

6. Zusammenfassung

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A pp*), der Erreger der kontagiosen Pleuropneumonie des Schweines, verursacht sowohl perakute und akute als auch chronische Infektionen der Lunge bei denen das Schwein zum Träger und Verbreiter des persistierenden Erregers wird. Obwohl Vakzination und überstandene Infektion zu humoraler Immunität und zum Schutz vor klinischer Erkrankung bei Infektion mit einem homologen Serotyp führen, bleibt *A pp* weiter im Wirtsorganismus nachweisbar. In dieser Arbeit wurden drei Infektionsstudien durchgeführt die den klinischen und mikrobiologischen Verlauf der *A pp*-Infektion verfolgten. Die zu mehreren Infektionszeitpunkten gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit diente als Medium, den Erreger zu den verschiedenen Infektionsstadien im Wirtsorganismus *in vivo* untersuchen zu können.

Die chronisch erkrankten Tiere zeigten im Western Blot eine deutliche Immunantwort gegen drei rekombinante Antigene von *A pp*, darunter das TfbA-Protein, das *in vitro* nur unter Eisenmangelbedingungen exprimiert wird und an der bakteriellen Aufnahme von Eisen aus Transferrin essentiell beteiligt ist. Obwohl also Antikörper gegen das TfbA-Protein von *A pp* gebildet werden, wird die Persistenz des Erregers nicht verhindert. Diese widersprüchlichen Beobachtungen ließen die zwei Hypothesen zu, nämlich daß *A pp* in einer intrazellulären Lokalisation persistiert oder daß die Expression des TfbA-Proteins im Verlauf der Infektion herabreguliert wird.

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie und dem Killing-assay konnte die erste Hypothese widerlegt werden, da *A pp* zu keinem Zeitpunkt intrazellulär in Makrophagen detektiert werden konnte. Die zweite Hypothese einer phänotypischen Variation der Antigenexpression konnte dagegen mit der Doppelimmunfluoreszenz und einer Kombination von Western Blot und Southern Hybridisierung bestätigt werden. Während in den ersten Stunden der akuten Infektion der Anteil der immunfluoreszenzmikroskopisch ermittelten TfbA-positiven Bakterien zwischen 87 und 100% lag, lagen die Mittelwerte der TfbA-positiven Bakterien zu späteren Infektionsstadien deutlich niedriger. Am 7. Tag konnten 61%, am 14. Tag 35% und am 21. Tag 21,7% TfbA-positiv Bakterien nachgewiesen werden. Eine vergleichbare abnehmende Tendenz zeigten die Ergebnisse von Western Blot und Southern Hybridisierung mit 47% TfbA-positiven Bakterien am 7. Tag, 29% am 14. und 26% am 21. Tag.

So konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine Verlaufsuntersuchung der bakteriellen Antigenexpression *in vivo* von der akuten bis zur chronischen Phase der Infektion durchgeführt und die Zuordnung eines bakteriellen Expressionsstadiums zu einem Infektionsstadium des Wirtes ermöglicht werden. Die ermittelte deutliche Abnahme der Expression eines Eisen-regulierten Proteins (TfbA) mit Einsetzen der humoralen Immunantwort wird hier erstmals beschrieben.

Summary

Investigation of the bacteria-host-interaction in pigs during the course of infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Isabel Hennig

Actinobacillus pleuropneumoniae (*A. pp.*) causes peracute, acute and chronic forms of the contagious porcine pleuropneumonia. Convalescent pigs become carriers for the persisting pathogen and are responsible for the dissemination of disease. Although vaccination and natural infection are leading to humoral immunity and protection against homologous serotypes, *A. pp.* can be isolated from the host for a prolonged period of time. In this work we performed three infection studies following the clinical and microbiological course of disease. Bronchoalveolar lavage fluid, obtained at different times during infection, served as the source for inspecting the pathogen at the different stages of infection *in vivo*.

The chronically infected pigs showed a clear immune response against three different antigens of *A. pp.* One antigen was the TfbA-protein, which *in vitro* is expressed only under iron-deficient growth conditions and is involved in the bacterial iron-uptake-mechanism using transferrin as sole source of iron. In spite of a high antibody-level against the TfbA-protein during the experimental infection the persistence of *A. pp.* could not be avoided. These contradictory observations led to two hypotheses: *A. pp.* could be persisting in an intracellular localization or the expression of TfbA-protein could be downregulated during the course of infection. The first hypothesis was disproved by using immunofluorescence microscopy and a killing-assay, thus at no time *A. pp.* was detectable intracellularly within macrophages.

The second hypothesis on phenotypic variation of antigenic expression, however was supported by using a double-immunofluorescence-technique as well as a combination of Western Blot and Southern Hybridisation. The percentage of TfbA-positive bacteria in immunofluorescence during the first hours of acute infection was between 87 and 100%. The arithmetic mean of TfbA-positive bacteria decreased at later stages of infection. At day 7 61% at day 14 35% and at day 21 21,7% TfbA-positive bacteria were detectable. The results of Western Blot and Southern Hybridisation showed a similar tendency with 47% TfbA-positive bacteria at day 7, 29% at day 14 and 26% at day 21.

Thus, in this study the course of bacterial antigen-expression was followed *in vivo* from the acute to the chronic stage of infection. The clear decrease of expression of a bacterial iron-regulated protein (TfbA) which occurred simultaneously with the onset of the humoral immune response was reported here for the first time.