. (2007) keine statistisch signifikanten Bezüge zwischen spezifischen IgG<sub>2</sub>-Spiegeln und der Anzahl der Bradyzoiten und der Muskulatur aufdecken konnte, muss dieser Funktion der Antikörper nicht widersprechen.

So einleuchtend diese Bezüge bei der *S. miescheriana*-Infektion erscheinen, so wurden sie doch weder durch die Ergebnisse der PBMC-Proliferationsstudien noch durch die Ergebnisse aus Versuchen zur IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ -Synthese durch Stimulation mit Mitogenen oder *S. miescheriana*-Antigen direkt gestützt.

Die Reaktivität von T-Zellen, gemessen an der Proliferationsantwort nach Stimulation von PBMC mit Con A, wurde durch die *S. miescheriana*-Infektion bei keiner der Tiergruppen beeinflusst. Generell schienen ME im Vergleich mit den anderen Tieren sogar schwächer zu reagieren, doch muss hier einschränkend auf die insgesamt schlechte Stimulierbarkeit der Zellen hingewiesen werden. Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei der Stimulation der PBL mit LPS. MOCK stimulierte die PBL der Schweine nicht zur Proliferation. Das gleiche gilt für die *Sarcocystis*-Extrakte. Hier muss auf Untersuchungen bei *S. tenella*-infizierten Schafen verwiesen werden, in denen spezifische Antigene gleichfalls nicht in der Lage waren, PBL infizierter Tiere zur Blastogenese zu stimulieren (O'Donoghue und Rommel 1992), obwohl die Zellen der gleichen Tiere nach PHA- und LPS-Stimulation proliferierten (O'Donoghue und Wilkinson 1988). Eine Erklärung könnte in bestimmten Eigenschaften von *Sarcocystis*-Zystozoen liegen. Tietz et al. (1989) wiesen in Lysaten von *S. gigantea*-Zystozoen Fraktionen mit gegensätzlichen Wirkungen auf mononukleäre Zellen nach: eine Lectinfraktion stimulierte die Zellproliferation, während eine als Sarcotoxin bezeichnete Fraktion hemmend wirkte. Der Lectinanteil aktiviert zudem menschliche B-Zellen polyklonal. Tietz et al. (1989) vermuteten, dass die Fraktionen in vitro funktionell interagieren, sich in ihrer Wirkung sozusagen neutralisieren.

Auch in Bezug auf die IFN- $\gamma$ -Synthese ergab sich nicht der erwartete Zusammenhang mit der Parasitenbürde. Die einzige signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern an Tag 42 p. i. war direkt, spricht also nicht für einen Schutzeffekt über das Zytokin. Darüber hinaus zeigten die resistenten ME i. d. R. die schwächste IFN- $\gamma$ -Antwort.

Es sollte in diesem Zusammenhang jedoch nicht übersehen werden, dass bei dem nahe verwandten Parasiten *Toxoplasma gondii* Th<sub>1</sub>-Reaktionen, insbesondere eine IFN- $\gamma$ -vermittelte NO-Freisetzung, eine Rolle in der Stadienkonversion spielen, d. h. dem Umschalten von der raschen Vermehrung als Tachyzoiten auf die Zystenbildung mit Bradyzoiten (Bohne et al. 1994; Gross et al. 1996), also nicht zwangsläufig zur Parasitenelimination führen. Allerdings wird die Zystenbildung bei *Sarcocystis*-Arten bisher nicht in Zusammenhang mit einem Immundruck gesehen, wie dies bei *T. gondii* offensichtlich ist.

Es ist schwierig, die hier beobachteten Reaktionen bei *S. miescheriana*-infizierten Schweinen auf *Sarcocystis*-Infektionen im Allgemeinen zu übertragen. Es existieren sehr wenig detaillierte Informationen zu Immunreaktionen von *Sarcocystis* spp., zeigte zuletzt Jäkel et al. (2001) ein abweichendes Muster bei mit *S. singaporensis*-infizierten Ratten. Entsprechend der Antikörper-Antwort entwickelten diese Tiere eine Th<sub>1</sub>-Antwort während der frühen Phase der Infektion und schalteten mit dem Beginn der Zystenreifung auf eine gemischte Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Typ-Reaktion um.

Auf den ersten Blick scheinen die Ergebnisse der Phänotypisierung nicht dazu beizutragen, die rassen-abhängigen Unterschiede des Auftretens der *S. miescheriana*-Infektion zu erklären. Soweit die verwendeten Antikörper eine Klassifikationen (Pauly et al. 1998; Saalmüller 1998; Saalmüller et al. 1999) erlaubten, wurden B-Zellen (CD21<sup>+</sup>), Makrophagen (SWC3<sup>+</sup>) und zwei Subpopulationen von T-Helferzellen aufgezeigt. Beim Schwein umfassen CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit hoher Expression von CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>high</sup>) und NK-Zellen mit niedriger Expression von CD8 (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup>) (Denyer et al. 2006; Pintarič et al. 2008). CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen, eine wichtige Subpopulation bei Klautentieren, konnten mit der in der FACS-Analyse gewählten Kombination nicht gezielt gemessen werden. Die Fraktion der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen enthielt weiterhin B-Zellen, Makrophagen, tote Zellen etc.. CD2<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen sind durch die Expression des  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptors charakterisiert (Hirt et al. 1990b; Saalmüller et al. 1990; Saalmüller 1998) und sind vornehmlich in Epithelien zu finden. Sie scheinen die erste Verteidigungslinie gegen infektiöse Agenzien zu repräsentieren. Übereinstimmend mit dem klinischen Bild nehmen rasseabhängige Abwehrmechanismen ihren Platz nach dem Freiwerden der zweiten Merozoitengeneration ein, so dass  $\gamma\delta$ -Zellen wahrscheinlich keine entscheidende

Rolle spielen. CD2 und CD5 treten bei CTL und  $\alpha\beta$ -Zellen auf, während NK- und  $\gamma\delta$ -Zellen phänotypisch als CD2<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup> bzw. CD2<sup>-</sup>CD5<sup>+</sup> charakterisiert sind.

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen der Phänotypisierung von PBMC sagen, dass ME-Schweine kleinere Populationen von T-Helfer- (CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD5<sup>high</sup>; CD2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD5<sup>high</sup>) und NK-Zellen (CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>low</sup>CD5<sup>-</sup>) aufweisen als PE-Schweine und F2-Tiere, während B-Zellen (CD21<sup>+</sup>) und Makrophagen (SWC3<sup>+</sup>) in größerer Anzahl gefunden werden.

Gesondert von den obenerwähnten Überlegungen zur möglichen Rolle von IgG<sub>2</sub> ist zu sehen, dass zuletzt bei Infektionen mit *S. neurona* von Mäusen B-Zellen anscheinend nicht kritisch waren (Witonsky et al. 2005a). Ziemlich sicher scheint es hingegen, dass CTL's eine wichtige Rolle beim Schutz des Infektionsmodell an der Maus spielen (Witonsky et al. 2005). Tatsächlich sind CD4<sup>-</sup>CD8<sup>high</sup>-Zellen, welche die eigentlichen CTL's (CD2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup>) beim Schwein repräsentieren (Saalmüller et al. 1999), verglichen mit den anderen Rassen beim ME tendenziell besser repräsentiert und nehmen beim ME im Gegensatz zu den PE-Schweinen nach der zweiten Wochen p. i. deutlich zu. Zusätzlich vergrößert sich das Verhältnis zwischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> mit der Zeit nach der Infektion bei ME und F2-Tieren während es bei den PE-Schweinen stark abnimmt. Möglicherweise stehen diese Unterschiede zwischen den Rassen für einen zusätzlichen Abwehrmechanismus durch die CTL's, der bei den ME-Schweinen höchst aktiv ist, aber wenig effektiv bei den Pietrian-Schweinen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass zumindest ansatzweise Unterschiede in der Immunantwort der beiden Schweinerassen ME und PE bei einer Infektion mit *S. miescheriana* bestehen. Die bereits in der klinischen, hämatologischen und parasitologischen Untersuchung festgestellten Differenzen im Verlauf der Infektion (Reiner et al. 2002a) ließen sich erneut belegen.

Der Lebenszyklus von *S. miescheriana* korreliert deutlich mit dem klinischen Erscheinungsbild. Im Zeitraum des Freiwerdens der 2. Merozoitengeneration kam es bei allen Schweinen zu einem Fieberschub zwischen dem 12. und 14. Tag p. i., während ein zweiter Fieberschub um den 42. Tag p. i. nur bei den PEs und einem Teil der F2-Tiere festgestellt wurde. In diesem Zeitraum findet die Besiedlung der Muskulatur und die Zystenbildung des Parasiten statt. Während beim PE ein deutlich erhöhter KC-Spiegel auf massive Muskelschädigungen hinweist, fehlt dies bei ME als



auch bei den F2-Tieren ganz. Stattdessen findet sich bei den beiden Schweineherkünften ein deutlich sichtbarer IgG<sub>2</sub>-Spiegel ab dem 14. Tag p. i., der den PE vollständig fehlt. IgG<sub>2</sub> wird als wichtiger Faktor bei Lyse- und Phagozytose-Prozessen angesehen. Die Erhöhung von IgG<sub>2</sub> zum Zeitpunkt des Auftretens der 2. Merozoitengeneration kann somit der Grund für die geringe Muskelbesiedlung von *S. miescheriana* bei ME und F2-Tieren sein. Weiterhin lässt sich hieraus der Schluss ziehen, dass bei den ME nach anfänglicher Th<sub>2</sub>-Dominanz ein Switch nach der 2. Merozoitengeneration auf eine Th<sub>1</sub>-Immunantwort erfolgt. Offensichtlich kooperieren humorale wie auch zelluläre Mechanismen bei ME-Schweinen in einer Art und Weise, die dazu führt, dass die freien Merozoiten in großen Teilen eliminiert werden, bevor sie die Muskeln besiedeln können und schließlich zelluläre Mechanismen zum weiteren Abtöten der intrazellulären Parasiten führen.

Auf Grund der gewonnenen Erkenntnisse, lässt sich eine Vererblichkeit einer Krankheitsresistenz vermuten. Wie Hepp und Reiner (2006) bereits weitgehend erörterten, ließen sich die Unterschiede der Ausgangsrassen, ME und PE, aufgrund nachgewiesener Herabilitäten belegen und bestätigen somit das hier angeführte Krankheitsmodell. Hierbei stellte sich als wesentlicher Parameter zur Bestimmung der Resistenz die zum Versuchsende festgestellte Anzahl von Bradyzoiten pro Gramm Muskulatur dar.

Die in dieser Arbeit beobachteten unterschiedlichen Ergebnisse in den immunologischen Tests weisen ebenfalls daraufhin, dass genetisch differierende Ausstattungen der Schweinerassen ME und PE bestehen. Die F2-Tiere weisen hierbei größtenteils die Bekämpfungsstrategien der ME-Tiere auf.

Auf Grund weiterer Arbeiten (Reiner et al. 2002a; Reiner et al. 2007; Reiner et al. 2007a) lassen sich einige herausragende QTLs für Merkmale der akuten und chronischen Sarkozystose belegen. Hierbei kommt der Aufklärung der verantwortlichen Genvarianten eine herausragende Bedeutung zu, da sie mithelfen Wirts-Parasiten-Interaktionen sowie die Abwehrmechanismen des Wirts zu verstehen und letztlich durch züchterische Maßnahmen auch zu verbessern.

Zukünftige, weitergehende Untersuchungen zur Krankheitsresistenz von Schweinerassen in Bezug auf *S. miescheriana* werden zu einem besseren Verständnis des Krankheitsbildes führen und könnten im Rahmen der Prophylaxe

nicht nur zu einer Verbesserung der Wirtschaftlichkeit der Tierhaltung führen, sondern auch verbraucherrechtlich Bedeutung erlangen.

## 6 Zusammenfassung

Europäische Pietrain-Schweine (PE) sind genetisch bedingt signifikant empfänglicher für den protozoischen Erreger *Sarcocystis miescheriana* als das Chinesische Meishan-Schwein (ME). Die genetischen Grundlagen sind allerdings erst in Ansätzen verstanden. Um Daten für weitere genetische Analysen zu liefern, wurden in der vorliegenden Studie bei reinrassigen Tieren beider Rassen und Kreuzungstieren der F2-Generation (F2) klinische und immunologische Parameter in ihren infektionsbedingten Veränderungen bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden 8 PE, 7 ME und 43 F2-Kreuzungstiere mit je 50.000 Sporozoiten von *S. miescheriana* infiziert. 4 PE, 3 ME und 4 F2-Tiere dienten als nicht infizierte Kontrollen.

Bei der Sektion 70 Tage p. i. enthielten die PE erwartungsgemäß signifikant ( $> 10^3$  fach) mehr Bradyzoiten in der Muskulatur als ME. F2-Tiere wiesen im Durchschnitt intermediäre Werte auf. Im Verlauf der Infektion zeigten alle infizierten Tiere am 13. und 14. Tag p. i. eine signifikant erhöhte Körpertemperatur auf. Ein zweiter Fieberschub 42 Tage p. i. zeigte sich bei den PE, nicht jedoch bei den ME. Bei F2-Tieren war die Körpertemperatur zu diesem Zeitpunkt sehr variabel.

Parasitenspezifische IgG<sub>1</sub>-Antikörper entwickelten sich bei ME langsam und moderat zwischen 14 und 28 Tagen p. i., danach waren die Spiegel in etwa gleichbleibend. Bei PE und F2-Tieren war der Anstieg verzögert, doch waren die Spiegel 70 Tage p. i. ähnlich denen der ME. Spezifische IgG<sub>2</sub>-Antikörper nahmen beginnend 14 Tage p. i. bei ME kontinuierlich zu, fehlten aber gänzlich bei PE. Bei F2-Tieren wurden sehr variable IgG<sub>2</sub>-Spiegel beobachtet. Dies lässt bei ME und bei einem Teil der F2-Tiere einen Switch von Th<sub>2</sub>-dominierten Reaktionen in der Frühphase der Infektion zu einer Th<sub>1</sub>-dominierten Reaktion mit dem Beginn der Zystenbildung in der Muskulatur annehmen, der bei den empfänglichen PE unterbleibt.

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) proliferierten generell stark in Reaktion auf Con A, wobei ME die schwächeren Reaktionen zeigten. *S. miescheriana*-Antigen (SmAg) bewirkte generell allenfalls schwache Reaktionen. Die IL-2 und IL-4-Synthesen in PBMC waren unabhängig vom Stimulans (Con A, LPS, SmAg) hoch variabel.

Die IFN- $\gamma$ -Synthese wurde mittels Elispot-Analysen bestimmt. Con A stimulierte die Synthese erheblich schwächer als *S. miescheriana*-Antigen, wobei die schwächsten Reaktionen bei den ME auftraten.

Die phänotypischen FACS-Analysen von PBMC nach der Expression von CD4, CD8, CD2, CD5, SWC3 und CD21 ergab einige Rasseabhängigkeiten, die jedoch, gesehen im Verlauf der Infektion, von geringerer Relevanz in Bezug auf Resistenzunterschiede waren. Allerdings ergab sich ein möglicherweise wichtiger Rassenunterschied im Verhältnis von CD8<sup>high+</sup> und CD4<sup>+</sup>-Zellen. Dieses Verhältnis war generell höher bei ME als bei PE und F2-Tieren und veränderte sich außerdem zugunsten von CD8<sup>high+</sup>-Zellen im Verlauf der Infektion. Dies könnte auf eine besondere Rolle von zytotoxischen T-Zellen in resistenten Tieren hinweisen.

## 6 Summary

European Pietrain (PE) and Chinese Meishan pigs (ME) differ significantly in their susceptibility to *Sarcocystis miescheriana*. The study compares clinical (body temperature) and various immunological parameters in the infected ME, PE and F2 crossbreeds (F2) in the course of infection.

Numbers of bradyzoites determined 70 days after infection with 50.000 *S. miescheriana* sporocysts were  $> 10^3$  times higher in PE than in ME. Intermediate numbers were found in F2. All infected animals showed a significant rise of body temperature 13 and 14 days p. i. A 2<sup>nd</sup> fever attack 42 days p. i. was limited to PE although F2 showed high variations of body temperature on this occasion.

Parasite specific IgG<sub>1</sub> antibodies rose moderately between 14 and 28 days p. i. and levelled off subsequently in ME. In PE and F2 the antibody rise was delayed but corresponding levels to ME were observed 70 days p. i. IgG<sub>2</sub> antibodies increased continuously after days 14 p. i. in ME, but were not found in PE. F2 showed highly variable IgG<sub>2</sub> antibody levels. This suggests a switch from Th<sub>2</sub> dominated reactions in the early phase of infection to a Th<sub>1</sub> dominated response with the onset of cyst formation in the resistant ME and by part in F2, which was absent in the susceptible PE.

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation assays showed generally strong to Con A throughout the observation period. There were breed dependent differences, whereby ME showed relatively weak responses. Low proliferation responses were found to *S. miescheriana* antigen (SmAg) in general. Il-2 and Il-4 synthesis of PBMC were highly variable independent of the stimulants (Con A, LPS, SmAg).

IFN- $\gamma$  synthesis of PBMC was determined by Elispot analyses. Con A acted much stronger as stimulant than SmAg. Weakest responses were generally found with ME. Phenotyping of PBMC concerning the expression of CD4, CD8, CD2, CD5, SWC3 and CD21 revealed various significant breed dependent differences, which in the time course, however, seemed of little relevance with regard to the infection. A possibly important observation concerned to ratio of CD8<sup>high+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells. It was generally higher in ME than in PE and F2 and in addition changed in favour to CD8<sup>high+</sup> in the course of infections. This could indicate a particular role of cytotoxic T lymphocytes in the resistant breed.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas, M. K. und E. C. Powell (1983). "Identification of surface antigens of *Sarcocystis muris* (Coccidia)." J Protozool **30**(2): 356-61.
- Allison, J. P. und W. L. Havran (1991). "The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors." Annu Rev Immunol **9**: 679-705.
- Archetti, I. L., L. Capucci, A. Saalmuller, R. Verardi, M. Konig und M. Amadori (1993). "Production and characterization of monoclonal antibodies differentiating subpopulations of porcine B lymphocytes in blood and lymphoid tissues." Zentralbl Veterinarmed B **40**(7): 485-93.
- Armengol, E., K. H. Wiesmuller, D. Wienhold, M. Buttner, E. Pfaff, G. Jung und A. Saalmüller (2002). "Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus." J Gen Virol **83**(Pt 3): 551-60.
- Ashford, R. W. (1978). "Who named *Sarcocystis muris*?" Ann Trop Med Parasitol **72**(1): 95.
- Augustine, P. C. und H. D. Danforth (1985). "Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of *Eimeria*." Avian Dis **29**(4): 1212-23.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna und G. H. Mitchell (2000). "Ultrastructure of rhoptry development in *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts." Parasitology **121**: 273-287.
- Barnes, D. A., A. Bonnin, J.-X. Huang, G. L., J. Wu, J. Gut, P. Doyle, J. F. Dubremetz, H. Ward und C. A. Petersen (1998). "A novel multidomain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion." Mol Biochem Parasitol **96**: 93-110.
- Barriga, O. O. und W. L. Ingalls (1984). "Potentiation of an IgE-like response to *Bordetella bronchiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection." Vet Parasitol **16**(3-4): 343-5.
- Barrows, P. L., A. K. Prestwood, D. D. Adams und M. J. Dykstra (1982a). "Development of *Sarcocystis suicanis* Erber, 1977 in the pig." J Parasitol **68**(4): 674-80.
- Barrows, P. L., A. K. Prestwood und C. E. Green (1982b). "Experimental *Sarcocystis suicanis* infections: disease in growing pigs." Am J Vet Res **43**(8): 1409-12.
- Barutzki, D. und R. Schaper (2003). "Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002." Parasitol Res **90 Suppl 3**: S148-50.
- Becker, B., H. Mehlhorn und A. O. Heydorn (1979). "Light and electron microscopic studies on gamogony and sporogony of 5 sarcocystis species in vivo and in tissue cultures." Zentralbl Bakteriol [Orig A] **244**(2-3): 394-404.
- Beckers, C. J., J. F. Dubremetz, O. Mercereau-Puijalon und K. A. Joiner (1994). "The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm." J Cell Biol **127**: 947-61.
- Bertschinger, H. U., M. Stamm und P. Vögeli (1993). "Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107." Vet. Microbiol. **35**(1-2): 79-89.
- Bevan, D. J. und P. M. Chisholm (1986). "Co-expression of CD4 and CD8 molecules and de novo expression of MHC class II antigens on activated rat T cells." Immunology **59**(4): 621-5.
- Beyer, T. V., N. V. Svezhova, A. I. Radchenko und N. V. Sidorenko (2002). "Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem)." Cell Biol. Int. **26**: 861-871.

- Blackman, M. J. (2000). "Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets." Curr Drug Targets **1**: 59-83.
- Blackman, M. J. und L. H. Bannister (2001). "Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation." Mol Biochem Parasitol **117**(1): 11-25.
- Blanchard, R. (1885). "Note sur les sarcosporidies et sur un essai de classification de ces sporozoaires." Soc. Zool. Fr. Bull. **10**: 244.
- Boch, J., R. Hennings und M. Erber (1980). "Die wirtschaftliche Bedeutung der Sarkosporidiose (*Sarcocystis suicanis*) in der Schweinemast. Auswertung eines Feldversuches." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **93**(21): 420-3.
- Boch, J., U. Mannewitz und M. Erber (1978). "Sarkosporidien in Schlachtschweinen in Süddeutschland." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **91**(6): 106-11.
- Bohne, W., J. Heesemann und U. Gross (1994). "Reduced Replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion." Infect. Immun. **62**: 1761-1767.
- Bokhout, B. A., J. J. van Asten-Noordijk und W. Stok (1986). "Porcine IgG. Isolation of two IgG-subclasses and anti-IgG class- and subclass-specific antibodies." Mol Immunol **23**(6): 675-83.
- Brown, P. J., K. J. Billington, J. M. Bumstead, J. D. Clark und F. M. Tomley (2000). "A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein." Mol Biochem Parasitol **107**(1): 91-102.
- Brydges, S. D., G. D. Sherman, S. Nockemann, A. Loyens, W. Daubener, J. F. Dubremetz und V. B. Carruthers (2000). "Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 51-66.
- Burgess, D. E., C. A. Speer und D. W. Reduker (1988). "Identification of antigens of *Sarcocystis cruzi* sporozoites, merozoites, and bradyzoites with monoclonal antibodies." J Parasitol **74**(5): 828-32.
- Buscaglia, C. A. e. a. (2003). "Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*." Mol. Biol. Cell **14**: 4947-4957.
- Butler, J. E. (1998). "Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals." Rev Sci Tech **17**(1): 43-70.
- Butler, J. E. und W. R. Brown (1994). "The immunoglobulins and immunoglobulin genes of swine." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 5-12.
- Carruthers, V. B., O. K. Giddings und L. D. Sibley (1999). "Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells." Cell Microbiol. **1**: 225-235.
- Carruthers, V. B. und L. D. Sibley (1997). "Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts." Eur. J. Cell Biol. **73**: 114-123.
- Carruthers, V. B. und L. D. Sibley (1999). "Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*." Mol. Microbiol. **31**: 421-428.
- Cha, D. Y., I. K. Song, G. S. Lee, O. S. Hwang, H. J. Noh, S. D. Yeo, D. W. Shin und Y. H. Lee (2001). "Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo." Korean J Parasitol **39**(3): 233-40.

- Chobtar, B. und E. Scholtyseck (1982a). "Ultrastructure. In: The biology of the Coccidia (Long, P.L.)." University Park Press, Baltimore: 101-155.
- Chobtar, B. und E. Scholtyseck (1982b). Ultrastructure. In: The biology of the Coccidia (Long, P.L.), University Park Press, Baltimore.
- Cole, R. K. (1968). "Studies on genetic resistance to Marek's disease." Avian Dis **12**(1): 9-28.
- Crawley, A. und B. N. Wilkie (2003). "Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics." Vaccine **21**: 2911-2922.
- Culvenor, J. G., K. P. Day und R. F. Anders (1991). "*Plasmodium falciparum* ring-infected surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion." Infect Immun **59**: 1183-1187.
- Curtis, J. und F. J. Bourne (1971). "Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs." Biochim Biophys Acta **236**(1): 319-32.
- Damriyasa, I. M., C. Bauer, R. Edelhofer, K. Failing, P. Lind, G. Petersen, G. Schares, A. M. Tenter, R. Volmer und H. Zahner (2004). "Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows." In Press.
- Daszak, P., S. J. Ball, R. M. Pittilo und C. C. Norton (1993). "Ultrastructural evidence for dense granule exocytosis by first-generation merozoites of *Eimeria tenella* in vivo." Parasitol Res **79**(3): 256-8.
- Dauguschies, A., E. Altfeld und M. Rommel (1989a). "Hemostatic alterations in pigs fed sublethal doses of *Sarcocystis miescheriana*." Vet Parasitol **34**(1-2): 1-13.
- Dauguschies, A., M. Jacobs und M. Rommel (1989b). "Herztod bei einem chronisch mit *Sarcocystis miescheriana* infizierten Schwein - Ein Fallbericht-." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **102**(6): 184-7.
- Dauguschies, A., M. Rommel, T. Schnieder, M. Henning und E. Kallweit (1987). "Effects of *Sarcocystis miescheriana* infection on carcass weight and meat quality of halothane-tested fattening pigs." Vet Parasitol **25**(1): 19-31.
- Dauguschies, A., M. Rommel, T. Schnieder, M. Henning und E. Kallweit (1988a). "Effects of *Sarcocystis miescheriana* infection on carcass quality and on the water-binding capacity of the meat of halothane-tested fattening pigs." Vet Parasitol **27**(3-4): 231-7.
- Dauguschies, A., T. Schnieder, M. Rommel und K. Bickhardt (1988b). "The effects of *Sarcocystis miescheriana* infections on blood enzymes and weight gain of stress-sensitive and stress-insensitive pigs." Vet Parasitol **27**(3-4): 221-9.
- Davis, W. C., F. A. Zuckermann, M. J. Hamilton, J. I. Barbosa, A. Saalmuller, R. M. Binns und S. T. Licence (1998). "Analysis of monoclonal antibodies that recognize gamma delta T/null cells." Vet Immunol Immunopathol **60**(3-4): 305-16.
- De Libero, G. (1997). "Sentinel function of broadly reactive human gamma delta T cells." Immunol Today **18**(1): 22-6.
- Denham, S., R. Barfoot und E. Jackson (1987). "A receptor of monomeric IgG2b on rat macrophages." Immunology **62**: 69-74.
- Denham, S., R. J. Zwart, J. T. Whittall, M. Pampusch, A. H. Corteyn, A. T. Bianchi, M. P. Murtaugh, R. M. Parkhouse, H. Tlaskalova, J. Sinkora, M. Sinkora und Z. Rehakova (1998). "Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells." Vet Immunol Immunopathol **60**(3-4): 317-28.
- Denyer, M. S., T. E. Wileman, C. M. Striling, B. Zuber und H. H. Takamatsu (2006). "Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs



- allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cell." Vet Immunol Immunopathol **110**: 279-292.
- Drossigk, V. U., H. J. Tietz, F. Potzsch, D. Scholz, R. Gantenberg und T. Hiepe (1996). "Einflüsse von *Sarcocystis gigantea*-Extrakt (SGE) auf die Replikation des Humanen Immundefizienz Virus (HIV)." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **109**(2): 41-5.
- Dubey, J. P. (1981). "Development of immunity to sarcocystosis in dairy goats." Am J Vet Res **42**(5): 800-4.
- Dubey, J. P. (1983). "Immunity to sarcocystosis: modification of intestinal coccidiosis, and disappearance of sarcocysts in dairy goats." Vet Parasitol **13**(1): 23-34.
- Dubey, J. P. (1993). "Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals." In: Kreier, J.P. (Ed.): Parasitic Protozoa, Academic Press San Diego, 2nd ed. **6**: 1-158.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, O. C. Kwok und S. K. Shen (2001). "The gamma interferon knockout mouse model for sarcocystis neurona: comparison of infectivity of sporocysts and merozoites and routes of inoculation." J Parasitol **87**(5): 1171-3.
- Dubey, J. P. und E. C. Powell (1994). "Prevalence of Sarcocystis in sows from Iowa." Vet Parasitol **52**(1-2): 151-5.
- Dubey, J. P., C. A. Speer und G. P. Epling (1982). "Sarcocystosis in newborn calves fed *Sarcocystis cruzi* sporocysts from coyotes." Am J Vet Res **43**(12): 2147-64.
- Dubey, J. P., C. A. Speer und R. Fayer (1989). "Sarcocystosis of animals and man." CRC Press, Inc., Florida: 79 ff.
- Dubremetz, J. F. (1993). "Apical organelles (rhoptries, micronemes, dense granules) and host cell invasion by coccidia: what do we know now?" Proc. VI<sup>th</sup> International Coccidiosis conference, June 21-25, 1993, Guelph, Ontario, Canada.
- Dubremetz, J. F. (1998). "Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*." Trends Microbiol **6**(1): 27-30.
- Dubremetz, J. F. und C. Dissous (1980). "Characteristic proteins of micronemes and dense granules from *Sarcocystis tenella* zoites (Protozoa, Coccidia)." Mol Biochem Parasitol **1**(5): 279-89.
- Dubremetz, J. F., E. Ferreira und C. Dissous (1989). "Isolation and partial characterisation of rhoptries and micronemes from *Eimeria nieschulzi* zoites (Sporozoa, Coccidia)." Parasitol Res **75**: 449-54.
- Dubremetz, J. F., N. Garcia-Reguet, V. Conseil und M. N. Fourmaux (1998). "Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa." Int J Parasitol **28**(7): 1007-13.
- Duraisingh, M. T. (2003). "Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 4796-4801.
- Ellison, S. P., A. L. Omara-Opyene, C. A. Yowell, A. E. Marsh und J. B. Dame (2002). "Molecular characterisation of a major 29 kDa surface antigen of *Sarcocystis neurona*." Int J Parasitol **32**(2): 217-25.
- Entzeroth, R. (1985). "Invasion and early development of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa, Sarcocystidae) in tissue cultures." J Protozool **32**(3): 446-53.
- Entzeroth, R. (1992). "Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study of *Sarcocystis muris* in cell culture." Eur J Cell Biol **59**: 405-413.

- Entzeroth, R. (2000). "Infektionsstrategien von Protozoen." Nova Acta Leopoldina NF **83** **316**: 37-45.
- Entzeroth, R., J. F. Dubremetz, D. Hodick und E. Ferreira (1986). "Immunoelectron microscopic demonstration of the exocytosis of dense granule contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa)." Eur J Cell Biol **41**(2): 182-8.
- Entzeroth, R., A. König und J. F. Dubremetz (1991). "Monoclonal antibodies identify micronemes and a new population of cytoplasmic granules cross-reacting with micronemes of cystozoites of *Sarcocystis muris*." Parasitol Res **77**(1): 59-64.
- Epe, C., N. Coati und T. Schnieder (2004). "Ergebnisse parasitologischer Kotuntersuchungen von Equiden, Hunden, Katzen und Igel in der Jahre 1998-2002." Dtsch Tierarztl Wochenschr **111**(6): 243-247.
- Epe, C., S. Ising-Volmer und M. Stoye (1993). "Ergebnisse parasitologischer Kotuntersuchungen von Equiden, Hunden, Katzen und Igel in der Jahre 1984-1991." Dtsch Tierarztl Wochenschr **100**(11): 426-428.
- Epe, C., T. Schnieder und M. Stoye (1998). "Ergebnisse parasitologischer Kotuntersuchungen von Equiden, Hunden, Katzen und Igel in der Jahre 1993-1997." Wien. Tierarztl. Monatsschr. **85**: 435-439.
- Erber, M. (1977). "Erkennen und Differenzieren von *Sarcocystis* sp. im Schwein." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **90**(24): 480-2.
- Erber, M. und O. Geisel (1979). "Das klinische Bild und die Pathologie von *Sarcocystis suicanis*-Infektionen im Schwein." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **92**(10): 197-202.
- Eschenbacher, K. H., H. Klein, I. Sommer, H. E. Meyer, R. Entzeroth, H. Mehlhorn und W. Ruger (1993). "Characterization of cDNA clones encoding a major microneme antigen of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa) cyst merozoites." Mol Biochem Parasitol **62**(1): 27-36.
- Evans, R. L., T. J. Faldetta, R. E. Humphreys, D. M. Pratt, E. J. Yunis und S. F. Schlossman (1978). "Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens." J Exp Med **148**(5): 1440-5.
- Farooqui, A. A., D. D. Adams, W. L. Hanson und A. K. Prestwood (1987). "Studies on the enzymes of *Sarcocystis suicanis*: purification and characterization of an acid phosphatase." J Parasitol **73**(4): 681-8.
- Fayer, R. und J. P. Dubey (1984). "Protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle." Vet Parasitol **15**(3-4): 187-201.
- Fayer, R. und A. J. Johnson (1973). "Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infected with sporocysts from dogs." J Parasitol **59**(6): 1135-7.
- Fayer, R. und R. M. Kocan (1971). "Prevalence of *Sarcocystis* in grackles in Maryland." J Protozool **18**(3): 547-8.
- Ford, G. E. (1985). "Immunity of sheep to homologous challenge with dog-borne *Sarcocystis* species following varying levels of prior exposure." Int J Parasitol **15**(6): 629-34.
- Fourmaux, M. N., A. Achbarou, O. Mercereau-Puijalon, C. Biderre, I. Briche, A. Loyens, C. Odberg-Ferragut, D. Camus und J. F. Dubremetz (1996). "The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface." Mol Biochem Parasitol **83**(2): 201-10.
- Frelief, P. F. (1980). "Experimentally induced bovine sarcocystosis: correlation of in vitro lymphocyte function with structural changes in lymphoid tissue." Am J Vet Res **41**(8): 1201-7.

- Freyer, B., K. H. Eschenbacher, H. Mehlhorn und W. Rueger (1998). "Isolation and characterization of cDNA clones encoding a 32-kDa dense-granule antigen of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa)." Parasitol Res **84**(7): 583-9.
- Freyer, B., T. Hansner, H. Mehlhorn und W. Ruger (1999). "Characterization of a genomic region encoding the 32-kDa dense granule antigen of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa)." Parasitol Res **85**(11): 923-7.
- Furmanski, K. (1987). "Häufigkeit von Infektionen mit *Sarcocystis miescheriana* und *Sarcocystis suihominis* bei Schlachtschweinen in bezug auf verschiedene Betriebssysteme." Dr. Med. Vet. Thesis, School of Veterinary Medicine Hannover: 78.
- Gasbarre, L. C., P. Suter und R. Fayer (1984). "Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*." Am J Vet Res **45**(8): 1592-6.
- Gobel, E., M. Katz und M. Erber (1978). "[Light and electron microscopic studies to the development of muscle cysts of *Sarcocystis suicanis* in experimentally infected pigs (author's transl)]." Zentralbl Bakteriol [Orig A] **241**(3): 368-83.
- Gracie, J. A. und J. A. Bradley (1996). "Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass." Eur J Immunol **26**(6): 1217-21.
- Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L. L. Lanier, L. J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger und M. B. Brenner (1989). "Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system." J Exp Med **169**(4): 1277-94.
- Gross, U., W. Bohne, M. Soête und J. F. Dubremetz (1996). "Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*." Parasitol Today **12**: 30-33.
- Haas, W., P. Pereira und S. Tonegawa (1993). "Gamma/delta cells." Annu Rev Immunol **11**: 637-85.
- Handman, E., J. W. Goding und J. S. Remington (1980). "Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **124**(6): 2578-83.
- Hansner, T., B. Freyer, H. Mehlhorn und W. Ruger (1999). "Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a thiol proteinase of *Sarcocystis muris* cyst merozoites (Apicomplexa)." Parasitol Res **85**: 749-757.
- Haverson, K., A. Saalmüller, B. Alvarez, F. Alonso, M. Bailey, A. T. Bianchi, W. J. Boersma, Z. Chen, W. C. Davis, J. Dominguez, H. Engelhardt, A. Ezquerra, L. S. Grosmaire, M. J. Hamilton, E. Hollemweguer, C. A. Huang, K. V. Khanna, G. Kuebart, G. Lackovic, J. A. Ledbetter, R. Lee, D. Llanes, J. K. Lunney, K. C. McCullough, T. Molitor, J. Nielsen, T. A. Niewold, M. D. Pescovitz, J. M. de la Lastra, Z. Rehakova, H. Salmon, W. M. Schnitzlein, J. Seebach, A. Simon, J. Sinkora, M. Sinkora, C. R. Stokes, A. Summerfield, L. Sver, E. Thacker, I. Valpotic, H. Yang, F. A. Zuckermann und R. Zwart (2001a). "Overview of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens." Vet Immunol Immunopathol **80**(1-2): 5-23.
- Haverson, K., A. Saalmüller, Z. Chen, C. A. Huang, A. Simon, J. Seebach, W. J. Boersma, R. Zwart, T. A. Niewold, E. Thacker, D. Llanes, J. M. de la Lastra, H. Engelhardt, A. Ezquerra, F. Alonso, J. Dominguez, J. A. Ledbetter, L. Grosmaire, R. Lee, J. Nielsen, H. Salmon, I. Valpotic, L. Sver, G. Lackovic, A. Summerfield und K. V. Khanna (2001b). "Summary of the first round analyses of the Third International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation Antigens." Vet Immunol Immunopathol **80**(1-2): 25-34.

- Hepp, S. und G. Reiner (2006). "Phänotypische und genetische Parameter ausgewählter klinischer und klinisch-chemischer Merkmale zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber *Sarcocystis miescheriana* im F2-Modell beim Schwein." INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen: 3-4.
- Heydorn, A. O. (1977). "Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. IX. Entwicklungszyklus von *Sarcocystis suihomonis* n. spec." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **90**(11): 218-24.
- Heydorn, A. O., F. R. Matuschka und V. Ipczynski (1981). "Zur Schizogonie von *Sarcocystis suicanis* im Schwein." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **94**(3): 49-51.
- Heydorn, A. O. und J. H. Weniger (1988). "Einfluß einer akuten *Sarcocystis suihominis*-Infektion auf die Mastleistung von Absatzferkeln." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **101**(9): 307-10.
- Hinaidy, H. und R. Supperer (1979). "Sarkosporidienbefall des Schweines in Österreich." Wien. Tieraerztl. Monatsschr. **66**: 281.
- Hirt, W., A. Saalmüller und M. J. Reddehase (1990a). "Distinct gamma/delta T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes." Eur J Immunol **20**(2): 265-9.
- Hirt, W., A. Saalmüller und M. J. Reddehase (1990b). "Distinct gamma/delta T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2-CD4-CD8- T lymphocytes." Eur J Immunol **20**(2): 265-9.
- Holz, J. (1953). "Die Pathogenität der Sarkosporidien." Mh. Tierheilkunde **5**: 348-356.
- Hopkins, J., B. M. Dutia und I. McConnell (1986). "Monoclonal antibodies to sheep lymphocytes. I. Identification of MHC class II molecules on lymphoid tissue and changes in the level of class II expression on lymph-borne cells following antigen stimulation in vivo." Immunology **59**(3): 433-8.
- Hughes-Jones, N. C., B. D. Gorick und J. C. Howard (1983). "The mechanism of synergistic complement-mediated lysis of rat red cells by monoclonal IgG antibodies." Eur J Immunol **13**(8): 635-41.
- Huynh, M. H. e. a. (2003). "Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex." EMBO J. **22**: 2082-2090.
- Jäkel, T., M. Scharpfenecker, P. Jitrawang, J. Ruckle, D. Kliemt, U. Mackenstedt, S. Hongnark und Y. Khoprasert (2001). "Reduction of transmission stages concomitant with increased host immune responses to hypervirulent *Sarcocystis singaporensis*, and natural selection for intermediate virulence." Int J Parasitol **31**(14): 1639-47.
- Jewett, T. J. und L. D. Sibley (2003). "Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites." Mol Cell Biol **11**: 885-894.
- Jewett, T. J. und L. D. Sibley (2004). "The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival." J. Biol. Chem. **279**: 9362-9369.
- Johnson, A. J., P. K. Hildebrandt und R. Fayer (1975). "Experimentally induced sarcocystis infection in calves: pathology." Am J Vet Res **36**(7): 995-9.
- Joiner, K. A. (1991). "Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue." Parasitol. Today **7**: 226-227.

- Jonjic, S. und U. H. Koszinowski (1984). "Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine." J Immunol **133**(2): 647-52.
- Kaneko, O., D. A. Fidock, O. M. Schwartz und L. H. Miller (2000). "Disruption of the C-terminal region of EBA-175 in the Dd2/Nm clone of *Plasmodium falciparum* does not affect erythrocyte invasion." Mol Biochem Parasitol **110**: 135-46.
- Kaufmann, S. H., C. Blum und S. Yamamoto (1993). "Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9620-4.
- Kawazoe, U., F. M. Tomley und J. A. Frazier (1992). "Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites." Parasitology **104**(Pt 1): 1-9.
- Kenmochi, T., Y. Mullen, M. Miyamoto und E. Stein (1994). "Swine as an allotransplantation model." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 177-83.
- Kimata, I. und K. Tanabe (1987). "Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell." J Cell Sci **88** (Pt 2): 231-9.
- Klein, H. und e. al. (1996). "*In vitro* biosynthesis and *in vivo* processing of the major microneme antigen of *Sarcocystis muris* cyst merozoites." Parasitol Res **82**: 468-474.
- Klein, H. und e. al. (1998). "Expression, purification and biochemical characterization of a recombinant lectin of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa) cyst merozoites." Glycoconjugate J. **15**: 147-153.
- Klein, H., S. Mueller, B. Loeschner, R. R. Toenjes, G. Braun, E. C. Mueller, A. Otto und T. Montag (2003). "Cloning, sequencing and recombinant expression of the open reading frame encoding a novel member of the *Sarcocystis muris* (Apicomplexa) microneme lectin family." Parasitol Res **90**(1): 84-6. Epub 2003 Feb 14.
- Kühn, J. (1865). "Untersuchungen über die Trichinenkrankheit der Schweine." Mitteilungen des Landwirtschaftlichen Institutes der Universität du Halle **1**.
- Labbé, A. (1899). "Sporozoa." Das Tierreich **5**: 116.
- Lankester, E. R. (1882). "On *Drepanidium ranarum* the cell-parasite of the frog's blood and spleen (Gaule's Würmchen)." Q. J. Microsc. **22**: 53.
- Lerliche, M. A. und J. F. Dubremetz (1990). "Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion." Parasitol Res **76**(7): 559-62.
- Levine, N. (1973). "Introduction, history and taxonomy. In: The Coccidia (Hammond, D.M.; Long, P.L.)." University Park Press, Baltimore: 1-23.
- Levine, N. D. (1986). "The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species." J Parasitol **72**(3): 372-82.
- Liang, F., D. Granstrom, X. Zhao und J. Timoney (1998). "Evidence that surface proteins Sn 14 and Sn 16 of *Sarcocystis neurona* merozoites are involved in infection and immunity." Infect Immun **66**(5): 1834-8.
- Lovett, J. L. und L. D. Sibley (2003). "Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells." J. Cell Sci. **116**: 3009-3016.
- Lunney, J. K. (1993). "Characterization of swine leukocyte differentiation antigens." Immunol Today **14**(4): 147-8.
- Lunney, J. K. und K. D. Murrell (1988). "Immunogenetic analysis of *Trichinella spiralis* infections in swine." Vet. Parasitol. **29**(2-3): 179-193.

- Mackay, C. R. und W. R. Hein (1990). "Analysis of gamma delta T cells in ruminants reveals further heterogeneity in gamma delta T-cell features and function among species." Res Immunol **141**(7): 611-4.
- Mackay, C. R. und W. R. Hein (1991). "Marked variations in gamma delta T cell numbers and distribution throughout the life of sheep." Curr Top Microbiol Immunol **173**: 107-11.
- Mackay, C. R., J. F. Maddox und M. R. Brandon (1986). "Three distinct subpopulations of sheep T lymphocytes." Eur J Immunol **16**(1): 19-25.
- Madden, K. B., R. F. Moeller, Jr., L. W. Douglass, T. Goldman und J. K. Lunney (1993). "Trichinella spiralis: genetic basis and kinetics of the anti-encysted muscle larval response in miniature swine." Exp Parasitol **77**(1): 23-35.
- Marsh, A. E., C. Hyun, B. C. Barr, R. Tindall und J. Lakritz (2002). "Characterization of monoclonal antibodies developed against Sarcocystis neurona." Parasitol Res **88**(6): 501-6. Epub 2002 Mar 8.
- McMenamin, C., C. Pimm, M. McKersey und P. G. Holt (1994). "Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells." Science **265**(5180): 1869-71.
- Mehlhorn, H. und A. O. Heydorn (1978). "The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure." Adv Parasitol **16**: 43-91.
- Meissner, M. (2002). "Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion." Science **298**: 837-840.
- Mercier, C., K. D. Z. Adjogble, W. Däubner und M. F. Cesbron-Delauw (2005). "Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites?" Int J Parasitol **35**: 829-849.
- Miescher, F. (1843). "Über eigentümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus." Ber. Verh. Naturforsch. Ges. **5**: 198.
- Montag, T., M. Bornhak, B. Loeschner, H. Klein, A. Otto, N. Zyto und R. Entzeroth (1997). "Lectins of the protozoan parasites *Sarcocystis gigantea* and *Sarcocystis muris*: Biochemical, immunological and functional characterization." Eur J Cell Biol Suppl. **46** **74**: 21.
- Montag, T., H. J. Tietz, E. Brose, C. Liebenthal, W. Mann, T. Hiepe, F. Hiepe und J. Coupek (1987). "The mitogenicity of extracts from *Sarcocystis gigantea* macrocysts is due to lectin(s)." Parasitol Res **74**(2): 112-5.
- Mordue, D. G. und E. al. (1999). "Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring." J. Exp. Med. **190**: 1783-1792.
- Moreno, S. N. und L. Zhong (1996). "Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites." Biochem. J. **347**: 243-253.
- Narum, D. L. und A. W. Thomas (1994). "Differential localization of fulllength and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites." Mol Biochem Parasitol **67**: 59-68.
- Neumayer, F. J. (1982). "Versuche zum Nachweis der Sarkosporidiose des Schweines mit dem IHA, IFAT und ELISA." Dr. Vet. Med. Thesis, Ludwig Maximilian University München: 41 pp.
- Ngo, H. M., M. Yang und K. A. Joiner (2004). "Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?" Mol Microbiol **52**(6): 1531-41.
- Nichols, B. A., M. L. Chiappino und G. R. O'Connor (1983). "Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion." J Ultrastruct Res **83**(1): 85-98.

- O'Donoghue, P. und M. Rommel (1992). "Australian-German collaborative studies on the immunology of *Sarcocystis* infections." Angew Parasitol **33**(2): 102-19.
- O'Donoghue, P. J., M. Rommel, M. Weber und H. Weyreter (1985). "Attempted immunization of swine against acute sarcocystosis using cystozoite-derived vaccines." Vet Immunol Immunopathol **8**(1-2): 83-92.
- O'Donoghue, P. J. und H. Weyreter (1983). "Detection of *Sarcocystis* antigens in the sera of experimentally-infected pigs and mice by an immunoenzymatic assay." Vet Parasitol **12**(1): 13-29.
- O'Donoghue, P. J. und H. Weyreter (1984). "Examinations on the serodiagnosis of *Sarcocystis* infections. II. Class-specific immunoglobulin responses in mice, pigs, and sheep." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] **257**(1): 168-84.
- O'Donoghue, P. J. und R. G. Wilkinson (1988). "Antibody development and cellular immune responses in sheep immunized and challenged with *Sarcocystis tenella* sporocysts." Vet Parasitol **27**(3-4): 251-65.
- Ober, B. T., A. Summerfield, C. Mattlinger, K. H. Wiesmuller, G. Jung, E. Pfaff, A. Saalmuller und H. J. Rziha (1998a). "Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in swine." J Virol **72**(6): 4866-73.
- Ober, B. T., A. Summerfield, C. Mattlinger, K. H. Wiesmuller, G. Jung, E. Pfaff, A. Saalmüller und H. J. Rziha (1998b). "Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in swine." J Virol **72**(6): 4866-73.
- Olsovská, Z., F. Franek und V. Matousek (1982). "Limited enzymatic cleavage of pig immunoglobulin G and of specific antibodies. I. Different resistance of various antibody types to cleavage by pepsin." Folia Biol (Praha) **28**(2): 87-97.
- Omata, Y., A. O. Heydorn, H.-G. Heidrich, I. Igarashi, A. Saito, H. Toba und N. Suzuki (1993). "Survey of *Sarcocystis* spp. infection in slaughtered pigs in East Hokkaido, Japan." J. Protozool. Res. **3**: 29-30.
- Oura, C. A., E. C. Powell, E. Anderson und R. M. Parkhouse (1998). "The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig." J Gen Virol **79**: 1439-1443.
- Ovington, K. S., L. M. Alleva und E. A. Kerr (1995). "Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp." Int J Parasitol **25**: 1331-1351.
- Ovington, K. S. und N. C. Smith (1992). "Cytokines, free radicals and resistance to *Eimeria*." Parasitol Today **8**: 422-426.
- Pandey, K. C. (2002). "Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of *Plasmodium falciparum* EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies." Mol Biochem Parasitol **123**: 23-33.
- Pauly, T., M. König, H. J. Thiel und A. Saalmüller (1998). "Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes." J Gen Virol **79**(Pt 1): 31-40.
- Pereira, A. und M. Bermejo (1988). "Prevalence of *Sarcocystis* cysts in pig and sheep in Spain." Vet. Parasitol. **27**: 353-355.
- Perkins, M. E. (1992). "Rhoptry organelles of apicomplexan parasites." Parasitol. Today **8**: 28-32.
- Pescovitz, M. D., B. Aasted, A. Canals, J. Dominguez, J. S. Vizcaino, R. Pospisil, I. Trebichavsky, H. Salmon, I. Valpotic, W. C. Davis und et al. (1994a). "Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 233-6.

- Pescovitz, M. D., J. K. Lunney und D. H. Sachs (1984). "Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL." J Immunol **133**(1): 368-75.
- Pescovitz, M. D., J. K. Lunney und D. H. Sachs (1985). "Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells." J Immunol **134**(1): 37-44.
- Pescovitz, M. D., A. G. Sakopoulos, J. A. Gaddy, R. J. Husmann und F. A. Zuckermann (1994b). "Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 53-62.
- Peterson, M. G., V. M. Marshall, J. A. Smythe, P. E. Crewther, A. Lew, A. Silva, R. F. Anders und D. J. Kemp (1989). "Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum." Mol Cell Biol **9**(7): 3151-4.
- Pinder, J. C., R. E. Fowley, L. H. Bannister, A. R. Dluzewski und S. M. Mitchell (2000). "Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded?" Parasitol Today **16**: 240-245.
- Pintarič, M., W. Gerner und A. Saalmüller (2008). "Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cell." Vet Immunol Immunopathol **121**: 68-82.
- Plonait, H. und K. Bickhardt (1988). "Blutkrankheiten, Pathophysiologie und Diagnostik." In H. Plonait und K. Bickhardt (eds.), Lehrbuch der Schweinekrankheiten, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg: p. 117-121.
- Pohl, U., J. F. Dubremetz und R. Entzeroth (1989). "Characterization and immunolocalization of the protein contents of micronemes of Sarcocystis muris cystozoites (Protozoa, Apicomplexa)." Parasitol Res **75**(3): 199-205.
- Preiser, P., M. Kaviratne, S. Khan, L. H. Bannister und W. Jarra (2000). "The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion." Microbes Infect **2**: 1461-77.
- Raulet, D. H. (1989). "The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor." Annu Rev Immunol **7**: 175-207.
- Reiner, G. (2003). "Reiner, G. (2003): Evaluierung und Nutzung der natürlichen Krankheitsresistenz beim  
Schwein – aktueller Stand und Möglichkeiten." Tierärztl. Prax. **31**: 151-157.
- Reiner, G., J. Eckert, T. Peischl, S. Bochert, T. Jakel, U. Mackenstedt, A. Joachim, A. Dauschies und H. Geldermann (2002a). "Variation in clinical and parasitological traits in Pietrain and Meishan pigs infected with Sarcocystis miescheriana." Vet Parasitol **106**(2): 99-113.
- Reiner, G., S. Hepp, B. Hertrampf, D. Kliemt, U. Mackenstedt, A. Dauschies und H. Zahner (2007). "Genetic resistance to Sarcocystis miescheriana in pigs following experimental infection." Vet Parasitol **145**: 2-10.
- Reiner, G., E. Melchinger, M. Kramarova, E. Pfaff, M. Buttner, A. Saalmüller und H. Geldermann (2002b). "Detection of quantitative trait loci for resistance/susceptibility to pseudorabies virus in swine." J Gen Virol **83**(Pt 1): 167-72.
- Reiner, G., H. Willems, T. Berge, R. Fischer, F. Köhler, S. Hepp, B. Hertrampf, D. Kliemt, A. Dauschies, H. Zahner, H. Geldermann und U. Mackenstedt (2007a). "Mapping of quantitative trait loci for resistance / susceptibility to Sarcocystis miescheriana in swine." Genomics **89**: 638-646.
- Rejnek, J., J. Kostka und J. Travnicek (1966). "Studies on the immunoglobulin spectrum of porcine serum and colostrum." Folia Microbiol (Praha) **11**(3): 173-8.



- Roberts, S. J., A. L. Smith, A. B. West, L. Wen, R. C. Findly, M. J. Owen und A. C. Hayday (1996). "T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11774-9.
- Rommel, M. (1985). "Sarcocystosis of domestic animals and humans." In Pract **7**(5): 158-60.
- Rommel, M., E. Eckert, E. Kutzer, W. Körting und T. Schnieder (2000a). "Protozoeninfektionen des Schweines: Sarcocystiose." Veterinärmedizinische Parasitologie, Parey **5. Auflage**: pp. 437-440.
- Rommel, M., E. Eckert, E. Kutzer, W. Körting und T. Schnieder (2000b). "Protozoeninfektionen von Hund und Katze." Veterinärmedizinische Parasitologie, Parey **5. Auflage**: pp. 495-526.
- Rommel, M., E. Eckert, E. Kutzer, W. Körting und T. Schnieder (2000c). "Protozoeninfektionen von Hund und Katze: Sarcocystiose." Veterinärmedizinische Parasitologie, Parey **5. Auflage**: S. 517-519.
- Rommel, M. und A. O. Heydorn (1972). "Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. III. Isospora hominis (Railliet und Lucet, 1891) Wenyon, 1923, eine Dauerform der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **85**(8): 143-5.
- Rommel, M., A. O. Heydorn und M. Erber (1979). "Die Sarkosporidiose der Haustiere und des Menschen." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **92**(23): 457-64.
- Rommel, M., A. O. Heydorn, B. Fischle und R. Gestrich (1974). "Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. V. Weitere Endwirte der Sarkosporidien von Rind, Schaf und Schwein und die Bedeutung des Zwischenwirtes für die Verbreitung dieser Parasitose." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **87**(20): 392-6.
- Rommel, M., A. O. Heydorn und F. Gruber (1972). "Beiträge zum Lebenszyklus von Sarkosporidia. 1. Die Sporozysten von *S. tenella* im Katzenkot." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **85**(6): 101-5.
- Rommel, M. und T. Schnieder (1985). "Epizootologie und Bekämpfung der Sarkozystose der Schweine." Angew Parasitol **26**(1): 39-42.
- Rommel, M., A. M. Tenter, K. Horn, A. Dauschies, C. Mertens, A. O. Heydorn, R. Entzeroth, K. H. Eschenbacher und H. Klein (1995). "Sarcocystis." In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M-W., and Coudert, P.: Guidelines on techniques in coccidiosis research. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg: 241-284.
- Saalmüller, A. (1996). "Characterization of swine leukocyte differentiation antigens." Immunol Today **17**(8): 352-4.
- Saalmüller, A. (1998). "Antigen-specific immune response of porcine T lymphocytes to various pathogens." Rev Sci Tech **17**(1): 71-83.
- Saalmüller, A., B. Aasted, A. Canals, J. Dominguez, T. Goldman, J. K. Lunney, S. Maurer, M. D. Pescovitz, R. Pospisil, H. Salmon und et al. (1994a). "Analyses of mAb reactive with porcine CD8." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 249-54.
- Saalmüller, A., B. Aasted, A. Canals, J. Dominguez, T. Goldman, J. K. Lunney, S. Maurer, M. D. Pescovitz, R. Pospisil, H. Salmon und et al. (1994b). "Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte antigens." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 219-28.
- Saalmüller, A., B. Aasted, A. Canals, J. Dominguez, T. Goldman, J. K. Lunney, T. Pauly, M. D. Pescovitz, R. Pospisil, H. Salmon und et al. (1994c). "Analysis of

- mAb reactive with the porcine SWC1." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 255-8.
- Saalmüller, A. und J. Bryant (1994). "Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines." Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 45-52.
- Saalmüller, A., S. Denham, K. Haverson, B. Davis, J. Dominguez, M. D. Pescovitz, C. C. Stokes, F. Zuckermann und J. K. Lunney (1996). "The Second International Swine CD Workshop." Vet Immunol Immunopathol **54**(1-4): 155-8.
- Saalmüller, A., W. Hirt, S. Maurer und E. Weiland (1994d). "Discrimination between two subsets of porcine CD8+ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen." Immunology **81**(4): 578-83.
- Saalmüller, A., W. Hirt und M. J. Reddehase (1989). "Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes." Eur J Immunol **19**(11): 2011-6.
- Saalmüller, A., W. Hirt und M. J. Reddehase (1990). "Porcine gamma/delta T lymphocyte subsets differing in their propensity to home to lymphoid tissue." Eur J Immunol **20**(10): 2343-6.
- Saalmüller, A., S. Jonjic, H. J. Buhning, M. J. Reddehase und U. H. Koszinowski (1987a). "Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. II. Detection of an antigen on resting T cells down-regulated after activation." J Immunol **138**(6): 1852-7.
- Saalmüller, A., G. Kuebart, E. Hollemweguer, Z. Chen, J. Nielsen, F. Zuckermann und K. Haverson (2001). "Summary of workshop findings for porcine T-lymphocyte-specific monoclonal antibodies." Vet Immunol Immunopathol **80**(1-2): 35-52.
- Saalmüller, A. und S. Maurer (1994). "Major histocompatibility antigen class II expressing resting porcine T lymphocytes are potent antigen-presenting cells in mixed leukocyte culture." Immunobiology **190**(1-2): 23-34.
- Saalmüller, A., T. Pauly, B. Aasted, K. T. Jensen, D. H. Sachs, S. Arn, W. C. Davis, Y. H. Park, K. McCullough, A. Summerfield, M. Murtaugh, M. S. Pampusch, K. D. Burger, J. Laber, J. Nielsen, M. D. Pescovitz, C. Stokes, K. Haverson, P. Boyd und J. K. Lunney (1998a). "Summary of the first round analyses of the Second International Swine CD Workshop." Vet Immunol Immunopathol **60**(3-4): 237-49.
- Saalmüller, A., T. Pauly, B. J. Hohlich und E. Pfaff (1999). "Characterization of porcine T lymphocytes and their immune response against viral antigens." J Biotechnol **73**(2-3): 223-33.
- Saalmüller, A., T. Pauly, J. K. Lunney, P. Boyd, B. Aasted, D. H. Sachs, S. Arn, A. Bianchi, R. M. Binns, S. Licence, A. Whyte, F. Blecha, Z. Chen, R. M. Chu, W. C. Davis, S. Denham, H. Yang, T. Whittall, R. M. Parkhouse, J. Dominguez, A. Ezquerro, F. Alonso, G. Horstick, C. Howard, F. Zuckermann und et al. (1998b). "Overview of the Second International Workshop to define swine cluster of differentiation (CD) antigens." Vet Immunol Immunopathol **60**(3-4): 207-28.
- Saalmüller, A., T. Pauly und E. Pfaff (1998c). "Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von T-Lymphozyten des Schweins." Zentralbl Chir **123**(7): 798-802.
- Saalmüller, A. und M. J. Reddehase (1988). "Immune system of swine: dissection of mononuclear leucocyte subpopulations by means of two-colour cytofluorometric analysis." Res Vet Sci **45**(3): 311-6.

- Saalmüller, A., M. J. Reddehase, H. J. Buhning, S. Jonjic und U. H. Koszinowski (1987b). "Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes." Eur J Immunol **17**(9): 1297-301.
- Saalmüller, A., F. Weiland und M. J. Reddehase (1991). "Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility antigen." Immunobiology **183**(1-2): 102-14.
- Saalmüller, A., T. Werner und V. Fachinger (2002). "T-helper cells from naive to committed." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 137-45.
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996). "Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival." Parasitol Today **12**(8): 308-16.
- Sam-Yellowe, T. Y., H. Fujioka, M. Aikawa und M. D.G. (1995). "*Plasmodium falciparum* rhoptry proteins of 140/130/110 kd (Rhop-H) are located in an electron lucent compartment in the neck of the rhoptries." J Eukaryot Microbiol **42**: 224-231.
- Sam-Yellowe, T. Y., H. Shio und M. E. Perkins (1988). "Secretion of *Plasmodium falciparum* rhoptry protein into the plasma membrane of host erythrocytes." J Cell Biol **106**(5): 1507-13.
- Schnieder, T. (2003). "[Parasitological risks--from animal husbandry to food and humans]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **110**(8): 326-8.
- Schnieder, T. und M. Rommel (1983). "Ausbildung und Dauer der Immunität gegen *Sarcocystis miescheriana* im Schwein bei kontinuierlicher Verabreichung kleiner Mengen von Sporozysten." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **96**(5): 167-70.
- Schnieder, T., G. Trautwein und M. Rommel (1984). "Untersuchungen zur Persistenz der Zysten von *Sarcocystis miescheriana* in der Muskulatur des Schweines nach ein- oder mehrmaliger Infektion." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **97**(10): 356-9.
- Scholtyssek, E. (1979). "Fine structure of parasitic protozoa." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 15-34.
- Scholtyssek, E. und H. Mehlhorn (1970). "Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms." Z Parasitenkd **34**(2): 97-127.
- Sciutto, E., J. J. Martinez, M. Huerta, R. Avila, G. Fragoso, N. Villalobos, A. de Aluja und C. Larralde (2003). "Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection." Vet Parasitol **116**(3): 223-229.
- Sibley, L. D. (2003). "*Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style." Traffic **4**: 581-586.
- Sibley, L. D., S. Hakansson und V. B. Carruthers (1998). "Gliding motility: An efficient mechanism for cell penetration." Curr Biol **8**: R12-4.
- Sibley, L. D., J. L. Krahenbuhl, G. M. Adams und E. Weidner (1986). "*Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins." J Cell Biol **103**(3): 867-74.
- Soldati, D., J. F. Dubremetz und M. Lebrun (2001). "Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **31**(12): 1293-302.
- Soldati, D., B. J. Foth und A. F. Cowman (2004). "Molecular and functional aspects of parasite invasion." Trends in Parasitology **20**(12): 567-574.
- Sommer, I., K. Horn, A. O. Heydorn, H. Mehlhorn und W. Ruger (1992). "A comparison of sporozoite and cyst merozoite surface proteins of *Sarcocystis*." Parasitol Res **78**(5): 398-403.

- Sommer, I., H. Mehlhorn und W. Ruger (1991). "Biochemical and immunological characterization of major surface antigens of *Sarcocystis muris* and *S. suicanis* cyst merozoites." Parasitol Res **77**(3): 204-11.
- Speer, C. A. und D. E. Burgess (1988). "In vitro development and antigen analysis of *Sarcocystis*." Parasitol. Today **4**: 46.
- Speer, C. A., W. M. Whitmire, D. W. Reduker und J. P. Dubey (1986). "In vitro cultivation of meronts of *Sarcocystis cruzi*." J Parasitol **72**(5): 677-83.
- Stear, M. J. und D. Wakelin (1998). "Genetic resistance to parasitic infection." Rev Sci Tech **17**(1): 143-53.
- Strobel, J. G., P. Delplace, J. F. Dubremetz und R. Entzeroth (1992). "*Sarcocystis muris* (Apicomplexa): a thiol protease from the dense granules." Exp Parasitol **74**: 100-105.
- Summerfield, A., H. J. Rziha und A. Saalmuller (1996a). "Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes." Cell Immunol **168**(2): 291-6.
- Summerfield, A., H. J. Rziha und A. Saalmüller (1996b). "Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes." Cell Immunol **168**(2): 291-6.
- Tenter, A. M., N. Mencke, C. Pein, P. O'Donoghue und M. Rommel (1989). "Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen *Sarcocystis* spp." Dtsch Tierarztl Wochenschr **96**(2): 63-6.
- Thome, A., A. Saalmuller und E. Pfaff (1993). "Molecular cloning of porcine T cell receptor alpha, beta, gamma and delta chains using polymerase chain reaction fragments of the constant regions." Eur J Immunol **23**(5): 1005-10.
- Thompson, J. e. a. (2004). "PTRAMP: a conserved *Plasmodium* thrombospondin-related apical merozoite protein." Mol Biochem Parasitol **134**: 225-232.
- Tietz, H. J., T. Montag, E. Brose, T. Hiepe, W. Mann, F. Hiepe und H. Halle (1986). "Extracts from *Sarcocystis gigantea* macrocysts are mitogenic for human blood lymphocytes." Angew Parasitol **27**(4): 201-6.
- Tietz, H. J., T. Montag, E. Brose, P. Widera, S. T. Kiessig, W. Mann und T. Hiepe (1990). "*Sarcocystis gigantea* lectin--mitogen and polyclonal B-cell activator." Parasitol Res **76**(4): 332-5.
- Tietz, H. J., T. Montag, E. Brose, P. Widera, W. Sokolowska-Kohler, W. Mann und T. Hiepe (1989). "Interactions between *Sarcocystis gigantea* lectin and toxin-containing fractions in human lymphocyte cultures." Parasitol Res **76**(1): 32-5.
- Tilley, M. und S. J. Upton (1990). "Identification of sporozoite surface proteins and antigens of *Eimeria nieschulzi* (Apicomplexa)." J Protozool **37**(2): 86-90.
- Tizard, I. R. (2004). Veterinary Immunology. An Introduction, Saunders.
- Tomley, F. M., K. J. Billington, J. M. Bumstead, J. D. Clark und P. Monaghan (2001). "EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats." Int J Parasitol **31**(12): 1303-10.
- Tomley, F. M., J. M. Bumstead, K. J. Billington und P. P. Dunn (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*." Mol Biochem Parasitol **79**(2): 195-206.
- Tomley, F. M., L. E. Clarke, U. Kawazoe, R. Dijkema und J. J. Kok (1991). "Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*." Mol Biochem Parasitol **49**(2): 277-88.

- Tomley, F. M. und D. S. Soldati (2001). "Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites." Trends Parasitol **17**(2): 81-8.
- Torii, M., J. H. Adams, L. H. Miller und M. Aikawa (1989). "Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*." Infect Immun **57**: 3230-3233.
- Van Zaane, D. und M. M. Hulst (1987). "Monoclonal antibodies against porcine immunoglobulin isotypes." Vet Immunol Immunopathol **16**(1-2): 23-36.
- van Zaane, D. und J. Ijzerman (1984). "Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulins and their use in isotype-specific ELISAs for rotavirus antibody." J Immunol Methods **72**(2): 427-41.
- Vogeli, P., E. Meijerink, R. Fries, S. Neuenschwander, N. Vorlander, G. Stranzinger und H. U. Bertschinger (1997a). "Ein molekularer Test für den Nachweis des E.-coli-F18-Rezeptors: ein Durchbruch im Kampf gegen Ödemkrankheit und Absetzdurchfall beim Schwein." Schweiz Arch Tierheilkd **139**(11): 479-84.
- Vogeli, P., E. Meijerink, R. Fries, S. Neuenschwander, N. Vorlander, G. Stranzinger und H. U. Bertschinger (1997b). "[A molecular test for the detection of E. coli F18 receptors: a breakthrough in the struggle against edema disease and post-weaning diarrhea in swine]." Schweiz Arch Tierheilkd **139**(11): 479-84.
- Ward, G. E., L. H. Miller und J. A. Dvorak (1993). "The origin of parasitophorous vacuole membrane lipids in malaria-infected erythrocytes." J Cell Sci **106** (Pt 1): 237-48.
- Weber, M., H. Weyreter, P. J. O'Donoghue, M. Rommel und G. Trautwein (1983). "Persistence of acquired immunity to *Sarcocystis miescheriana* infection in growing pigs." Vet Parasitol **13**(4): 287-97.
- Weyreter, H., P. J. O'Donoghue, M. Weber und M. Rommel (1984). "Class-specific antibody responses in pigs following immunization and challenge with sporocysts of *Sarcocystis miescheriana*." Vet Parasitol **16**(3-4): 201-5.
- Witonsky, S., R. M. Gogal, Jr., R. B. Duncan, H. Norton, D. Ward und D. S. Lindsay (2005). "Prevention of meningo/encephalomyelitis due to *Sarcocystis neurona* infection in mice is mediated by CD8 cells." Int. J. Parasitol. **35**: 113-123.
- Witonsky, S., R. M. Gogal, Jr., R. B. Duncan, H. Norton, D. Ward, J. Yang und D. S. Lindsay (2005a). "Humoral immunity is not critical for protection against experimental infection with *Sarcocystis neurona* in B-cell-deficient mice." J. Parasitol. **91**: 830-837.
- Zayed, A. A. und A. El-Ghaysh (1998). "Pig, donkey and buffalo meat as a source of some coccidian parasites infection dogs." Vet Parasitol **78**: 161-168.
- Zenner, L., J. Estaquier, F. Darcy, P. Maes, A. Capron und M. F. Cesbron-Delauw (1999). "Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components." Parasite Immunol **21**(5): 261-72.
- Zielasko, B., J. Petrich, G. Trautwein und M. Rommel (1981). "Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der *Sarcocystis suicanis*-Infektion]." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **94**(11-12): 223-8.
- Zikan, J., P. Sima und L. Tuckova (1983). "Cross-reactivity of human and a putative pig IgD. Pig IgD-like molecules as serum and lymphocyte components." Folia Microbiol (Praha) **28**(6): 474-83.
- Zimmermann, U., T. Schnieder und M. Rommel (1984). "Untersuchungen über die Dynamik der Antikörperentwicklung bei Schweinen nach mehrfacher

Immunisierung mit Sporozysten von *Sarcocystis miescheriana* und einmaliger Belastungsinfektion." Berl Munch Tierarztl Wochenschr **97**(11): 408-11.

Zuckermann, F. A. und R. J. Husmann (1996). "Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells." Immunology **87**(3): 500-12.

## 8 Anhang

### 8.1 Grafiken

#### 8.1.1 Graphische Darstellung der Körpertemperatur

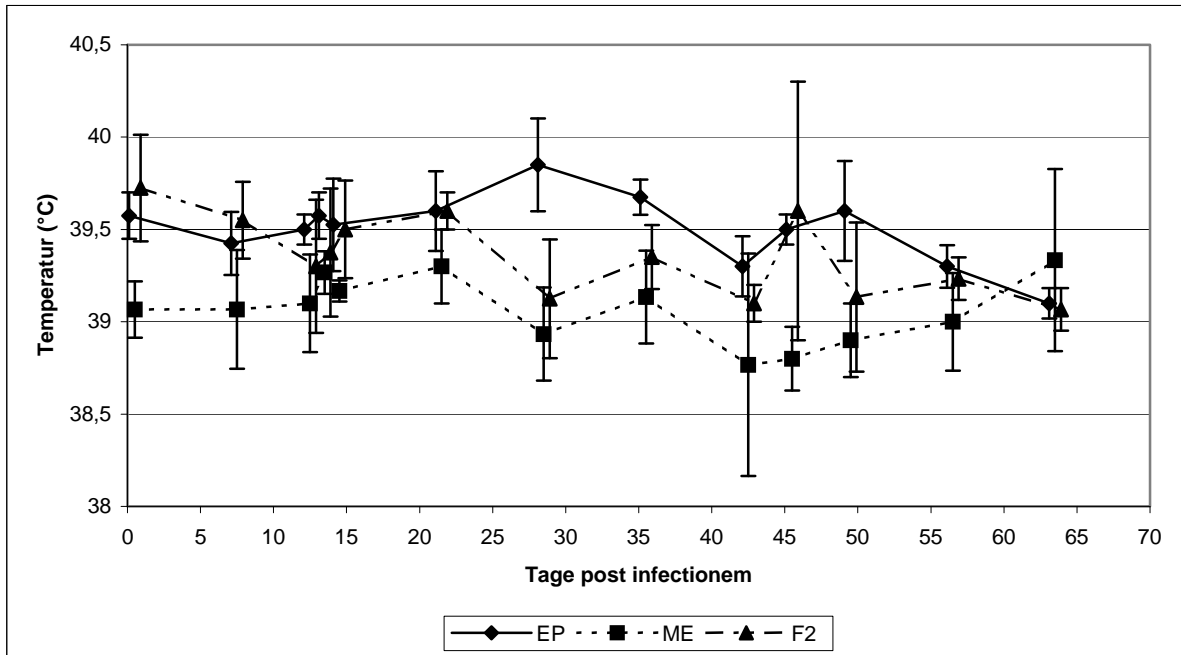


Abbildung 35: Entwicklung der mittleren Körpertemperatur bei den Kontrollgruppen bestehend aus Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

### 8.1.2 Graphische Darstellung der Antikörperspiegel IgM, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub>

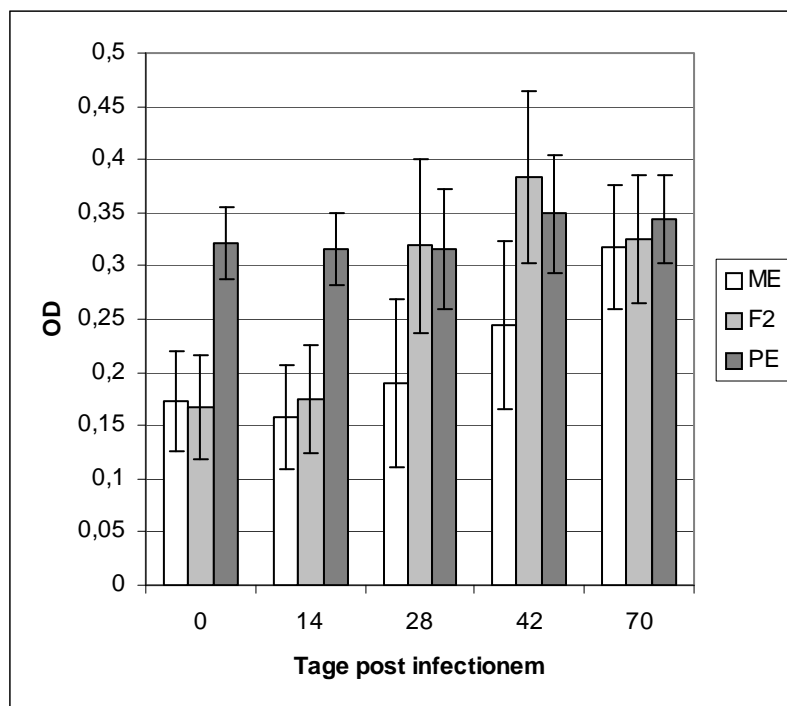


Abbildung 36: IgM-Antikörperspiegel bei den Kontrollgruppen bestehend aus Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

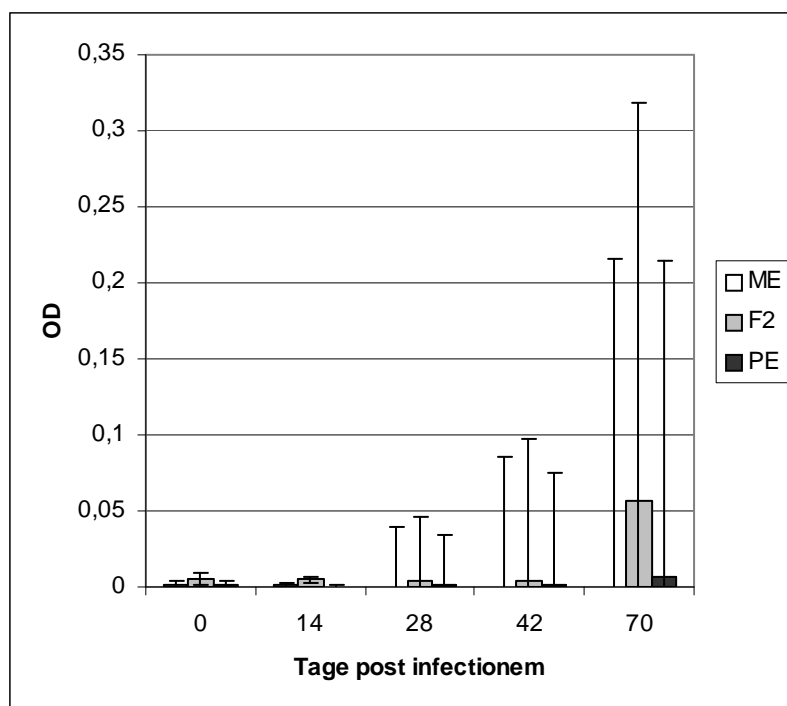


Abbildung 37: IgG<sub>1</sub>-Antikörperspiegel bei den Kontrollgruppen bestehend aus Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



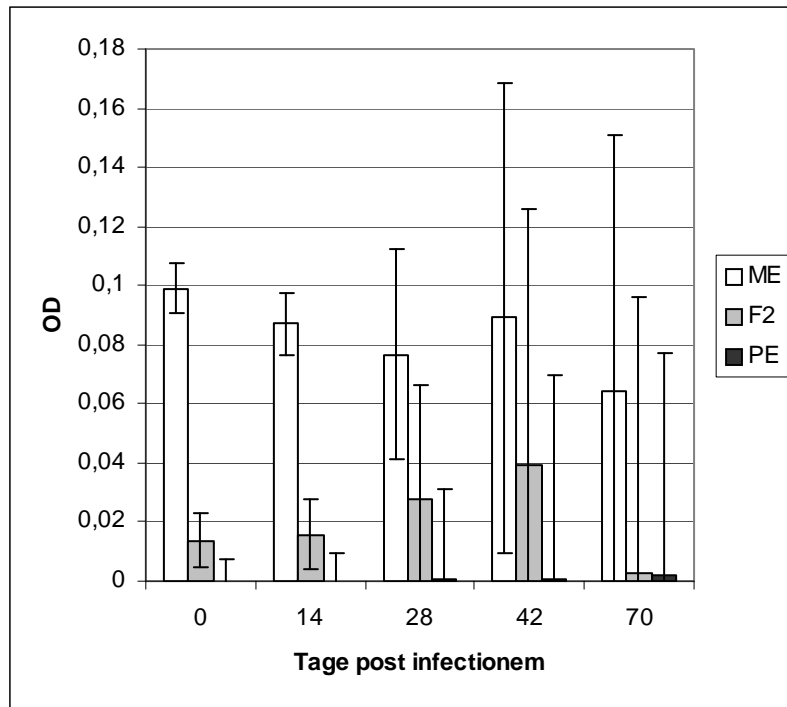


Abbildung 38: IgG<sub>2</sub>-Antikörperspiegel bei den Kontrollgruppen bestehend aus Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

### 8.1.3 Graphische Darstellung der Phänotypisierung von peripheren Blutlymphozyten

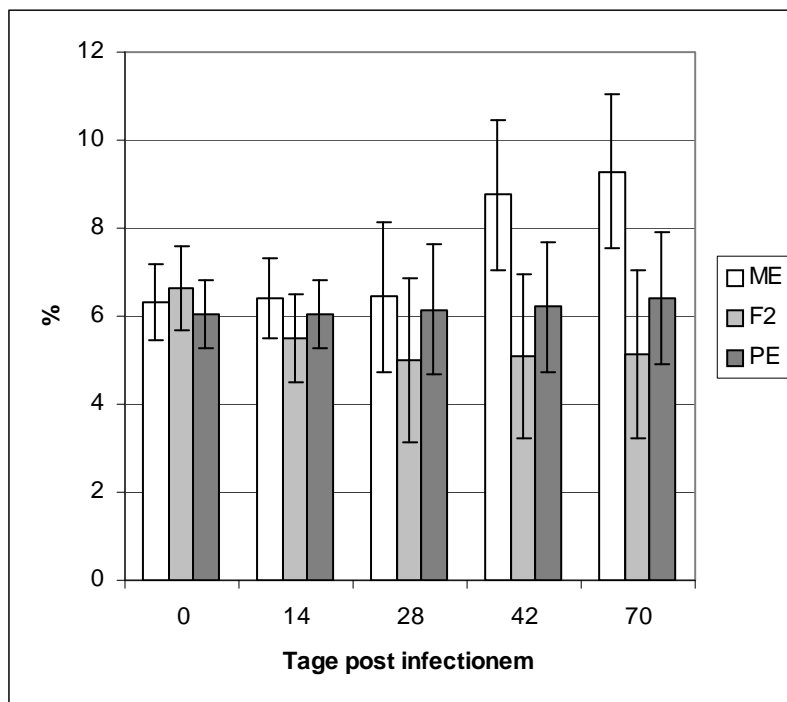


Abbildung 39: Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>high</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

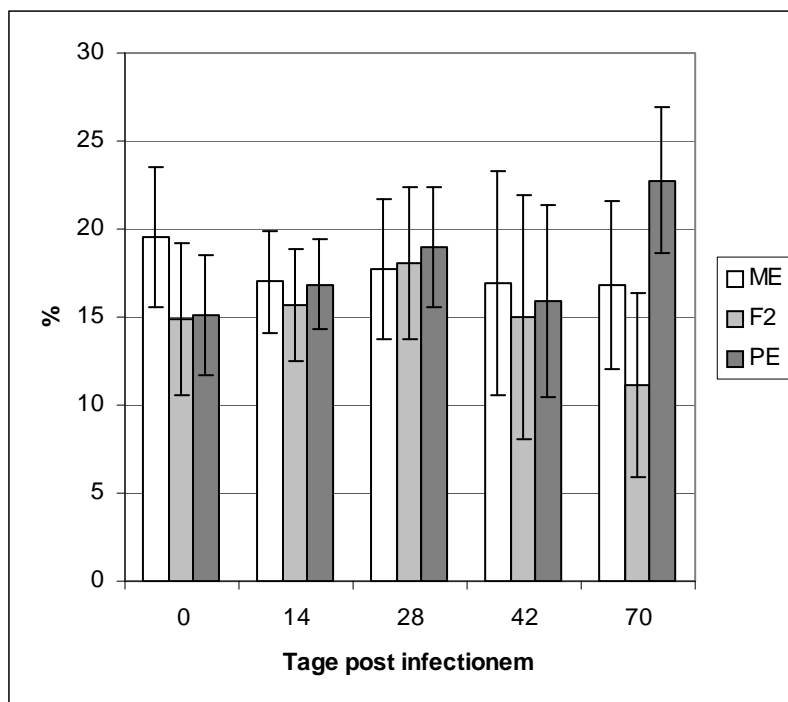


Abbildung 40: Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

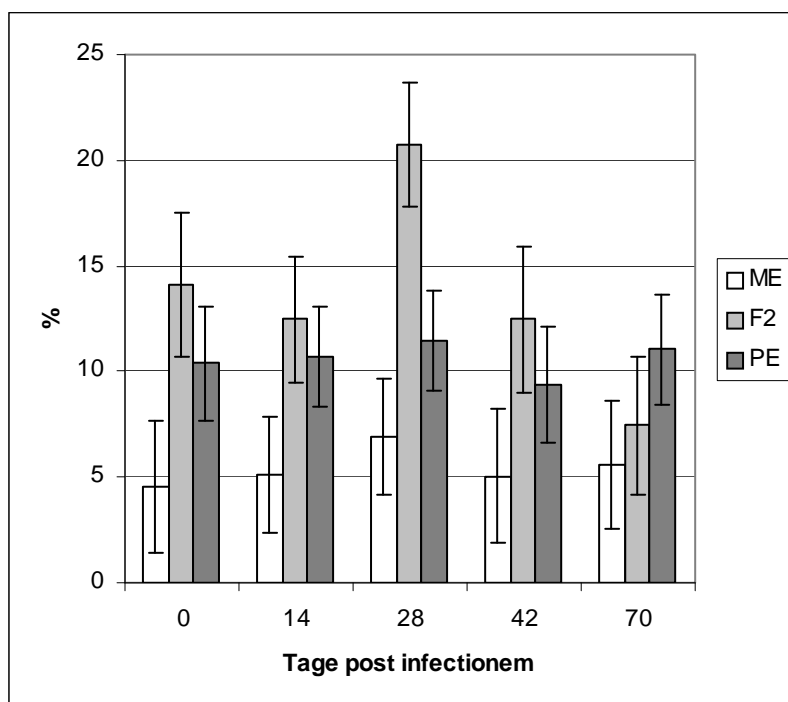


Abbildung 41: Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

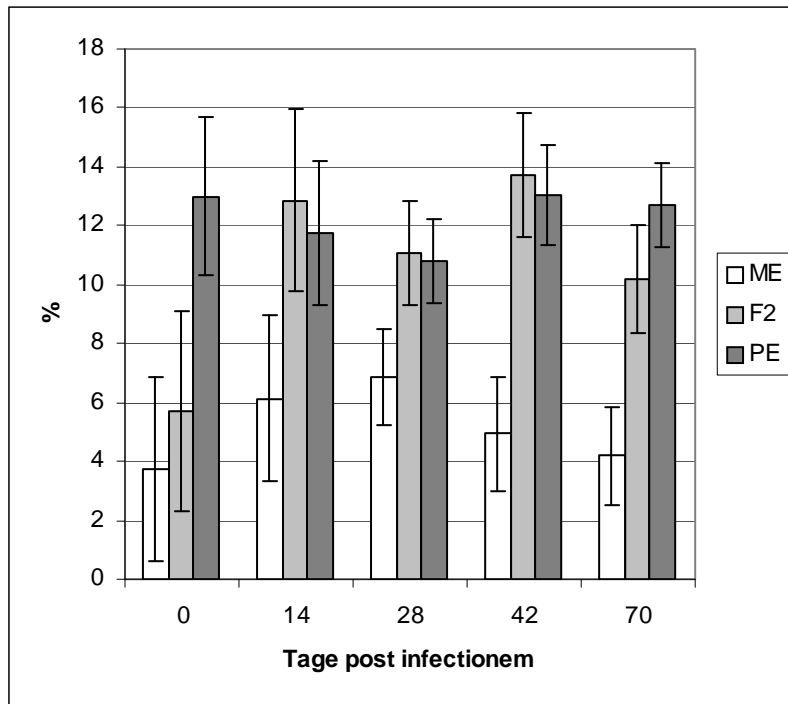


Abbildung 42: Darstellung der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

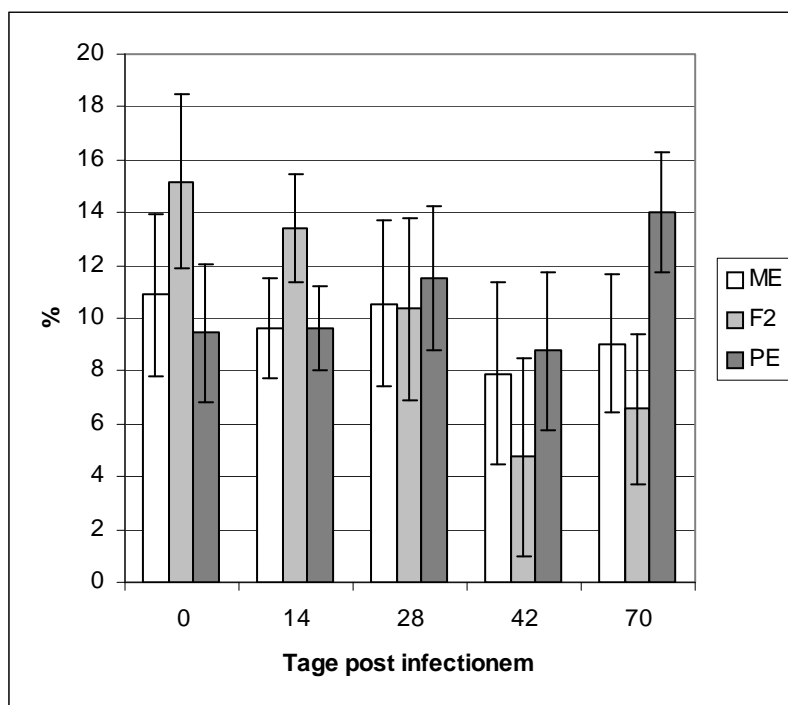


Abbildung 43: Darstellung der CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

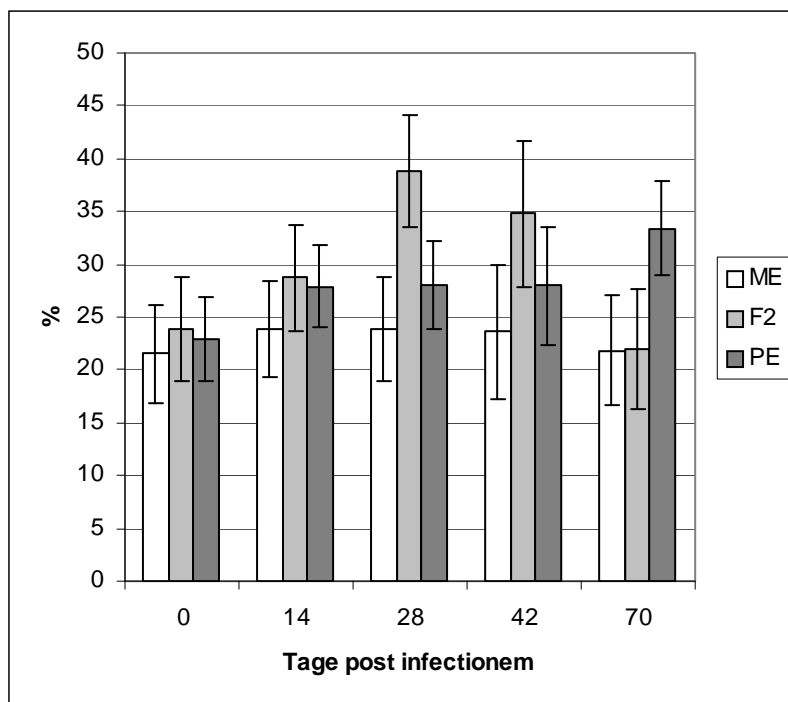


Abbildung 44: Darstellung der CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

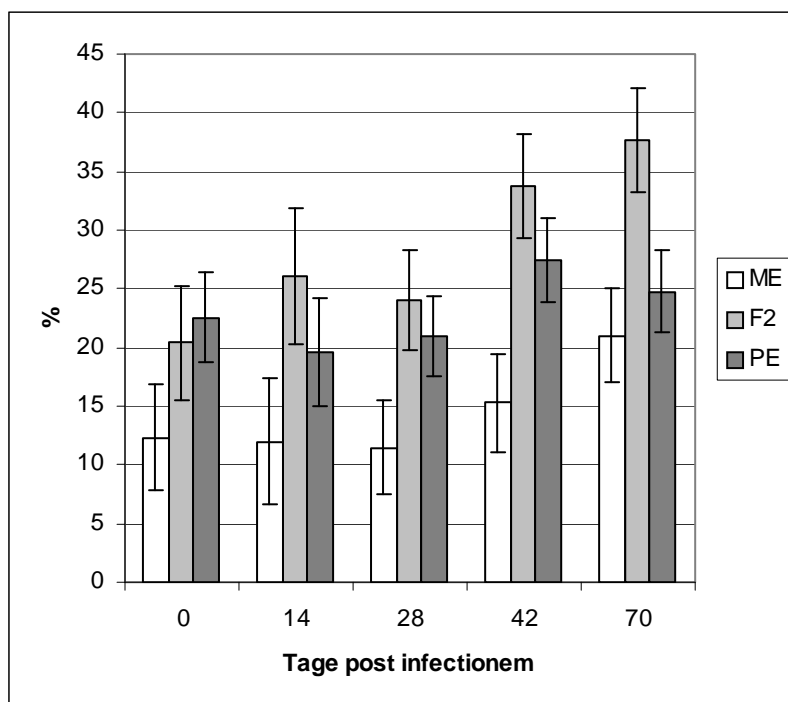


Abbildung 45: Darstellung der CD2<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrain-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

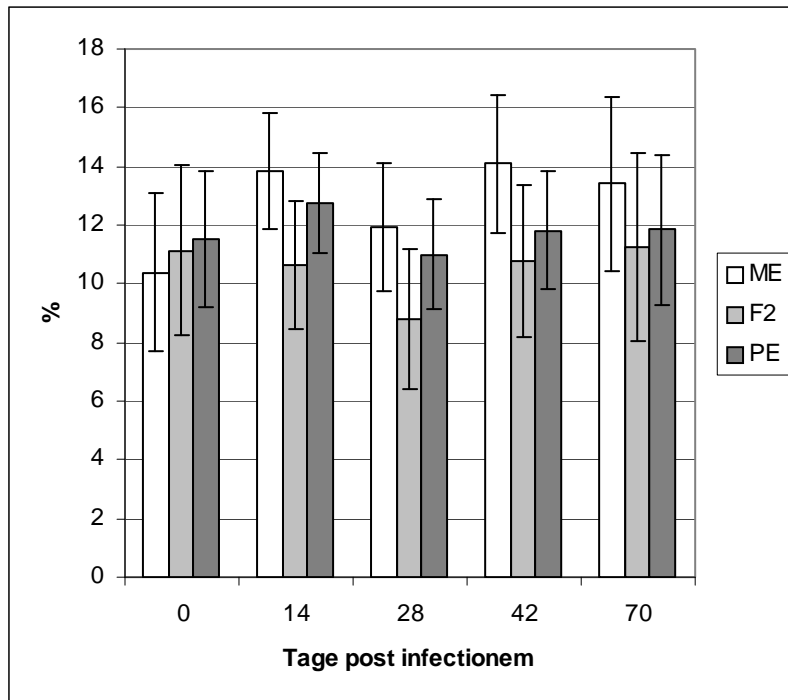


Abbildung 46: Darstellung der CD21-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

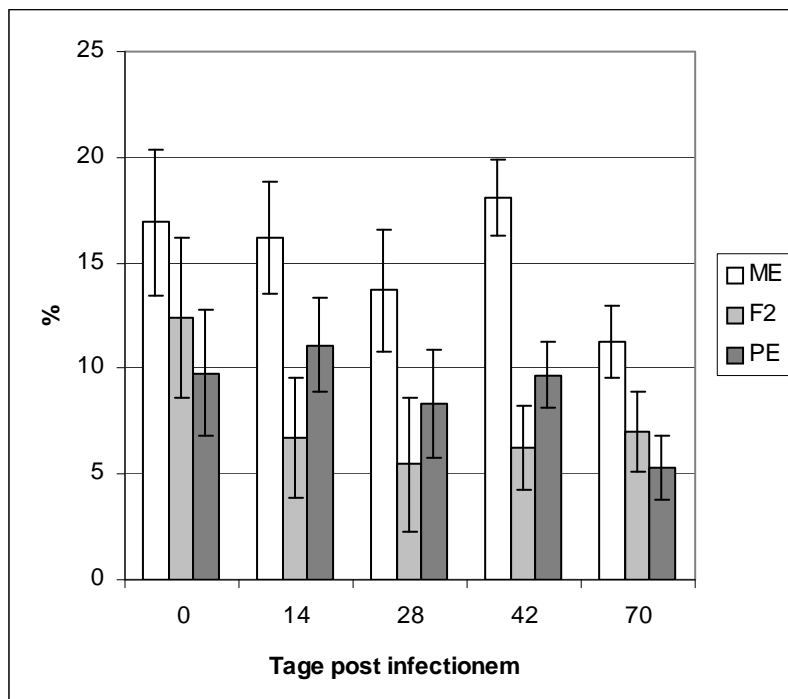


Abbildung 47: Darstellung der SWC3-Expression auf PBL bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

### 8.1.4 Graphische Darstellung der Proliferationsreaktion peripherer Blutlymphozyten

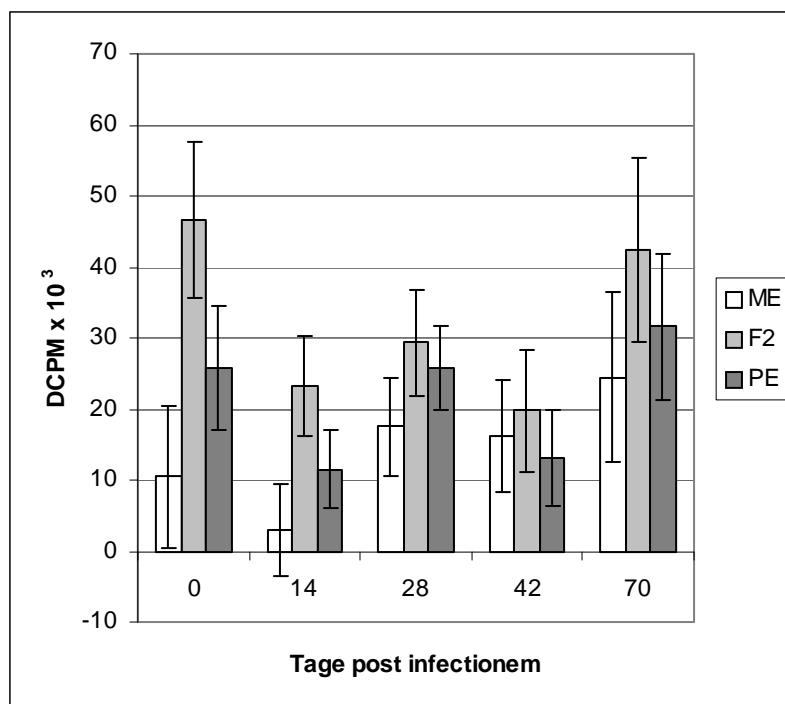


Abbildung 48: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit Con A bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

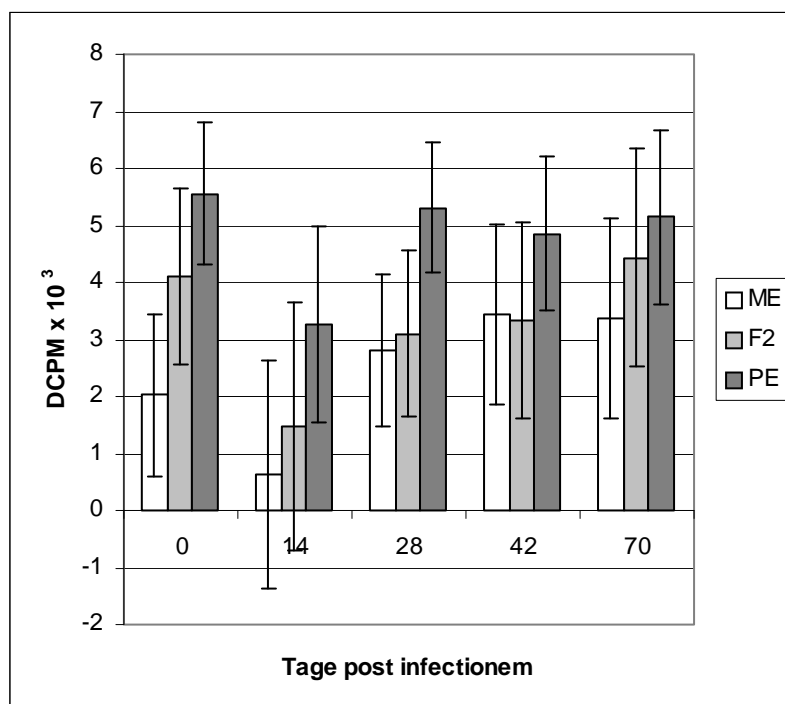
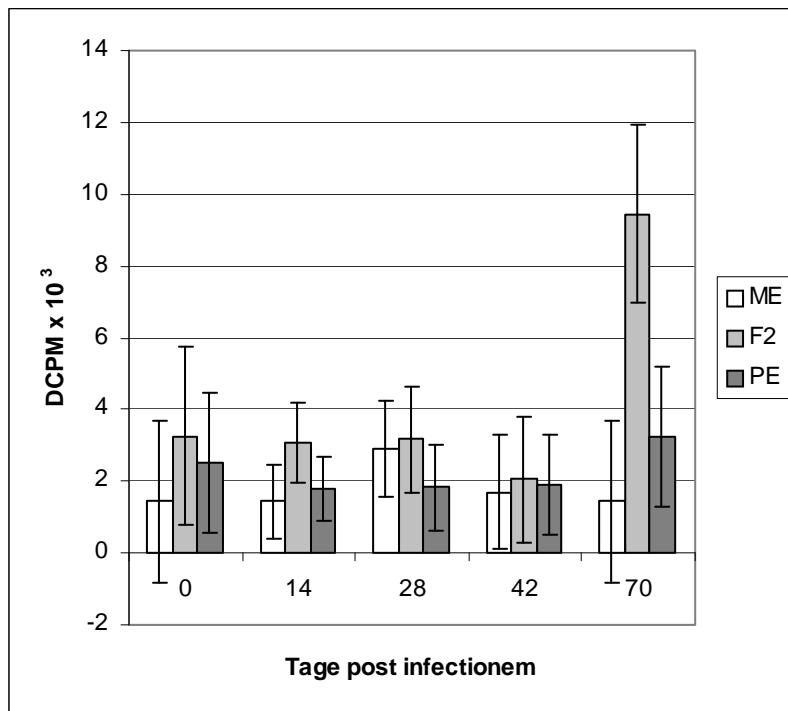
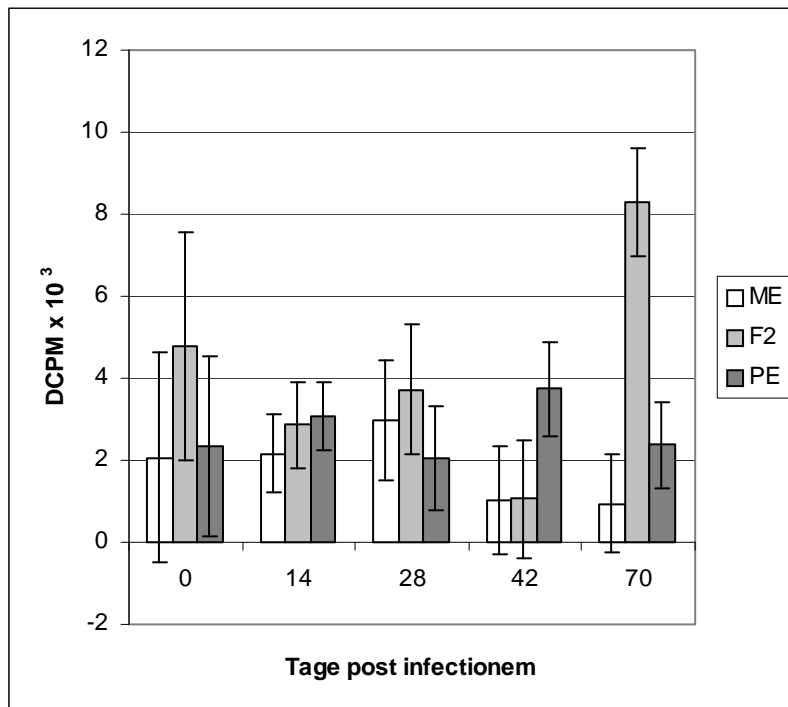


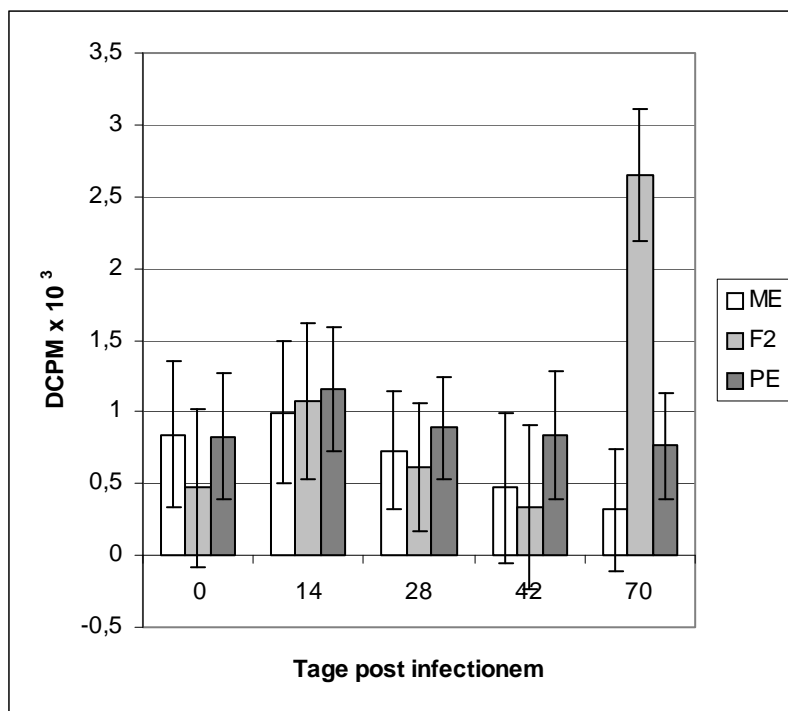
Abbildung 49: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit LPS bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



**Abbildung 50: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit *S. miescheriana*-Antigen bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen**

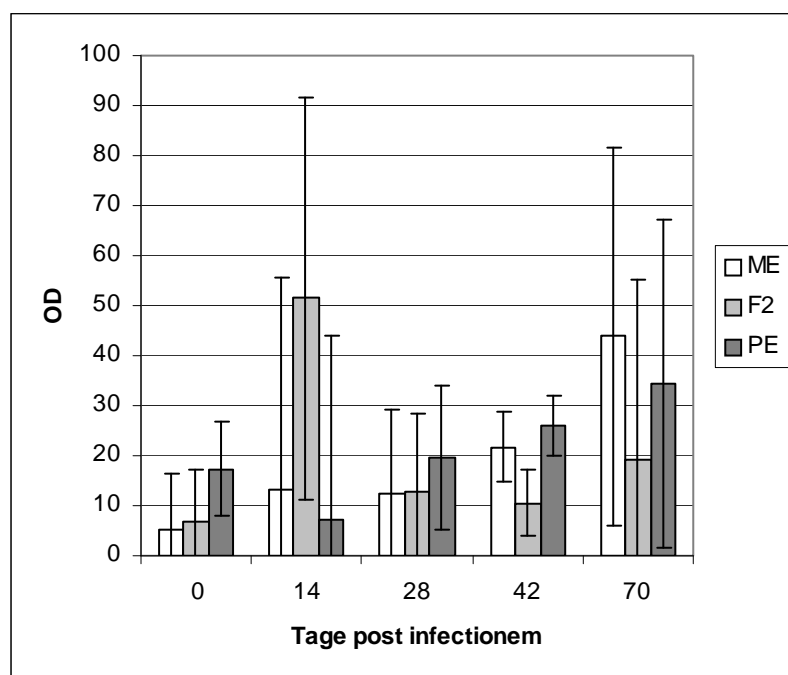


**Abbildung 51: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit *S. singaporensis*-Antigen bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen**



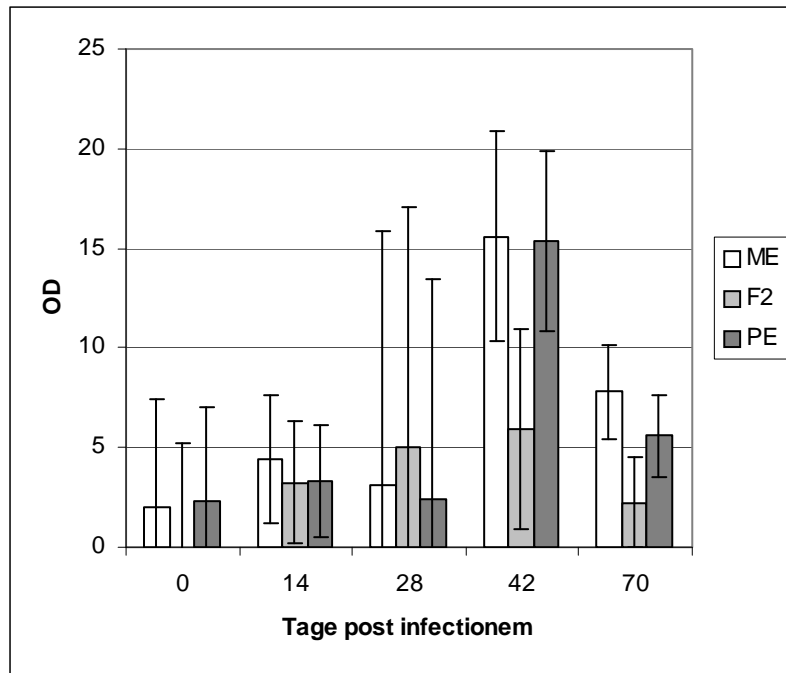
**Abbildung 52: Ergebnis des Lymphozytenproliferationsassays nach der Stimulation mit MOCK bei nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen**

### 8.1.5 Graphische Darstellung der Freisetzung von IL-2

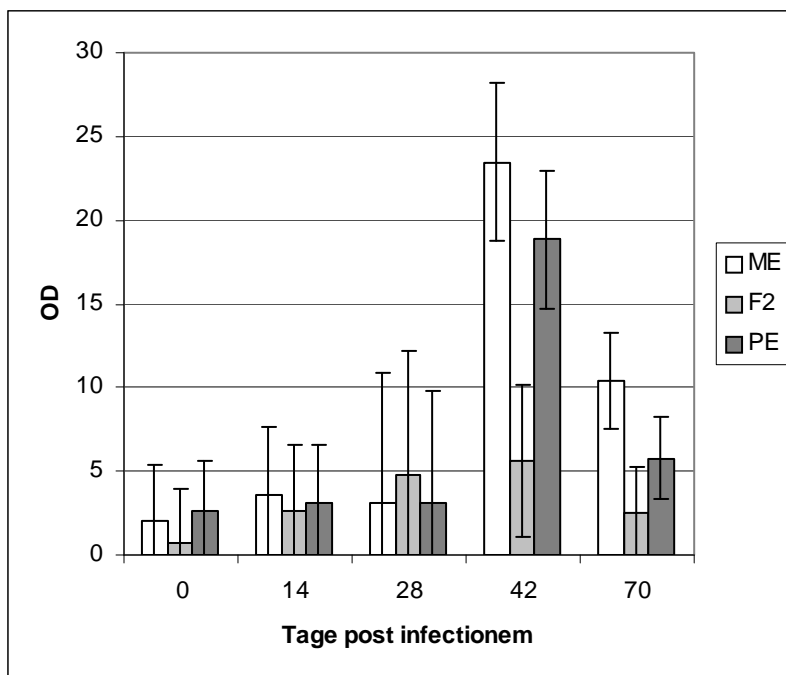


**Abbildung 53: Darstellung der durch Con A induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen**

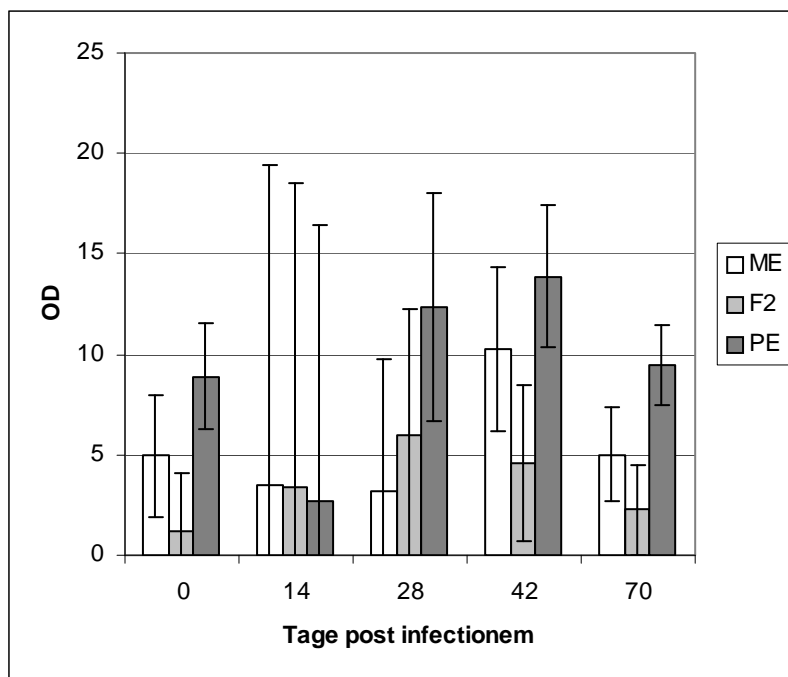




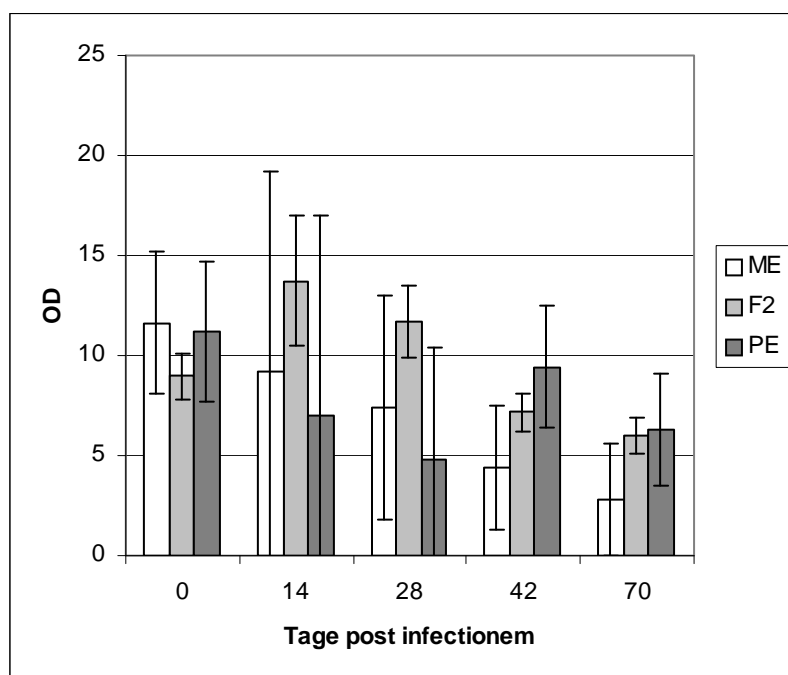
**Abbildung 54:** Darstellung der durch LPS induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



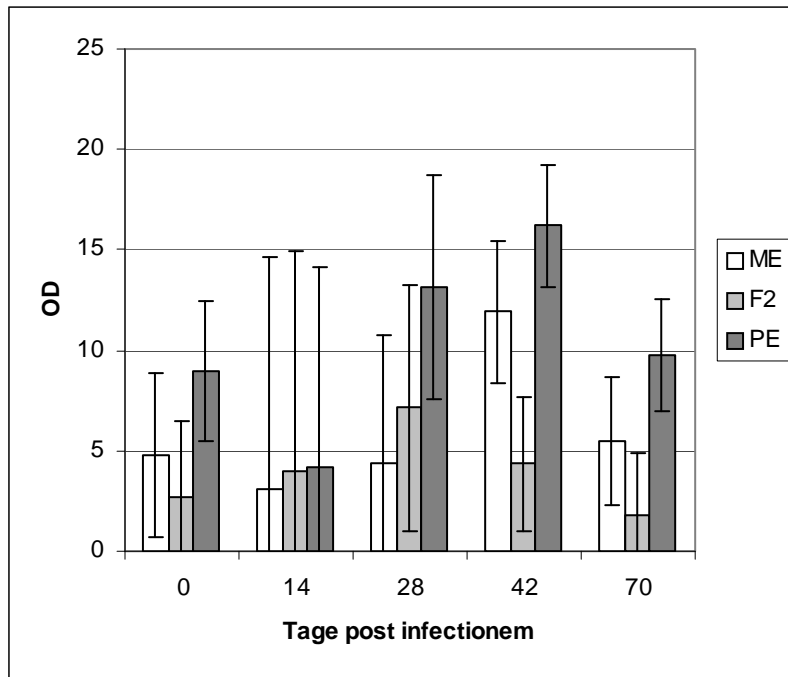
**Abbildung 55:** Darstellung der durch *S. miescheriana*-Antigen induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



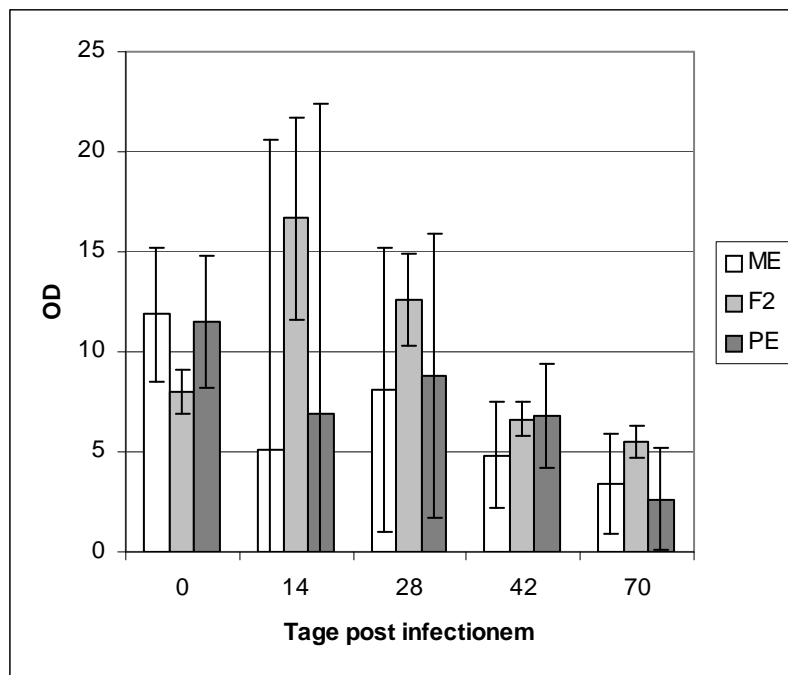
**Abbildung 56:** Darstellung der durch *S. singaporensis*-Antigenen induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



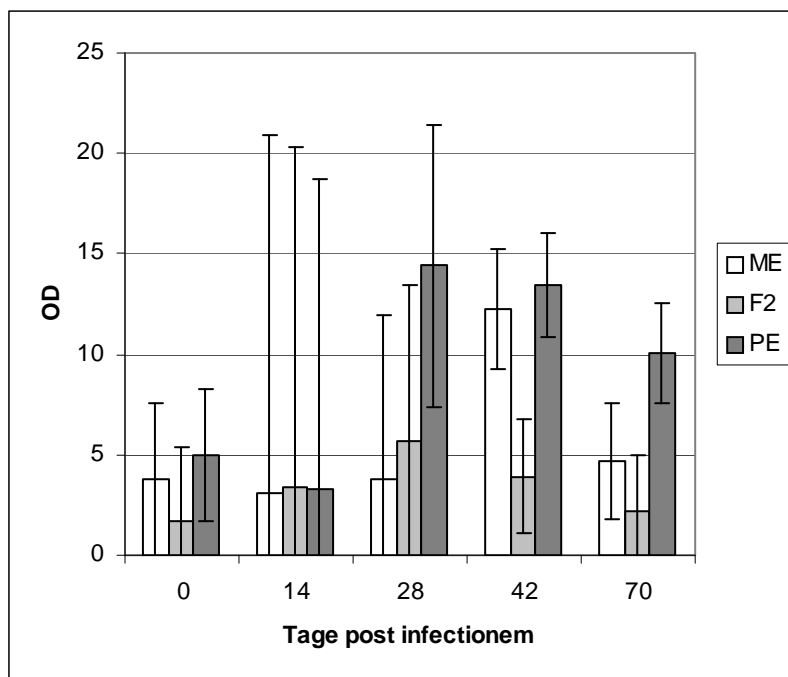
**Abbildung 57:** Darstellung der durch MOCK induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 58:** Darstellung der durch MOCK induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

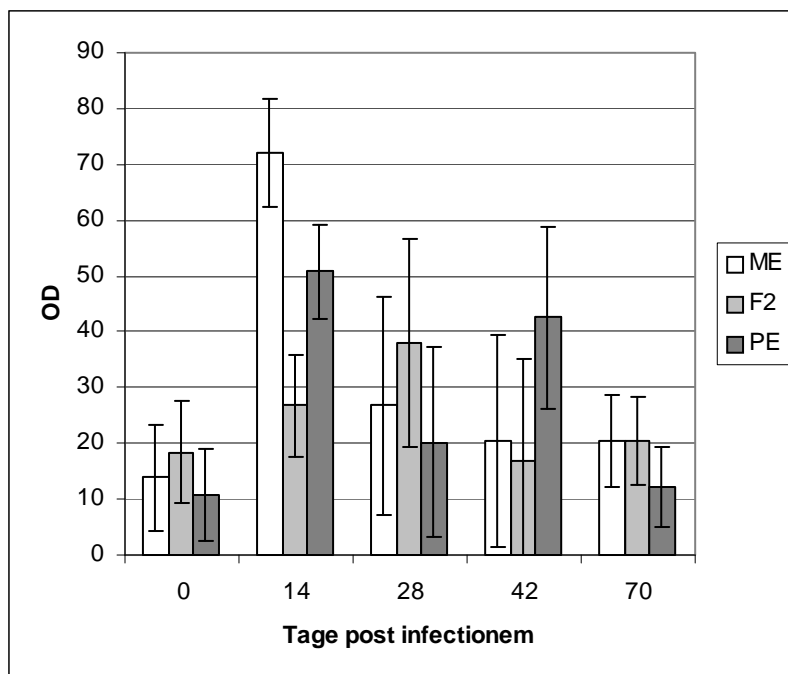


**Abbildung 59:** Darstellung der durch RPMi+ induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

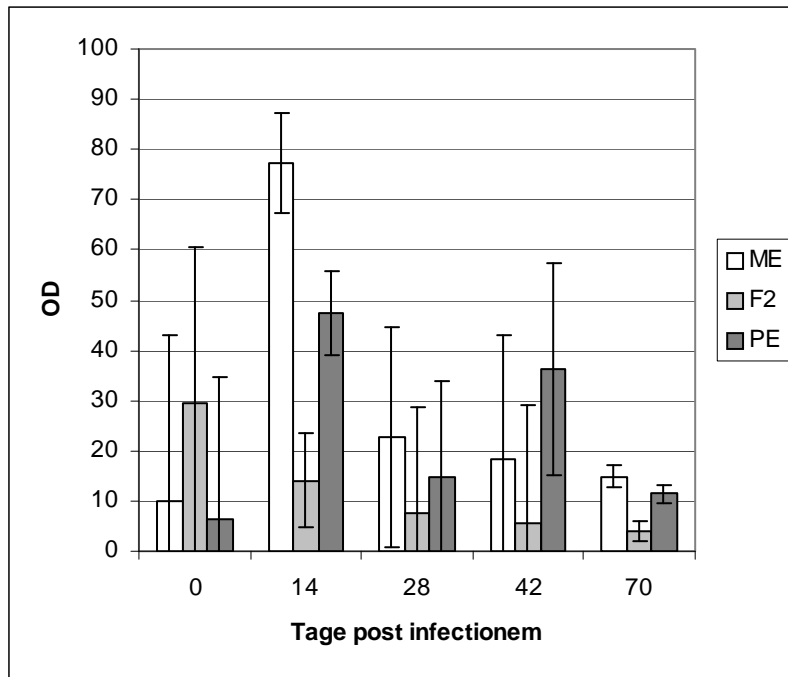


**Abbildung 60:** Darstellung der durch RPMI+ induzierten IL-2-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

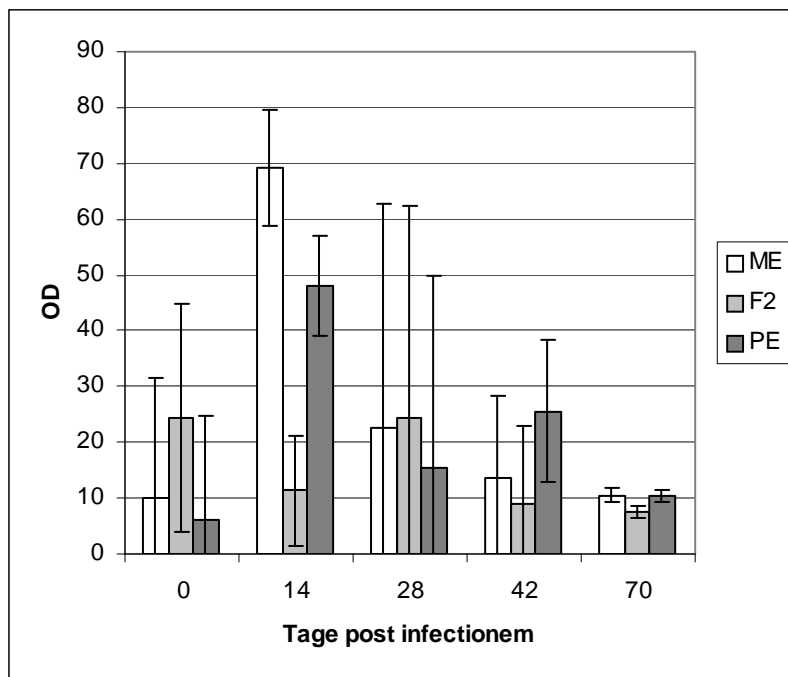
### 8.1.6 Graphische Darstellung der Freisetzung von IL-4



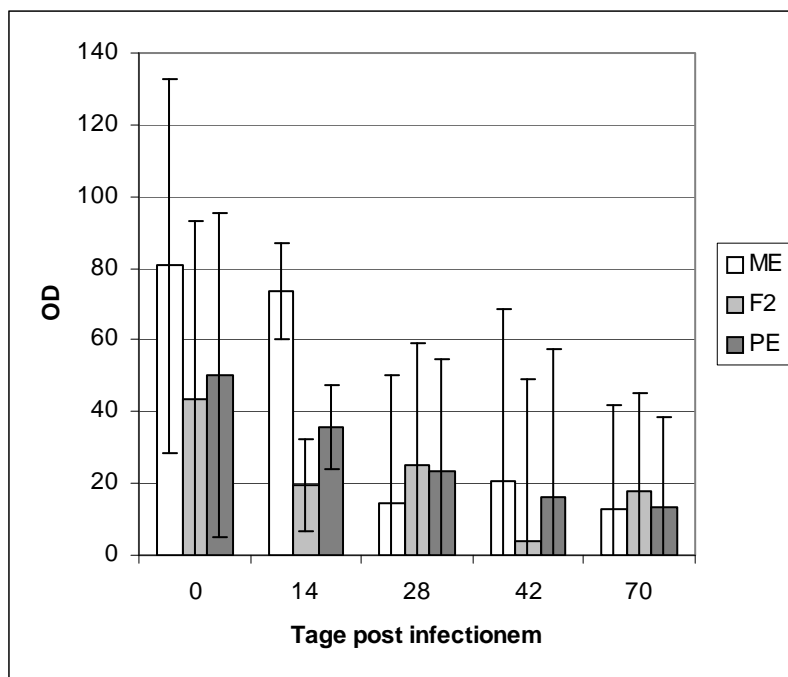
**Abbildung 61:** Darstellung der durch Con A induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



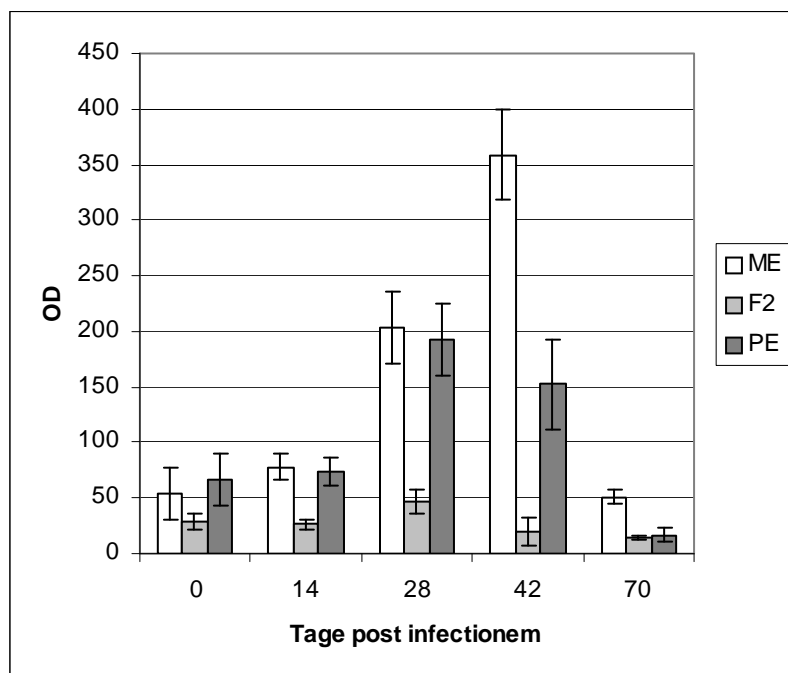
**Abbildung 62:** Darstellung der durch LPS induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



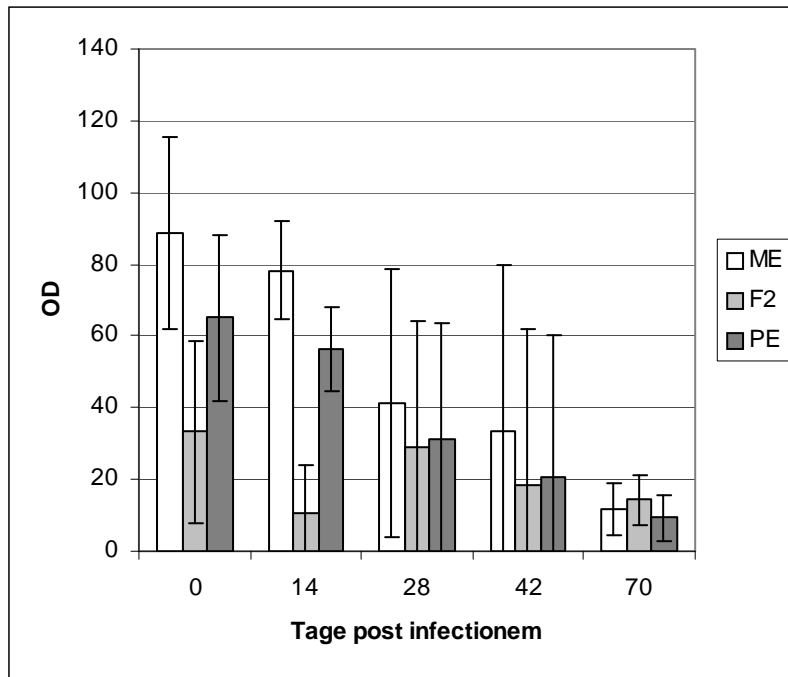
**Abbildung 63:** Darstellung der durch *S. miescheriana*-Antigen induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



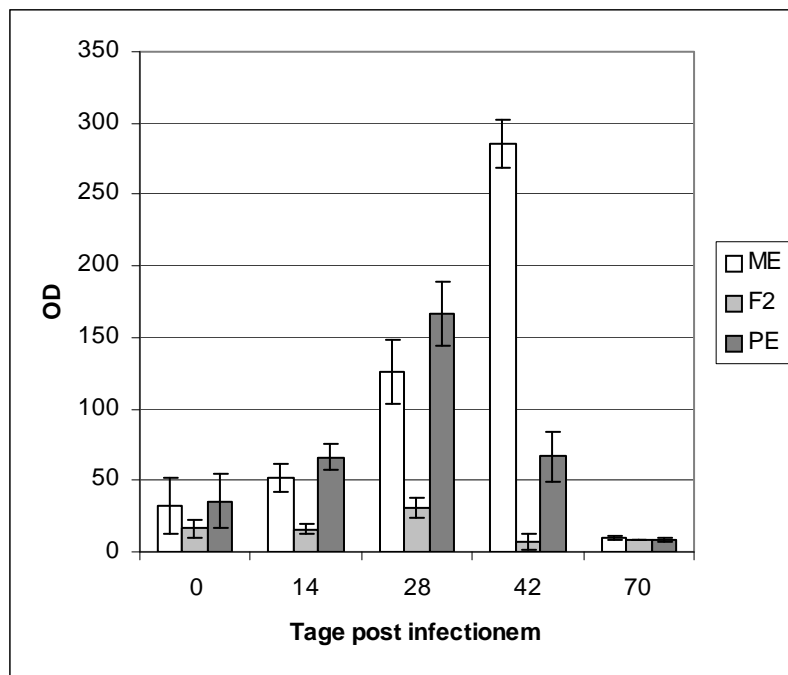
**Abbildung 64:** Darstellung der durch *S. singaporensis*-Antigenen induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



**Abbildung 65:** Darstellung der durch MOCK induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 66:** Darstellung der durch MOCK induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



**Abbildung 67:** Darstellung der durch RPMI+ induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

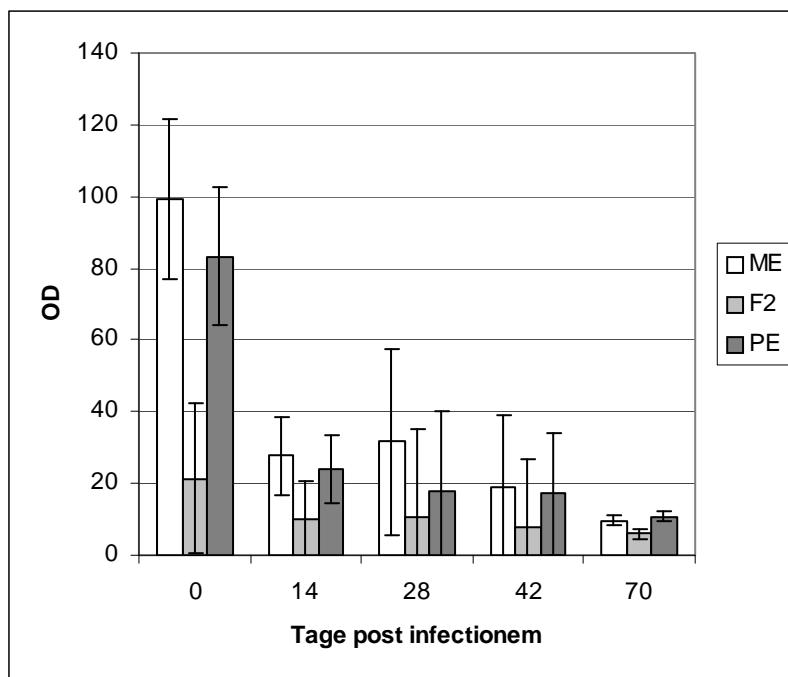


Abbildung 68: Darstellung der durch RPMI+ induzierten IL-4-Freisetzung bei PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

### 8.1.7 Graphische Darstellung der Freisetzung von IFN- $\gamma$

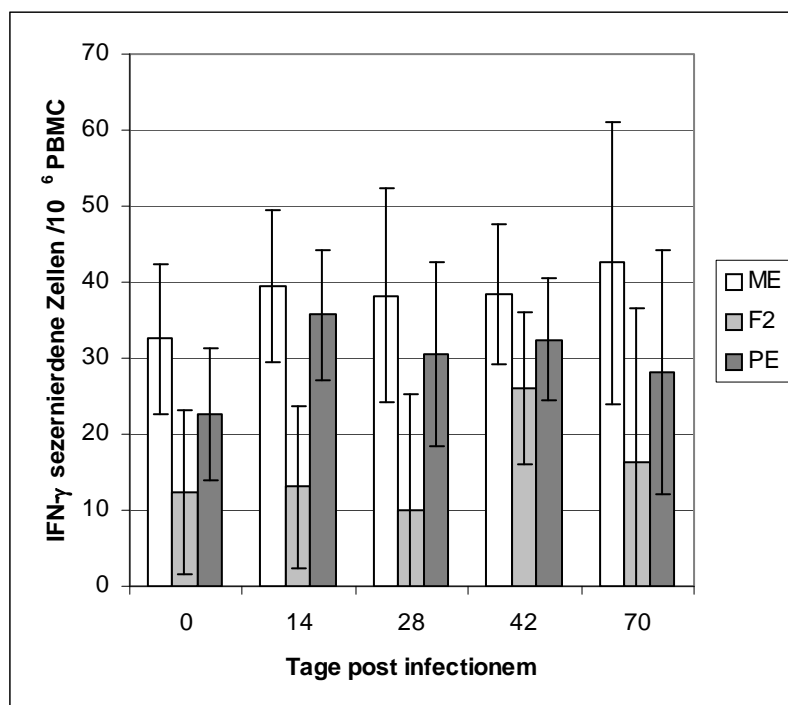


Abbildung 69: Darstellung der durch Con A zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen



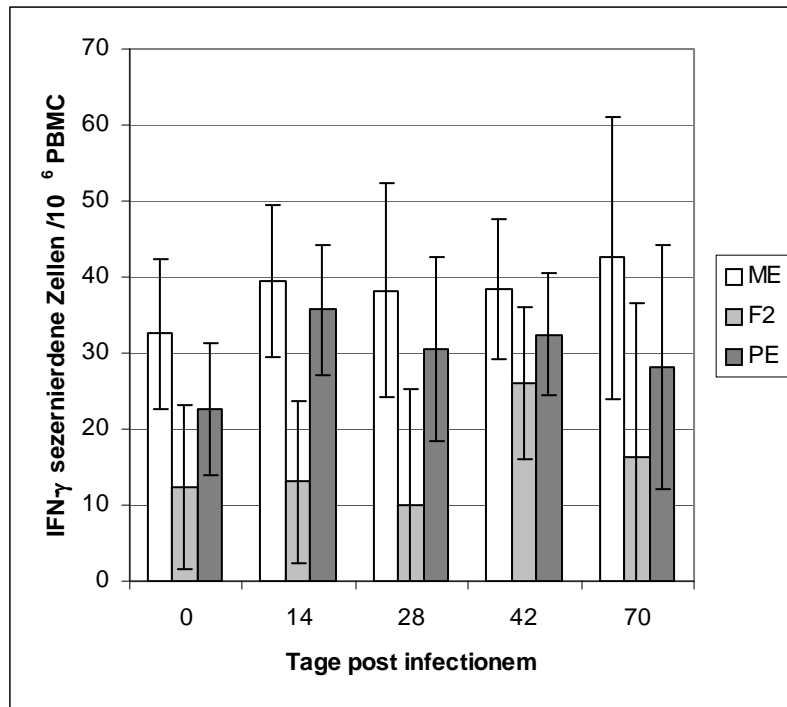


Abbildung 70: Darstellung der durch LPS zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

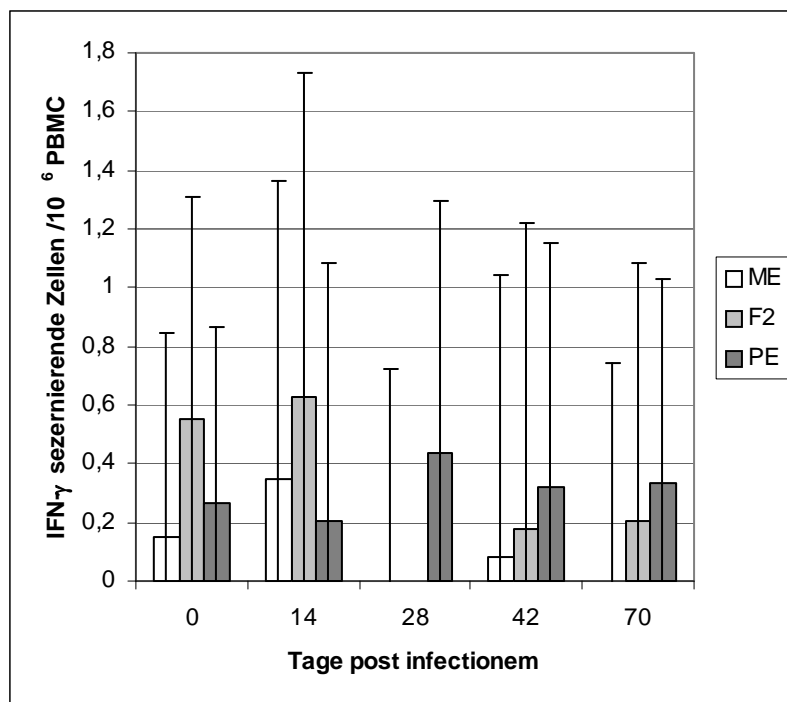


Abbildung 71: Darstellung der durch LPS zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

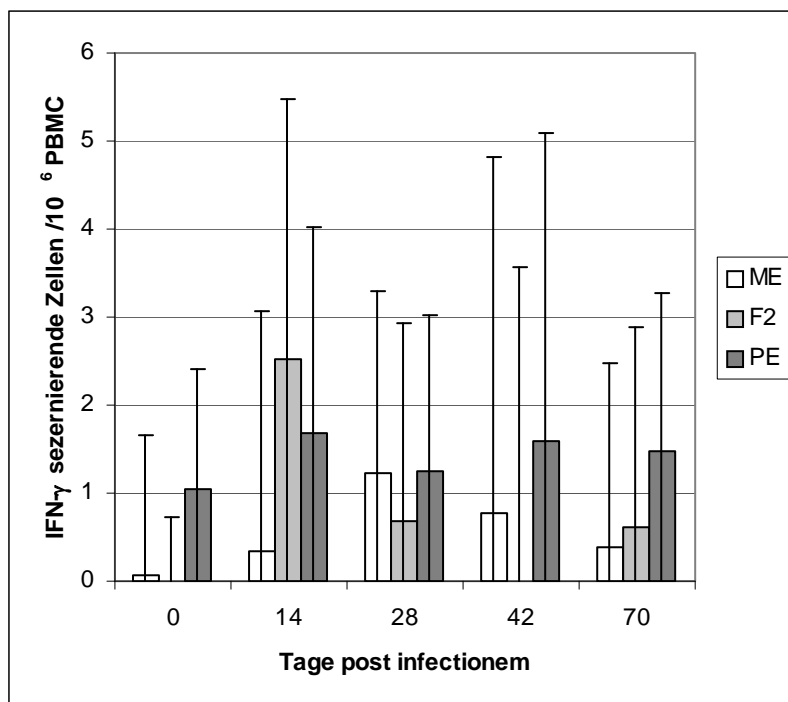


Abbildung 72: Darstellung der durch *S. miescheriana*-Antigenen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrianc-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

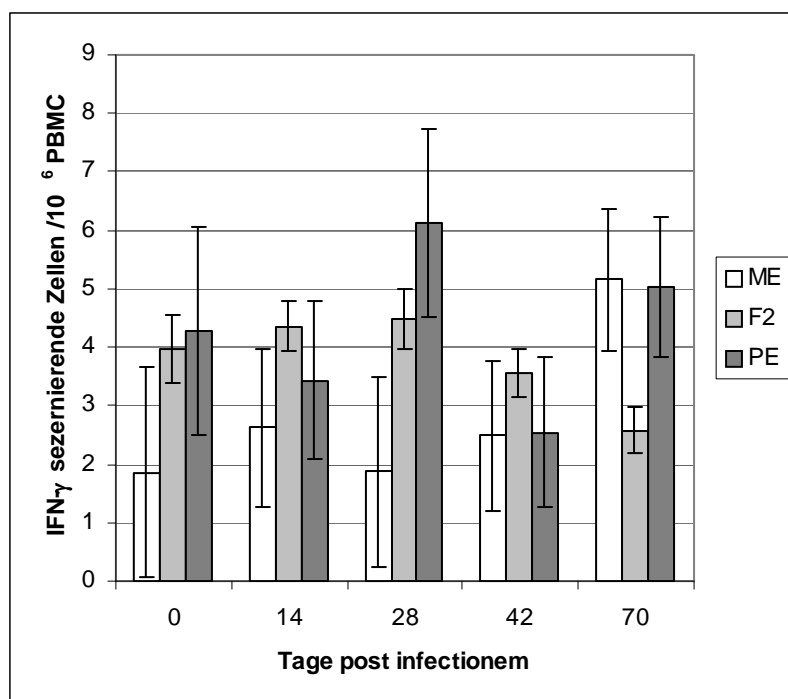


Abbildung 73: Darstellung der durch *S. singaporensis*-Antigenen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von Pietrianc-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

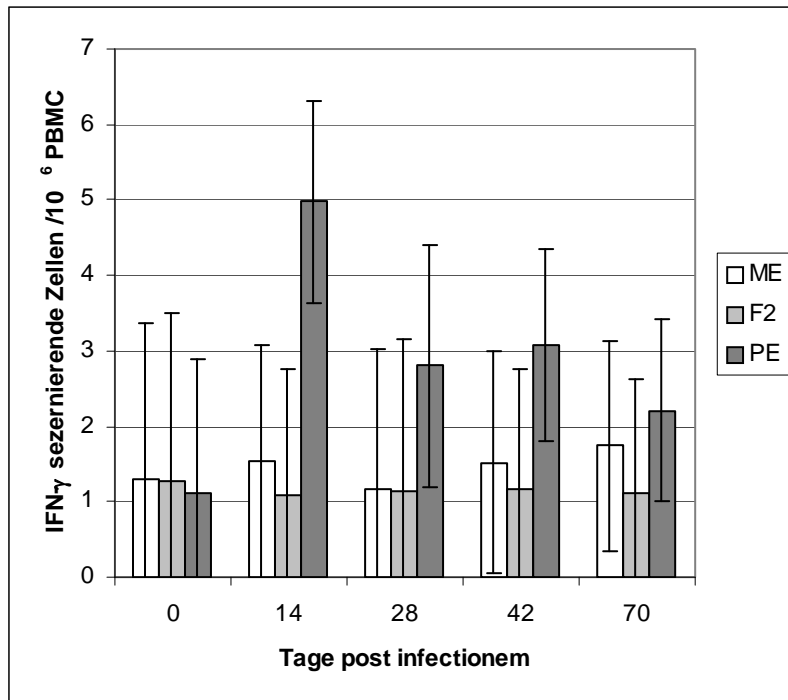


Abbildung 74: Darstellung der durch *S. singaporensis*-Antigenen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

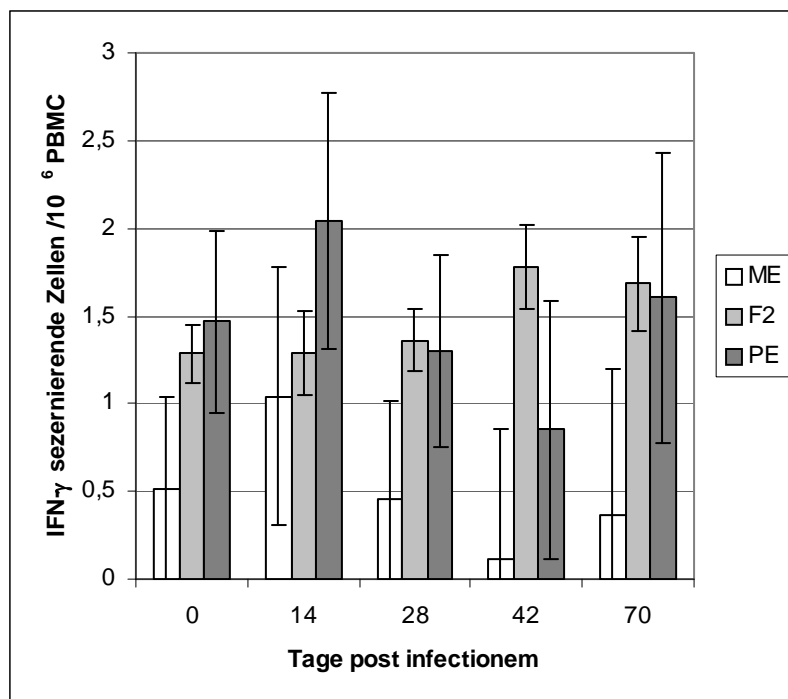


Abbildung 75: Darstellung der durch MOCK zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*

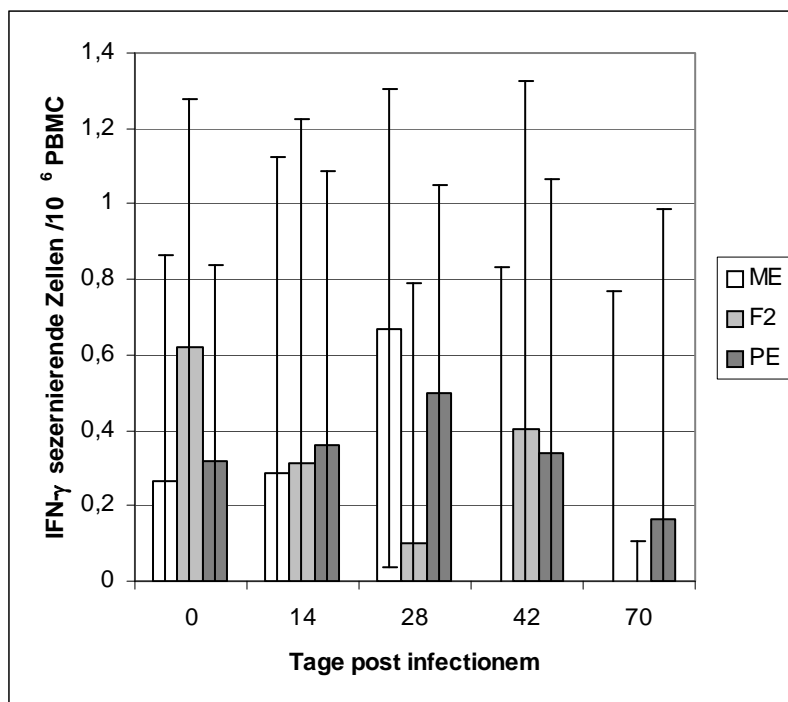


Abbildung 76: Darstellung der durch MOCK zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

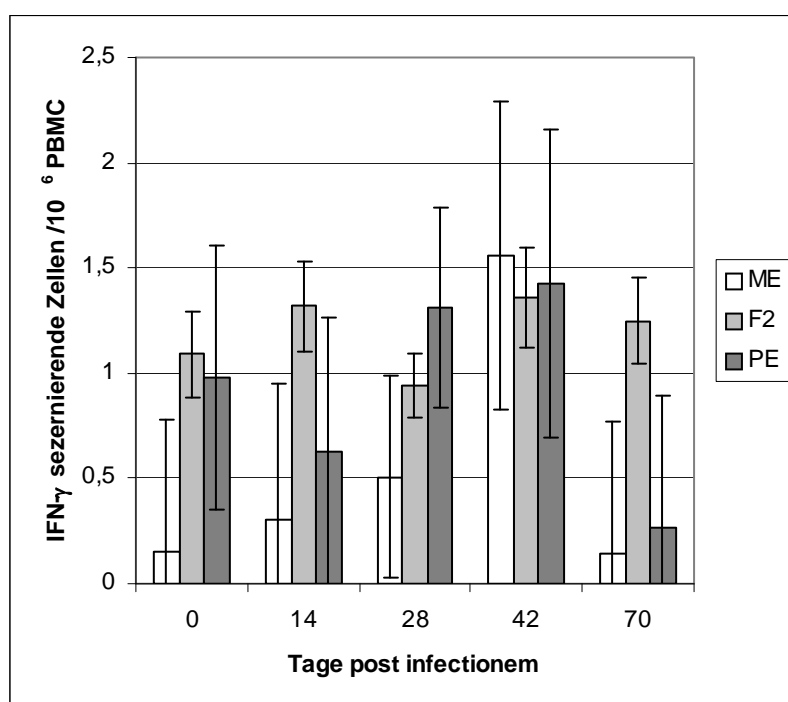
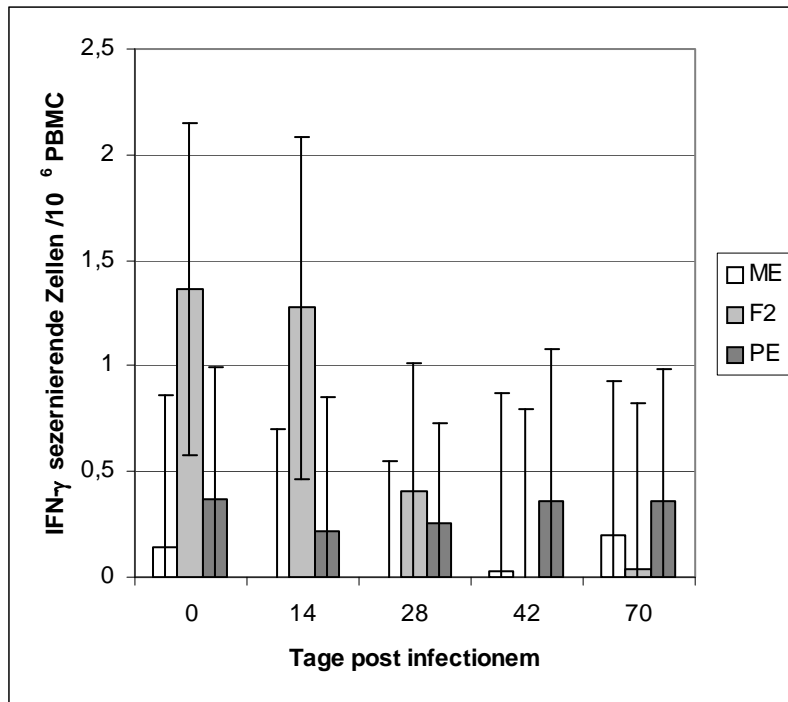


Abbildung 77: Darstellung der durch RPMI+ zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen im Verlauf einer Infektion mit *S. miescheriana*



**Abbildung 78:** Darstellung der durch RPMI+ zur Freisetzung von IFN- $\gamma$ -angeregten PBL von nicht infizierten Pietrian-, Meishan- und Kreuzungsschweinen

## 8.2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A. dest.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungseinheit (Cluster of differentiation)
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
CPM	Radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTL	Zytolytische T-Zellen (cytolytic T lymphocytes)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F2	Tiere der F2-Kreuzungsgeneration
Fa.	Firma
FACS	Durchflußzytometer (fluorescence activated cell sorter)
Fc	Nicht Antigen-bindende Region eines Antikörpers (fragment crystallizable)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FKS	Foetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Gramm
h	Stunde
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JLU	Justus-Liebig-Universität
Kap.	Kapitel
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
M.l.d.	<i>Musculus longissimus dorsi</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
ME	Chinesisches ME
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histokompatibility complex)
min	Minute
NK	Zellen mit natürlicher Killeraktivität (natural killer cells)
OD	Optische Dichte
OPD	Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid)
p. i.	post infectionem

PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Europäisches PE
PE	Phyoerythrin
QTL	quantitative trait loci
RI	Rauminhalt
rpm	Umdrehung pro Minute (round per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Sarcocystis
slg	Oberflächenimmunglobulin (surface Ig)
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
SWC	swine workshop cluster
Tab.	Tabelle
TcR	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zellen
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche

## 9 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Jülich, den 18.05.2008

*Stephanie Stankewitz*



## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zahner und Herrn Prof. Dr. G. Reiner für die Überlassung des Themas, das Bereitstellen eines Arbeitsplatzes, die vielen wertvollen Diskussionen, die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die schnelle und konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Dausgschiess, Institut für Parasitologie, Universität Leipzig, für die Bereitstellung der *Sarcocystis miescheriana* –Sporozysten.

Dem Institut für Tierzüchtung und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, danke ich für die Bereitstellung der Versuchstiere.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. K. Failing von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung der JLU Giessen für seine Arbeit bei der statistischen Datenauswertung bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. A. Saalmüller vom Institut für klinische Immunologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien und seine Mitarbeiter Annette und Christian Marquardt für die zur Verfügungstellung von Material sowie ihre unermüdliche Geduld bei jeglichen Fragen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Frau Julita Jaworski, Frau Christine Henrich, Frau Martina Hansen, Frau Brigitte Hofmann und Frau Christina Scheld für die stets gewährte Unterstützung in allen labortechnischen Fragen und die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Dr. Tamara Bleier, Institut für Veterinärpathologie, danke ich für die Durchführung der pathologisch-anatomischen und –histologischen Untersuchungen.

Ein herzlicher Dank geht an die Tierpfleger der Klinik für Wiederkäuer und Schweine und des Instituts für Parasitologie ohne die ein solches Projekt nicht durchführbar gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein Dank Sabine Hepp und Kathrin Hübner für die stets gute und humorvolle Zusammenarbeit.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Viktor Dyachenko, Nikola Pantchev, Anke Sühwold, Frauke Erhorn und Miriam Lang für ihre kollegiale Hilfe und die vielen miteinander verbrachten weintrunkenden Abende jenseits des Labors.

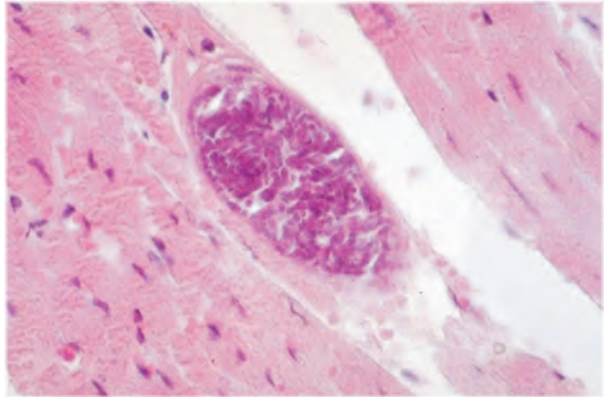
Vielen Dank möchte ich auch Herrn Dr. Carlos Hermosilla und Frau Dr. Anja Taubert sagen, für ihre stets vorhandene Ansprechbarkeit bei Problemen und Fragen.

Ganz besonders liebevoll bedanken möchte ich bei meinen Eltern für Ihre immer gewährte moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Meinrad Ochtrup für seine Unterstützung in allen Lebenslagen während dieser Arbeit.

Danke auch an Torsten Sons für seine menschliche Unterstützung und so manchen motivierenden Tritt sowie die jederzeit gewährte Hilfe bei Computerproblemen aller Art.

Danke auch an Paula, dank der ich außerhalb der Laborwände regelmäßig frische Luft schnappen konnte.



In der vorliegenden Studie sollen die Resistenzunterschiede zwischen zwei Schweinerassen sowie der hieraus gewonnenen F2-Generation gegenüber *S. miescheriana*, als Hinweis auf eine differierende genetische Ausstattung zur Erregerabwehr erfasst werden. Hierzu wurde die Variabilität der klinischen und immunologischen Merkmalsäußerungen auf eine experimentelle Infektion untersucht.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5331-1



9 1783835 1953314