

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mögliche Aufnahme von in Darmschlingen applizierten Actinobacillus-Bakterien Serotyp 9 über das follikelassoziierte Epithel (FAE) der Schleimhautlymphfollikel im Darm von Schweinen zu untersuchen.

Die Versuche wurden an sieben Schweinen durchgeführt, denen bereits drei Wochen zuvor per Aerosol unterschiedliche Mengen App verabreicht worden waren (Gruppe I) und an vier Schweinen, die vor der Exposition keinen Kontakt mit dem Erreger hatten (Gruppe II). Zur Darstellung der Aufnahme von Actinobacillus pleuropneumoniae (App) wurden diesen Tieren in Narkose Darmschlingen im Bereich einer Peyerschen Platte des Jejunums, im terminalen Ileum, am Ileozäkaleingang, in der Ansa centralis und im Rektum abgebunden und mit 5-10 ml App Serotyp 9-Suspension ($5 \cdot 10^9$ lebende Bakterien/ml) gefüllt. Zur Kontrolle wurden im Jejunum, Ileum und in der Ansa centralis in gleicher Weise Schlingen angelegt. In diese wurde Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS; 0,1 M, pH 7,2) injiziert. Nach einer zwei-stündigen Expositionszeit wurden die intraluminal mit 3,5% igem neutral gepufferten Formalin bzw. 2,5% igem Glutaraldehyd fixierten Schlingen entnommen. Die Proben für die Anfertigung von Gefrierschnitten wurden nach der Entnahme in gekühltem Isopentan schockgefroren.

In Gefrier- und Paraplastschnitten waren App immunhistochemisch mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen App Serotyp 9 in der indirekten Immunperoxidase-Reaktion als bräunliche kokkobazilläre Stäbchen darstellbar. Erreger wurden bei allen 11 Tieren im Schleim des Dünndarms zahlreich und im Schleim des Dickdarms vereinzelt beobachtet. Es war kein Unterschied der Präsenz des Erregers im Schleim zwischen Tieren der Gruppe I und der Gruppe II nachweisbar. Im Dünndarm lagen die Bakterien vorwiegend auf den Zottenspitzen und in den Zottenzwischenräumen. Auf den Domes waren vergleichsweise wenig App zu beobachten. Die Bakterien

konnten weder in M-Zellen, Enterozyten, Becherzellen noch in den Interzellularspalten des Zottenepithels und des FAE nachgewiesen werden.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten zahlreiche App-ähnliche Bakterien im Schleim des Dünn- und Dickdarmlumens. Diese waren im Dünndarm zahlreicher als im Dickdarm zu beobachten. Im Ileozäkaleingang wurden einzelne, App-ähnliche Bakterien und Bakterien anderer Spezies zwischen nekrotischen Zellen und unter der Basalmembran nachgewiesen. Mit der Immunogoldmarkierung einschließlich Silberverstärkungsreaktion ließ sich immunelektronenmikroskopisch bestätigen, daß es sich bei den meisten Bakterien im Dünndarm, jedoch nur bei einzelnen Bakterien im Dickdarm um App handelte. Auch immunelektronenmikroskopisch waren weder in M-Zellen, enteroabsorbierenden Zellen noch in den Interzellularspalten App nachzuweisen.

Rasterelektronenmikroskopisch waren in den mit App inokulierten Schlingen im Vergleich zu den Kontrollschlingen massive Schleimablagerungen auf den Zottenspitzen vorhanden. Der Schleim enthielt kokkobazilläre Stäbchen mit einer Struktur von App. Auf der Schleimhautoberfläche der Kontrollschlingen konnten Schleimspuren nur tief in den Zottenzwischenräumen beobachtet werden, die bei stärkeren Vergößerungen keine App-ähnlichen Bakterien enthielten.

In der durchgeführten Untersuchung war eine Aufnahme von App weder über das Epithel noch über das FAE im Dünn- und Dickdarm nachweisbar. Es ist einerseits möglich, daß die Bakterien im Schleim abgefangen werden und dadurch das Zotten- und Domeepithel nicht erreichen konnten; andererseits besteht die Möglichkeit, daß nur Bakterienbestandteile oder bakterielle Toxine, die mit den verwendeten polyklonalen Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen von App nicht darstellbar sind, aufgenommen werden.

Lüning, Susanne:

Investigation of *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* serotype 9 uptake through the follicle-associated epithelium in the small and large intestine of pigs.

7. SUMMARY

The objective of this investigation was to examine the uptake of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) through follicle-associated epithelium (FAE) in the small and large intestine of pigs.

Seven pigs which had previously received various amounts of App serotype 9 by aerosol (group I) and four pigs which had not been exposed to App (group II) were used. To demonstrate the uptake of App animals were anesthetized, intestinal loops were ligated in the jejunum containing a Peyer's patch, in the terminal ileum, at the ileocecal entrance, at the ansa centralis and in the rectum and filled with 5-10 ml bacterial suspension ($5 \cdot 10^9$ viable App serotyp 9/ml). Control-loops in the jejunum, ileum and in the central flexure were injected with 0,1 M phosphate buffered saline (PBS). After approximately two hours of exposure intestinal loops were frozen in chilled isopentan or intraluminally fixed with 3,5% neutral buffered formalin or 2,5% glutaraldehyd.

App were demonstrated as brown coccobacillary rods with polyclonal rabbit antiserum against App serotyp 9 by indirect immunoperoxidase method in frozen and paraplast sections. In all 11 pigs numerous App were observed in the small intestinal and few in the large intestinal mucus. No differences were seen between animals of group I and II. In the small intestine bacteria were found predominantly at the villous tips and between the villi. Comparatively few App were present at the surface of the domes. No App were demonstrated in M cells, entroabsorptive cells, goblet cells or intercellular spaces of the villous epithelium and FAE.

By transmission electron microscopy many bacteria resembling App were observed in the mucus within the small and large intestinal lumen. They were more numerous in the small intestine compared to the large intestine. At the ileocecal entrance App-like and other bacteria were present between necrotic enterocytes and underneath the basal membrane. By immune electron microscopy most bacteria in small intestine and few in the large intestine were conformed to be App using immunogold-labelling and silver enhancement. App was not demonstrated in M cells, enteroabsorptive cells or intercellular spaces.

In scanning electron microscopic examination vast amounts of mucus containing coccobacillary rods resembling App were present on the surface of loops inoculated with App. In contrast only traces of mucus without App-like structures were seen between the villi of loops filled with PBS.

In this investigations uptake of App could be demonstrated neither through epithelium nor FAE in the small and large intestine of pigs. It might be possible that App was captured in the mucus and did not reach the villous and dome epithelium. On the other hand it cannot be excluded that bacterial subunits or toxins wich do not react with the polyclonal antibody used are absorbed or transported across the intestinal barrier.