

Aus dem Institut für Mikrobiologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Oberflächen-assoziierte und sezernierte Faktoren
von *Streptococcus suis* in der
Epidemiologie, Pathogenese und Impfstoffentwicklung**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der *Venia legendi*
an der Tierärztlichen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Dr. med. vet. Christoph Georg Baums, Dipl. Biol.,
Hannover 2009

Tag der nichtöffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 29. Januar 2010

*Für Cordula,
Theresa und Theodor*

Vorwort

In der modernen Schweinehaltung spielen Faktorenerkrankungen eine herausragende Rolle. Sie verursachen die Mehrzahl der Verluste in der Ferkelaufzucht. Die Erreger dieser Faktorenerkrankungen sind häufig weit verbreitet. Klinisch unauffällige Trägartiere tragen zur Problematik wesentlich bei, da über sie trotz umfangreicher Hygiene- und Vorsichtsmaßnahmen, beispielsweise Quarantäne, virulente Stämme in noch nicht infizierte Bestände bzw. Stallabteilungen eingeschleppt werden. Bekämpfungen von Faktorenerkrankungen erfordern eine Reihe unterschiedlicher Maßnahmen, wie die Verbesserung der Haltungsbedingungen aber auch eine gezielte Immunprophylaxe. Der Erfolg dieser Maßnahmen lässt sich aber bei einigen Erregern im Vorfeld nur sehr schwer abschätzen. Zu diesen problematischen Erregern zählt *Streptococcus (S.) suis*, der weltweit wichtigste bakterielle Meningitiserreger des Schweins.

In der tierärztlichen Praxis gibt es einen großen Bedarf an einem serotypübergreifenden *S.-suis*-Impfstoff, der erfolgreich in allen Altersklassen eingesetzt werden kann. Viele Eigenschaften des Erregers, wie die große Diversität und die Expression einer Polysaccharidkapsel, erschweren die Entwicklung eines solchen Impfstoffs (Baums und Valentin-Weigand 2009). In dieser Arbeit sollten daher vor allem die Voraussetzungen für die Entwicklung eines serotypübergreifenden Impfstoffs verbessert werden. Zu diesen Voraussetzungen zählen beispielsweise die Differenzierung und Charakterisierung invasiver Pathotypen, die Etablierung geeigneter Tiermodelle, die Identifikation von Virulenzfaktoren und die Evaluierung von Analyse-Parametern in Immunisierungsversuchen. Nach der Einschätzung des Autors wird sich nur durch eine kritische und zielorientierte Grundlagenforschung die unbefriedigende Situation der *S.-suis*-Immunprophylaxe verbessern lassen. In einer kritischen Auseinandersetzung mit der *S.-suis*-Literatur wird deutlich, dass von den einzelnen Gruppen zum Teil sehr unterschiedliche Bedingungen in den Belastungsversuchen gewählt werden. Außerdem unterscheiden sich auch die Analyse-Parameter wesentlich. In dieser Arbeit wurde der experimentellen Konzeption und den Analyse-Parametern besondere Aufmerksamkeit geschenkt, um letzten Endes im Labor dem landwirtschaftlichen Nutztier Schwein gerecht zu werden.

Die Ergebnisse gliedern sich in drei Abschnitte. Der erste, epidemiologische Teil der Arbeit beinhaltet die Identifikation und Charakterisierung von Pathotypen auf der

Grundlage von Genotypisierungen von *S.-suis*-Isolaten (Baums *et al.* 2007; Rehm *et al.* 2007; Silva *et al.* 2006). Der zweite Abschnitt umfasst Arbeiten zur Pathogenese des Erregers, insbesondere die Identifikation eines Virulenzfaktors (Baums *et al.* 2006) und die Etablierung von Infektionsmodellen (Beineke *et al.* 2008). Im letzten Teil werden die Ergebnisse zu drei Immunisierungsstrategien in Bezug auf ihre homologe und heterologe Schutzwirkung vorgestellt, eine Ganzzell- und Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen (Baums *et al.* 2009) sowie eine Lebendvakzine auf der Grundlage einer isogenen attenuierten Mutante (Kock *et al.* 2009).

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Publikationen	9
A Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund	11
B Konzeption und Fragestellung	15
C Ergebnisse	17
C.1 Untersuchungen zur Epidemiologie von <i>Streptococcus suis</i> unter besonderer Berücksichtigung Virulenz-assoziiertes Faktoren.....	17
C.2 Untersuchungen zur Pathogenese von <i>Streptococcus suis</i>	21
C.3 Untersuchungen zur Immunprophylaxe von <i>Streptococcus suis</i>	24
D Übergreifende Diskussion	28
E Zusammenfassung.....	37
F Summary	40
G Literaturverzeichnis	43
H Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen	51

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFLP	engl.: <i>amplified fragment length polymorphism</i>
CDC	engl.: <i>cholesterol-dependent cytotoxin</i>
CERM	Cholesterylester-reiche Mikroemulsion
CWS	engl.: <i>cell wall sorting signal</i>
EF	engl.: <i>extracellular factor</i>
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FBPS	engl.: <i>fibronectin- and fibrinogen-binding protein of S. suis</i>
FnBA	engl.: <i>fibronectin-binding protein A (S. dysgalactiae)</i>
HDL	engl.: <i>high-density lipoproteins</i>
Ig	Immunglobulin
MLST	engl.: <i>multilocus sequence typing</i>
MOI	engl.: <i>multiplicity of infection</i>
MRP	engl.: <i>muramidase-released protein</i>
MSCRAMMs	engl.: <i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NETs	engl.: <i>neutrophil extracellular traps</i>
OFS	engl.: <i>opacity factor of S. suis</i>
S.	<i>Streptococcus</i>
s.	siehe
SAO	engl.: <i>surface antigen one</i>
SFB	Sonderforschungsbereich
SOF	engl.: <i>serum opacity factor (S. pyogenes)</i>
ST	Sequenztyp
STSS	engl.: <i>streptococcal toxic shock-like syndrome</i>
TiHo	Tierärztliche Hochschule Hannover

Liste der verwendeten Publikationen

- Silva L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115: 117-127.
- Baums C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect .Immun.* 74: 6154-6162.
- Baums, C. G., G. J. Verkühlen, T. Rehm, L. M. Silva, M. Beyerbach, K. Pohlmeier und P. Valentin-Weigand (2007): Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 711-717.
- Rehm, T., C. G. Baums, B. Strommenger, M. Beyerbach, P. Valentin-Weigand und R. Goethe (2007): Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Med. Microbiol.* 56: 102-109.
- Neis, C., J. Rohde, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2007): Untersuchungen einer möglichen *Streptococcus suis*-Infektionskette in einer Schweineerzeugergemeinschaft mittels PCR-gestützter Genotypisierung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120: 202-206
- Beineke A., K. Bennecke, C. Neis, C. Schröder, K.-H. Waldmann, W. Baumgärtner, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2008): Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet. Microbiol.* 128: 423-430.

Baums, C. G., C. Kock, A. Beineke, K. Bennecke, R. Goethe, C. Schröder, K.-H. Waldmann und P. Valentin-Weigand (2009): *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine induced immunogenicities and their protective efficacy against serotypes 2 and 9. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 200-208.

Kock, C., A. Beineke, M. Seitz, M. Ganter, K.-H. Waldmann, P. Valentin-Weigand, C. G. Baums (2009): Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic *ofs* mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132-145.

Baums, C. G. und P. Valentin-Weigand (2009): Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Animal Health Research Review* 10: 65-83.

Die Erklärung über den eigenen Anteil steht auf den Seiten 51 bis 53.

A Einleitung und wissenschaftlicher Hintergrund

Baums, C. G. und P. Valentin-Weigand (2009): Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Animal Health Research Review* 10: 65-83.

Dieser Übersichtsartikel stellt den wissenschaftlichen Hintergrund der Arbeit vor. Im Fokus stehen verschiedene Oberflächen-assoziierte und sezernierte Faktoren von *S. suis*. Im Zusammenhang mit den entsprechenden Faktoren enthält er zahlreiche Ausführungen zur Epidemiologie und Pathogenese von *S. suis*. Weiterhin werden die Ergebnisse von Immunisierungsexperimenten mit gereinigten Faktoren von *S. suis* aufgeführt. Die publizierten Ergebnisse dieser Arbeit werden berücksichtigt und im Zusammenhang mit Arbeiten anderer Gruppen dargestellt. Für den experimentellen Teil dieser Arbeit sind die Kapsel, die Oberflächenproteine *muramidase-released protein* (MRP), *surface antigen one* (SAO), *opacity factor of S. suis* (OFS) und das *fibronectin- and fibrinogen-binding protein of S. suis* (FBPS) sowie die sezernierten Proteine Suilysin und *extracellular factor* (EF) von besonderer Bedeutung.

S. suis verursacht beim Schwein eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen wie Meningitis, Septikämie, Arthritis, Serositis und Endocarditis. Er ist weltweit der wichtigste bakterielle Meningitiserreger beim Schwein. Die Erkrankungen können in unterschiedlichen Altersklassen auftreten. Betroffen sind vor allem Saug- und Absatzferkel sowie Läuferschweine. Pathohistologisch lassen sich bei akuten *S.-suis*-Infektionen typischerweise fibrinös-eitrige Läsionen nachweisen. Klinisch unauffällige Trägartiere spielen für die Epidemiologie von *S.-suis*-Erkrankungen eine Schlüsselrolle.

S. suis kann auch beim Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen, vor allem Meningitiden und Septikämien. In Asien zählt *S. suis* zu den wichtigsten Meningitiserregern des erwachsenen Menschen. In China hat es 1998 und 2005 große Ausbrüche von *S.-suis*-Erkrankungen beim Menschen gegeben, bei denen zahlreiche Menschen verstorben sind. Todesursache war in vielen Fällen das *streptococcal toxic shock-like syndrome* (STSS). Mit den beiden Ausbrüchen war ein spezifischer *S.-suis*-Sequenztyp (ST 7) assoziiert, der bis heute in Europa nicht aufgetreten ist.

S. suis zeichnet sich durch eine große Diversität aus. 33 verschiedene Serotypen sind bekannt. Der Serotyp 2 besitzt weltweit die größte Bedeutung. Geographische Besonderheiten sind zu berücksichtigen. In Europa spielt im Krankheitsgeschehen der Schweine neben dem Serotyp 2 auch der Serotyp 9 eine wichtige Rolle. In Großbritannien verursachen häufig Serotyp 1 und 14 Stämme bei Saugferkeln Probleme. Bronchopneumonien assoziiert mit Serotyp-7-Stämmen treten in Skandinavien aber auch in Deutschland häufig auf.

Die Serotypisierung von *S. suis* geht auf unterschiedliche Zusammensetzungen der Kapsel zurück. Die Kapsel ist ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. suis*. Sie schützt den Erreger vor der Phagozytose. Isogene kapsellose Mutanten zeigen eine Reihe unterschiedlicher Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp. Hervorzuheben ist dabei neben dem Abtöten durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten auch die erhöhte Adhärenz und Invasion kapselloser Stämme an bzw. in Epithelzellen. Eine plausible Erklärung für diesen Phänotyp ist das Maskieren von Adhäsinen und Invasinen durch die Kapsel. Es liegen für *S. suis* experimentelle Hinweise vor, die für eine Regulation der Kapselexpression sprechen. Demnach könnte eine verminderte Kapselexpression in bestimmten Stadien der Pathogenese eine vermehrte Adhäsion und Invasion einleiten. Die Indizien für die Kapselregulation werden in dem Übersichtsartikel näher erläutert. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde die *S. suis*-Mutagenese nicht nur mit dem Wildtyp Stamm sondern auch mit einer isogenen kapsellosen Mutante ausgeführt. Die Herstellung solcher Doppelmutanten ist die Voraussetzung, um auch die Funktionen von Oberflächenproteinen zu erfassen, die sich nur im unbekapselten Zustand manifestieren. Die Kapsel spielte außerdem eine wichtige Rolle in den Immunisierungsversuchen dieser Arbeit. Unter anderem wurde der Frage nachgegangen, ob opsonisierende Antikörper, die von einer Ganzzellvakzine induziert wurden, gegen die Kapsel gerichtet waren.

MRP, SAO und OFS gehören zu den Oberflächenproteinen mit einem C-terminalen *cell wall sorting signal* (CWS). Das CWS besteht aus einem LPXTG-Motif, einer Folge von hydrophoben Aminosäuren und einem positiv geladenem Ende. Das Enzym Sortase spaltet die Peptidkette der CWS-Proteine hinter dem Threonin des LPXTG-Motifs und verknüpft das Protein anschließend kovalent mit der Zellwand (Transpeptidase). Die Tabelle 1 des Übersichtsartikels gibt eine Übersicht über die bekannten CWS-Proteine von *S. suis*. MRP (bzw. dessen Gen *mrp*) spielt als Virulenzmarker für die epidemiologischen Untersuchungen dieser Arbeit eine

herausragende Rolle. MRP und SAO sind immunogene Oberflächenproteine. Es wurde eine Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen untersucht, die unter anderem die Faktoren MRP, SAO und FBPS enthielt. Aufgrund ihrer immunogenen Wirkung und zum Vergleich mit den Ergebnissen anderer Gruppen wurden die Versuchstiere auf spezifische Antikörpertiter gegen MRP und SAO untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung des Serumtrübungsfaktors OFS. Die Serumtrübungs- und Virulenzfunktion wurden bewiesen. In Folge hat eine japanische Arbeitsgruppe das Vorkommen und die allelische Variation von OFS bei unterschiedlichen *S.-suis*-Stämmen beschrieben. Der Übersichtsartikel fasst die Ergebnisse beider Arbeiten zusammen.

FBPS und die Arginin Deiminase (ArcA) gehören zu den Oberflächen-assoziierten Proteinen, die kein bekanntes CWS besitzen. Einige Stoffwechsellenzyme, die im Zytoplasma wichtige Funktionen im Intermediärstoffwechsel wahrnehmen, sind auch auf der Bakterienoberfläche lokalisiert und dort direkt an Erreger-Wirt-Interaktionen beteiligt. Der Übersichtsartikel stellt die Oberflächenproteine ohne CWS getrennt vor und gibt in Tabelle 2 eine Übersicht über alle bestätigten und postulierten Oberflächenproteine ohne CWS.

Der zweite Teil des Übersichtsartikels beschäftigt sich mit einer Auswahl von sezernierten Faktoren von *S. suis* (siehe Tabelle 3). Der Schwerpunkt liegt auf Suilysin und EF, die auch im experimentellen Teil dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen. Suilysin ist ein Cholesterol-abhängiges Zytolysin. Es wird sezerniert und verursacht Hämolyse und Zytotoxizität. Es liegen experimentelle Hinweise auf immunmodulatorische Wirkungen vor, die bereits bei sublytischen Konzentrationen auftreten. Trotz vielfältiger Wirkungen ist Suilysin kein essentieller Virulenzfaktor von *S. suis*. Ob Suilysin beim Schwein ein protektives Antigen darstellt, ist noch unzureichend untersucht. In dem Lebendimpfstoffversuch mit der isogenen *ofs* Mutante wurden die Immunreaktionen gegenüber Suilysin quantitativ und qualitativ untersucht.

EF ist neben MRP der wichtigste Virulenzmarker der Serotypen 1 und 2. Die Funktion von EF ist nicht bekannt. MRP⁺ EF⁺ Serotyp-2-Stämme sind grundsätzlich virulenter als MRP⁻ EF⁻ Stämme. Der dritte in experimentellen Infektionen berücksichtigte Serotyp-2-Phänotyp (MRP⁺ EF^{*}) zeichnet sich durch die Expression einer größeren EF Variante aus (EF^{*}) und besitzt im Vergleich zu MRP⁺ EF⁺ (110 kDa Protein) Stämmen nur eine mäßige Virulenz (Vecht *et al.* 1992). In dieser Arbeit

hat sich gezeigt, dass sich die Prävalenzen dieser Phänotypen bei Trägertieren in der Wildschwein- und Hausschweinpopulation Norddeutschlands unterscheiden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird in der entsprechenden Arbeit diskutiert. EF wurde weiterhin als immunogenes Antigen in dem Lebendimpfstoffversuch berücksichtigt.

B Konzeption und Fragestellung

Die Interaktion zwischen einem pathogenen invasiven Bakterium und dem Wirtsorganismus wird wesentlich durch Oberflächen-assoziierte und sezernierte Faktoren des Bakteriums bestimmt. Die große Variabilität dieser Faktoren, ihre Funktion in der Pathogenese und ihre Bedeutung für die Impfstoffentwicklung stehen in Zusammenhang mit spezifischen Erreger-Wirt-Interaktionen. Auf Grund ihrer Bedeutung sollten in dieser Arbeit Oberflächen-assoziierte und sezernierte Faktoren von *S. suis* im Hinblick auf alle drei genannten Gesichtspunkte untersucht werden. *S. suis* zeichnet sich durch eine große Diversität und vielfältige Erreger-Wirt-Interaktionen aus. Für die Prophylaxe von *S.-suis*-Erkrankungen steht bis heute kein serotypübergreifender Impfstoff zur Verfügung. Eine Lösung der *S.-suis*-Problematik erscheint nur möglich, wenn es gelingt, die Impfstoffentwicklung auf ein Fundament aus Kenntnissen zur Epidemiologie und Pathogenese des Erregers zu stellen. In dieser Arbeit wurden im Anschluss an epidemiologische und pathogenetische Untersuchungen Versuche zur Impfstoffentwicklung durchgeführt. Die Wahl der Impfstoffkandidaten, die Konzeption der Belastungsversuche und die Auswahl der Analyse-Parameter basierten auf Erkenntnissen aus den epidemiologischen und pathogenetischen Teilen dieser Arbeit.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Ermöglicht der Nachweis von Virulenz-assoziierten Genen und die Differenzierung entsprechender Genvarianten den Nachweis von wichtigen invasiven *S.-suis*-Pathotypen?
- Wie hoch ist die Prävalenz dieser Genotypen bei erkrankten Hausschweinen sowie bei klinisch unauffälligen Trägertieren unter völlig unterschiedlichen Selektionsbedingungen (Hausschwein- versus Wildschweinpopulation)?
- Wie unterscheiden sich wichtige invasive Pathotypen in experimentellen Infektionen?
- Im Rahmen der Pathogeneseuntersuchungen sollte ein neuer Virulenzfaktor identifiziert und charakterisiert werden. Es wurde gezielt nach einem noch nicht charakterisierten Oberflächenprotein gesucht, das zur wichtigen Familie der MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) gehört. MSCRAMMs spielen in der Erreger-Wirt-Interaktion bei pathogenen Streptokokken und Staphylokokken grundsätzlich Schlüsselrollen. Im Rahmen der Pathogeneseuntersuchungen wurden isogene *in-frame* Mutanten

und heterologe Expressionssysteme (*Lactococcus lactis*) etabliert. Mit diesen Werkzeugen lässt sich die Fragestellung bearbeiten, welche Eigenschaften eines Bakteriums durch die Expression eines bestimmten Oberflächen-assoziierten oder sezernierten Proteins vermittelt werden. Untersuchungen mit diesen Werkzeugen sind in Bezug auf die Erreger-Wirt-Interaktion grundsätzlich aussagekräftiger als Experimente, die sich auf die Funktionsanalyse von gereinigten Faktoren beschränken.

- Die Untersuchungen im Rahmen der Epidemiologie und Pathogenese schafften Voraussetzungen für die Charakterisierung der Erreger-Wirt-Interaktion in standardisierten experimentellen Belastungsversuchen mit unterschiedlichen Analyse-Parametern. In den Impfstoffversuchen wurden eine Ganzzellvakzine, eine Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen und ein Lebendimpfstoff basierend auf einer isogenen Deletionsmutante auf ihre protektiven Eigenschaften getestet.
- Neben der Frage nach der Protektion sollte in den Impfstoffversuchen auch untersucht werden, welcher Analyse-Parameter sich als prognostischer Indikator eignen könnte. Bei der Suche nach einem prognostischen Indikator fand die Erreger-Wirt-Interaktion besondere Berücksichtigung.

Bakterielle Faktoren, sowohl Oberflächen-assoziierte als auch sezernierte, standen bei allen Untersuchungen im Mittelpunkt. Die humorale Immunantwort richtet sich vor allem gegen diese Faktoren. Aus der Literatur lagen Hinweise auf eine protektive Wirkung der humoralen Immunantwort gegenüber *S. suis* vor (Andresen und Tegtmeier 2001). Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich eine Untersuchung humoraler Immunreaktionen.

C Ergebnisse

C.1 Untersuchungen zur Epidemiologie von *Streptococcus suis* unter besonderer Berücksichtigung Virulenz-assoziiierter Faktoren

Silva L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115: 117-127.

Die Etablierung von zwei neuen PCR-Verfahren zur Differenzierung von *S.-suis*-Genotypen war Bestandteil dieser Arbeit. Die Multiplex-PCR ermöglichte die Differenzierung der vier *cps*-Typen 1, 2, 7 und 9 sowie den Nachweis der Virulenz-assoziierten Faktoren *mrp*, *epf*, *sly* und *arcA*. Weiterhin wurde das *S. suis* spezifische *gdh*-Gen amplifiziert, so dass mit dieser Multiplex-PCR *S. suis* von anderen α -hämolyisierenden Streptokokken unterschieden werden konnte. Neben der Multiplex-PCR wurde noch eine *mrp*-Varianten-PCR entwickelt, mit der *mrp* Allele differenziert werden konnten, die für unterschiedliche Größenvarianten kodieren (Abb. 2). Beide PCR-Verfahren wurden in allen folgenden Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzt, um den spezifischen Nachweis eines *S.-suis*-Genotyps zu erbringen. Beispielsweise erfolgte nach experimentellen Infektionen grundsätzlich die Differenzierung aller möglichen Reisolat mit der Multiplex-PCR. Die *mrp*-Varianten-PCR wurde vor allem eingesetzt, um bei Serotyp-9 (*cps9*)-Stämmen das Vorkommen von *mrp** zu beweisen. Im Rahmen der oben aufgeführten Arbeit wurde das *mrp** Allel sequenziert, das für eine 151 kDa große MRP-Variante kodiert (*gene accession* DQ295197). Diese Sequenzierungsergebnisse legten nahe, dass die Größenvariationen der *mrp* Allele durch Duplikationen von sich wiederholenden Sequenzen hervorgerufen wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob sich durch den Nachweis von Virulenz-assoziierten Genen und *mrp*-Genvarianten wichtige invasive Pathotypen differenzieren lassen. Dazu wurden 210 *S.-suis*-Isolate mit unterschiedlichem klinischen Hintergrund (Tabelle 2) mit der Multiplex-PCR und der *mrp*-Varianten-PCR typisiert. Wichtigstes Ergebnis dieser Typisierung war, dass jeweils 21 bzw. 23% der inneren *S.-suis*-Erkrankungen durch *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* bzw. *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* verursacht wurden (Berücksichtigung von Meningitis, Arthritis, Septikämie, Serositis, Endocarditis aber nicht Pneumonie). Weitere 16% der

invasiven *S.-suis*-Erkrankungen waren mit unterschiedlichen *mrp+* *epf** *sly+* *cps2* Stämmen assoziiert. Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die Stämme, die zu einem der genannten Genotypen gehörten, grundsätzlich eine genetische Ähnlichkeit aufweisen und gegebenenfalls sogar mit einem klonalen *S.-suis*-Komplex in Zusammenhang stehen. Deshalb wurde in Folge eine AFLP- und MLST-Analyse in Angriff genommen (Rehm *et al.* 2007).

Rehm, T., C. G. Baums, B. Strommenger, M. Beyerbach, P. Valentin-Weigand und R. Goethe (2007): Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Med. Microbiol.* 56: 102-109.

Ziel dieses Projektes war die Gruppierung von 116 *S.-suis*-Stämmen nach einer AFLP-Ähnlichkeitsanalyse. Auffällig war die Häufung von invasiven *S.-suis*-Stämmen im Cluster A und von Lungenisolaten im Cluster C. Während im Cluster A vor allem *cps1-*, *cps2-* und *cps9-* Stämme auftraten, war das Cluster C mit *cps7-* Stämmen assoziiert. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass das Subcluster A1 mit dem Genotyp *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* und das Subcluster A2 mit dem Genotyp *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* signifikant korrelierte. Die MLST-Analyse einer Auswahl von Stämmen (n=19) legte eine Assoziation des Subclusters A1 mit dem ST1-Komplex und des Subclusters A2 mit einem möglichen ST87-Komplex nahe. Während der von invasiven *S.-suis*-Stämmen gebildete klonale Komplex 1 bekannt war, lieferte diese Arbeit somit erste Hinweise auf einen weiteren klonalen Komplex invasiver *S.-suis*-Stämme. Es blieb festzuhalten, dass die AFLP- und MLST-Analyse eine genetische Ähnlichkeit für Stämme innerhalb der Genotypen *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* und *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* aufzeigten. Aufgrund der Hinweise auf klonale Komplexe ist zu diskutieren, ob diese beiden invasiven Genotypen durch die moderne Schweinehaltung selektiert wurden. Die Frage nach einer möglichen Selektion sollte durch den Vergleich der *S.-suis*-Population gesunder Haus- und Wildschweine in Norddeutschland bearbeitet werden (Baums *et al.* 2007). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass invasive *S.-suis*-Stämme grundsätzlich auch bei klinisch unauffälligen Trägertieren nachgewiesen werden können.

Baums, C. G., G. J. Verkühlen, T. Rehm, L. M. Silva, M. Beyerbach, K. Pohlmeier und P. Valentin-Weigand (2007): Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 711-717.

In dieser Arbeit wurden 244 *S.-suis*-Tonsillenisolat von 200 Wildschweinen aus Norddeutschland genotypisiert. Die Wildschweine stammten aus zwölf verschiedenen Regionen und wurden auf der Jagd erlegt. Serotyp-9 (*cps9*)-Stämme konnten beim Wildschwein sehr häufig nachgewiesen werden (22% positiv). Bis auf eine Ausnahme war aber keines der Isolate positiv für *mrp**. Im Gegensatz zu den von Rehm *et al.* (2007) charakterisierten invasiven Serotyp-9-Isolaten des Hausschweins zeigten diese Stämme keine Clusterbildung in der AFLP und bis auf eine Ausnahme keine Ähnlichkeit (< 60%) zu virulenten *S.-suis*-Referenzstämmen vom Hausschwein. Weiterhin konnte bei keinem der 200 Tiere, der für das Schwein besonders virulente *S.-suis*-Genotyp *mrp+ epf+ sly+ cps2* nachgewiesen werden (*epf+* kodiert für das 110 kDa EF Protein). Im Gegensatz dazu war bei 92 gesunden Kontrollhausschweinen in fünf Fällen dieser Genotyp nachweisbar. Circa 10% der Wildschweine waren positiv für den *S.-suis*-Genotyp *mrp+ epf* sly+ cps2* (Tabelle 1; *epf** kodiert für größere EF-Varianten). Die Wildschweinisolat dieses Genotyps bildeten in der AFLP ein homogenes Cluster zusammen mit virulenten Serotyp-2-Referenzstämmen vom Schwein und vom Menschen.

Mit der Charakterisierung der Wildschwein-assoziierten *S.-suis*-Population fanden die epidemiologischen Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung von *S.-suis*-Genotypen beim Schwein einen Abschluss. Für die experimentellen Infektionen wurde auf der Grundlage der Ergebnisse von Silva *et al.* (2006) und Rehm *et al.* (2007) von den Genotypen *mrp+ epf+ sly+ cps2* und *mrp* epf- sly+ cps9* jeweils ein Referenzstamm ausgewählt (Stamm 10 bzw. A3286/94).

Im Rahmen eines Forschungsstipendiums innerhalb der *summer school* der TiHo wurde noch ein zusätzliches Projekt initiiert. Hierbei wurden die beschriebenen *S.-suis*-Genotypisierungsmethoden eingesetzt, um eine mögliche Infektionskette zwischen Ferkelerzeuger und Aufzuchtbetrieb aufzuklären (Neis *et al.* 2007).

Neis, C., J. Rohde, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2007): Untersuchungen einer möglichen *Streptococcus-suis*-Infektionskette in einer Schweineerzeugergemeinschaft mittels PCR-gestützter Genotypisierung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120: 202-206.

Dieses Fallbeispiel verdeutlichte, dass mit den Genotypisierungsmethoden, insbesondere mit der Multiplex-PCR, auch wertvolle Informationen für die tierärztliche Praxis gewonnen werden können. So konnte der Verdacht, dass die *S.-suis*-Probleme in zwei Aufzuchtbetrieben mit dem Einschleppen eines virulenten *S.-suis*-Stammes aus einem gemeinsamen Ferkelerzeugerbetrieb zusammenhängen, nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, die Typisierung offenbarte, dass in beiden Beständen sehr unterschiedliche Genotypen für die Probleme verantwortlich waren. Während in dem Aufzuchtbetrieb 1 ein *mrp* epf- sly+ cps9* Stamm nachgewiesen werden konnte, war in dem Aufzuchtbetrieb 2 ein *mrp+ epf* sly+ cps2* Stamm für die Erkrankungen verantwortlich. Bei dem gemeinsamen Ferkelerzeuger konnte keiner der beiden Genotypen in Tonsillentupfern von Ferkeln oder in Vaginaltupfern der Sauen kulturell nachgewiesen werden.

Da die beiden in dieser Fallstudie nachgewiesenen virulenten Genotypen auch in den vorangegangenen Arbeiten eine zentrale Rolle spielten, ergaben sich wichtige Anknüpfungspunkte, die zum Teil in der Diskussion dieser Veröffentlichung aufgegriffen werden. Beispielsweise sprachen die epidemiologischen Ergebnisse von Silva *et al.* (2006) und dieser Fallstudie für eine höhere Virulenz von *mrp+ epf* sly+ cps2* Stämmen. Nach den experimentellen Ergebnissen von Vecht *et al.* (1993) sind diese Stämme aber nur schwach virulent.

Aufgrund der epidemiologischen Bedeutung erfolgte auch die Etablierung eines Infektionsmodells für einen *mrp+ epf* sly+ cps2* Stamm am Institut für Mikrobiologie der TiHo. Bei Absatzferkeln und Läufern konnte nach intravenöser Applikation eine hohe Mortalität beobachtet werden (eigene unveröffentlichte Ergebnisse), was die höhere Virulenz dieses Genotyps experimentell bestätigte.

C.2 Untersuchungen zur Pathogenese von *Streptococcus suis*

Baums C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect .Immun.* 74: 6154-6162.

Auf der Grundlage der Genomsequenz des *mrp+ epf+ sly+ cps2* Referenzstammes P1/7 wurde gezielt nach einem noch nicht charakterisierten Oberflächenprotein gesucht, das Homologie zu Proteinen der MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) Familie aufweist. Nachdem ein Leserahmen mit den typischen strukturellen MSCRAMM-Merkmalen und signifikanter Homologie zu den MSCRAMMs SOF von *S. pyogenes* und FnBA von *S. dysgalactiae* identifiziert wurde, erfolgte eine funktionelle Charakterisierung. Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen, isogenen *S.-suis*-Deletionsmutanten und einem heterologen Expressionssystem in *Lactococcus lactis* bewiesen, dass dieser Faktor Serumtrübungsfunktion besitzt und vermittelt. Diese Nachweise rechtfertigten den Namen *opacity factor of S. suis* (OFS). Im Einklang mit dem CWS von OFS spricht der Aktivitätsnachweis in Natriumdodecylsulfat-Extrakten für eine Oberflächenlokalisierung. Die Spezifität der Serumtrübung konnte durch die vollständige Hemmung mit OFS-spezifischen Antisera aufgezeigt werden (Abb. 4). OFS ist ein 105 kDa Protein mit einer Signalsequenz, einer großen N-terminalen Domäne mit Serumtrübungsfunktion gefolgt von einer Prolin-reichen Region, repetitiven Sequenzen und einem CWS. Weder die Prolin-reiche Region noch die repetitiven Sequenzen sind notwendig für die Serumtrübung. Die Funktion dieses C-terminalen Bereiches von OFS ist noch nicht hinreichend bekannt. Im Gegensatz zu anderen MSCRAMMs konnte keine Fibronectinbindung nachgewiesen werden. Für rekombinantes OFS konnte aber Fibrinogenbindung aufgezeigt werden. Weiterhin zeigten heterolog OFS-exprimierende Laktokokken vermehrte Fibrinogenbindung (eigene unpublizierte Ergebnisse und Ramachandran 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte am Institut für Mikrobiologie ein intranasales Infektionsmodell für den *mrp+ epf+ sly+ cps2* Referenzstamm 10 im Schwein etabliert werden. Entscheidend für die Reproduzierbarkeit war die Durchführung der Infektion in Narkose und die Prädisposition über eine lokale 1% Essigsäure Behandlung. Als Analyse-Parameter wurde nicht nur auf Morbidität und Mortalität sondern auch auf einen pathohistologischen Score zurückgegriffen, der auf der

histologischen Bewertung fibrinös-eitriger Veränderungen in neun unterschiedlichen Organ- bzw. Gewebeproben basierte (weitere Erklärungen zu diesem Score unter *Animal experiments* in *Materials and Methods* in Baums *et al.* 2006). Nach der Bestimmung der LD₈₀ für Absatzferkel wurden die „molekularen Kochschen Postulate“ für OFS überprüft. Im Gegensatz zum Wildtyp rief die Applikation der isogenen *ofs*-Mutante bei keinem der Absatzferkel Krankheitssymptome hervor. In der Gruppe der sieben bis acht Wochen alten Schweine erkrankten jedoch zwei Tiere nach Applikation der isogenen *ofs*-Mutante (Tabelle 2). Im Einklang mit den klinischen Parametern war der pathohistologische Score bei den mit der Mutante infizierten Tieren wesentlich niedriger als bei den mit dem Wildtyp infizierten Schweinen (Tabelle 3). Als Schlussfolgerung ließ sich festhalten, dass diese Arbeit zum ersten Mal die Virulenzfunktion eines Serumtrübungsfaktors im natürlichen Wirt und nach mukosaler Applikation aufzeigte. Da die *ofs*-Mutante bei einer größeren Zahl von nicht erkrankten Tieren (n = 7) 20 Tage nach der Infektion in den Tonsillen kulturell nachgewiesen wurde, lag die Schlussfolgerung nahe, dass diese Mutante in Bezug auf die Fähigkeit zur Schleimhautkolonisation keine Attenuation aufwies. Aufgrund dieser Merkmale war die *ofs*-Mutante ein attraktiver Kandidat für die Entwicklung eines Lebendimpfstoffes. In einem folgenden Immunisierungsversuch wurde daher auf die *ofs*-Mutante zur intranasalen Immunisierung von Absatzferkeln zurückgegriffen (Kock *et al.* 2009).

Beineke A., K. Bennecke, C. Neis, C. Schröder, K.-H. Waldmann, W. Baumgartner, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2008): Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet. Microbiol.* 128: 423-430.

Die epidemiologischen Arbeiten demonstrierten eine große Bedeutung von *sly+* *mrp** *epf-* *cps9* Stämmen im Krankheitsgeschehen der Schweine in Norddeutschland und sprachen für eine Assoziation dieses Genotyps mit einem möglichen klonalen Komplex. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* Stamm (A3286/94), der zum ST87-Komplex gehört, als Referenzstamm ausgewählt und für experimentelle Infektionen eingesetzt. Die Ergebnisse intranasaler und intravenöser Infektionen mit diesem Stamm werden in dieser Arbeit vorgestellt. Im Gegensatz zu dem *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* Referenzstamm 10 löste die intranasale Applikation von

A3286/94 keine Krankheitssymptomatik aus. Die Versuchstiere zeigten aber pathologische Veränderungen im Gehirn, die zum Teil über Immunhistologie eindeutig auf den Belastungsstamm zurückgeführt werden konnten. In einer weiteren Gruppe von Ferkeln wurde der Serotyp-9-Stamm A3286/94 intravenös appliziert. Da in dieser Gruppe hohe Morbidität und Mortalität auftraten, wurde in den folgenden Belastungsversuchen zur Bestimmung der heterologen Schutzwirkung von Impfstoffkandidaten auf die intravenöse Applikation zurückgegriffen.

Diese Arbeit bestätigte für experimentelle *S.-suis*-Belastungen, dass die Bestimmung und Differenzierung von Leukozyten im Blut bei symptomfreien Tieren Hinweise auf subklinische Infektionen liefern kann (Abb. 1). Aus diesem Grund wurde auch in allen Folgeversuchen eine Bestimmung der Blutleukozyten integriert.

Im Rahmen der Etablierung des Infektionsmodells für den *sly+ mrp* epf- cps9* Referenzstamm wurden auch wichtige pathohistologische Ergebnisse gesammelt. Bei den intranasal infizierten Versuchstieren konnten zum Teil fibrinös-eitrige Veränderungen im Gehirn, zum Teil aber auch lymphoplasmazelluläre Infiltrationen und granulomatöse Läsionen festgestellt werden. Die zuletzt genannten Veränderungen werden grundsätzlich als untypisch für *S. suis* eingestuft. Über einen immunhistologischen Nachweis gelang es aber in einigen Fällen einen ätiologischen Zusammenhang mit der experimentellen *S.-suis*-Infektion herzustellen. Die Publikation enthält eine kritische Diskussion dieser Ergebnisse.

Ferner wiesen immunhistologische Untersuchungen die Expression des Virulenz-assoziierten Faktors MRP in Gehirnläsionen nach (Abb. 2 und Tabelle 3). Diese Arbeit beinhaltete somit den ersten *in situ* Expressionsnachweis eines *S.-suis*-Proteins. Im Einklang mit diesen Ergebnissen beschrieb eine andere Gruppe später eine *in vivo* Induktion von MRP im Vergleich zur frühen exponentiellen *in vitro* Wachstumsphase (Tan *et al.* 2008).

C.3 Untersuchungen zur Immunprophylaxe von *Streptococcus suis*

Baums C. G., C. Kock, A. Beineke, K. Bennecke, R. Goethe, C. Schröder, K.-H. Waldmann und P. Valentin-Weigand (2009): *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine induced immunogenicities and their protective efficacy against serotypes 2 and 9. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 200-208.

In der Schweinepraxis besteht ein großer Bedarf an einem serotypübergreifenden *S.-suis*-Impfstoff. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien wurde daher in den Immunisierungsversuchen dieser Arbeit nicht nur der homologe Serotyp-2-Stamm 10 sondern auch der heterologe Serotyp-9-Stamm A3286/94 eingesetzt. Insgesamt sollten drei prinzipiell sehr unterschiedliche *S.-suis*-Impfstoffkandidaten getestet werden: eine Ganzzell-, eine Subunit- und eine Lebendvakzine. In der oben genannten Arbeit wurde eine Serotyp-2-Ganzzellvakzine verglichen mit einer Subunitvakzine desselben Stammes (*mrp+ epf+ sly+ cps2* Referenzstamm 10). Diese Subunitvakzine enthielt unterschiedliche Oberflächenproteine wie MRP, SAO und FBPS, die nicht nur von dem homologen Serotyp-2-Stamm, sondern auch von dem heterologen Serotyp-9-Stamm A3286/94 exprimiert wurden (Abb. 1). In der vorangegangenen Arbeit von Silva *et al.* (2006) konnte weiterhin festgestellt werden, dass in Norddeutschland die überwiegende Mehrzahl der invasiven *S.-suis*-Isolate das Gen für das Oberflächen-assoziierte Protein MRP besitzt. Dieses Protein war in der Subunitvakzine enthalten. Deshalb war die Subunitvakzine ein attraktiver Kandidat für einen serotypübergreifenden Impfstoff. Weder in dem homologen noch in dem heterologen Belastungsversuch war jedoch eine protektive Wirkung dieser Subunitvakzine zu erkennen (Abb. 2). Im Gegensatz dazu zeigte die Applikation der Ganzzellvakzine eine protektive Wirkung gegenüber der homologen Belastung.

Im Folgenden setzte sich die Arbeit mit der Frage auseinander, welche qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen den humoralen Immunantworten bestehen, die von den beiden Vakzinen induziert wurden. Von besonderem Interesse waren mögliche Zusammenhänge mit der protektiven Wirkung. Beide Impfstoffe induzierten vergleichbare Serokonversionen gegen das Oberflächenprotein MRP (Abb. 3). Die Antikörperspiegel gegen SAO waren sogar höher in der Subunitvakzinegruppe. Das Verhältnis von IgG1 zu IgG2 war nur geringfügig unterschiedlich zwischen Tieren, denen die Subunit- oder die Ganzzellvakzine appliziert wurde. Unterschiede zwischen den beiden Impfstoffen zeigten sich jedoch im Opsonophagozytostest:

Nur in der Ganzzellvakzinegruppe wurde die Induktion opsonisierender Antikörper beobachtet. Die opsonisierende Wirkung betraf nur den homologen Serotyp-2-Stamm, nicht aber den heterologen Serotyp-9-Stamm (Abb. 4A und 4C). Weiterhin korrelierten die Titer der opsonisierenden Antikörper der Einzeltiere mit dem Ausbleiben von Krankheitssymptomen nach der Infektion (Abb. 4B). Diese Ergebnisse sprachen für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Induktion opsonisierender Antikörper und der protektiven Wirkung der Ganzzellvakzine gegenüber dem homologen Belastungsstamm. Opsonisierende Antikörpertiter könnten nach den Ergebnissen dieser Arbeit ein wertvoller prognostischer Indikator für *S.-suis*-Infektionen werden. Serum IgG-Titer gegen die Oberflächenproteine MRP und SAO waren dafür hingegen ungeeignet.

Von besonderem Interesse war die Frage nach den Antigenen, welche die opsonisierenden Antikörper der Tiere der Ganzzellvakzinegruppe erkannten. In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, ob diese opsonisierenden Antikörper gegen die Kapsel gerichtet waren. Aus diesem Grund wurden auch Seren von Schweinen berücksichtigt, die mit einer Serotyp-2-Kapselkonjugatvakzine immunisiert wurden (separater Immunisierungsversuch ohne Belastung). Im Gegensatz zu den Kapselkonjugat-immunisierten Schweinen hatten alle Tiere der Ganzzellvakzinegruppe im Vergleich zur Kontroll- und Subunitvakzinegruppe keine erhöhten Antikörpertiter gegen die Kapsel (Abb. 5A). Weiterhin konnten die opsonisierenden Antikörper der Tiere der Ganzzellvakzinegruppe mit der unbekapselten isogenen Mutante von Stamm 10 ebenso absorbiert werden wie mit dem Wildtyp-Stamm. Wie erwartet gelang bei den Seren der Tiere, die mit dem Kapselkonjugat immunisiert worden waren, die Präabsorption nur mit dem Wildtyp aber nicht mit der unbekapselten Mutante (Abb. 5B). Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Schlussfolgerung, dass die durch die Ganzzellvakzine induzierten opsonisierenden Antikörper gegen andere Bestandteile als die Kapsel gerichtet waren.

Weder die Ganzzell- noch die Subunitvakzine induzierten eine signifikante Schutzwirkung gegen den heterologen Belastungsstamm. Deshalb sollte in dem folgenden Impfstoffprojekt eine grundlegend andere Strategie auf ihre homologe und heterologe Schutzwirkung hin untersucht werden. Aufgrund der Hinweise auf die protektive Wirkung opsonisierender Antikörper wurde dieses qualitative Merkmal auch in dem folgenden Versuch bestimmt.

Kock, C., A. Beineke, M. Seitz, M. Ganter, K.-H. Waldmann, P. Valentin-Weigand, C. G. Baums (2009): Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic *ofs* mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132: 135-145.

Voraussetzung für diesen Lebendimpfstoffversuch war die Herstellung und Charakterisierung einer isogenen *ofs*-Mutante in den Untersuchungen zur *S.-suis*-Pathogenese (Baums *et al.* 2006). Diese Mutante war stark Virulenz-attenuiert, konnte aber noch den oberen Respirationstrakt kolonisieren. Da im Mausmodell die intranasale Applikation attenuierter Pneumokokkenmutanten einen serotypübergreifenden Schutz hervorrief (Roche *et al.* 2007), wurde diese Immunisierungsstrategie auch in dieser Arbeit verfolgt. Aufgrund der Ergebnisse der epidemiologischen Arbeiten (Rehm *et al.* 2007; Silva *et al.* 2006) wurde an den beiden Belastungstämmen, dem homologe Serotyp-2-Stamm 10 und dem heterologen Serotyp-9-Stamm A3286/94, festgehalten. Im Gegensatz zum vorangegangenen Immunisierungsversuch wurde Stamm 10 intravenös appliziert. So sollte sichergestellt werden, dass eine mögliche Schutzwirkung mit einer systemischen Immunität und nicht nur mit einer lokalen mukosalen Immunität zusammenhängt. Drei Wochen nach der einmaligen intranasalen Applikation der isogenen *ofs*-Mutante wurde weder gegenüber der homologen Serotyp-2- noch gegenüber der heterologen Serotyp-9-Belastung ein signifikanter Schutz beobachtet. Die Versuchstiere zeigten in Folge der Immunisierung Serokonversion gegenüber MRP, EF und vor allem Suilysin (Abb. 2 A-C). Bei zehn von zwölf immunisierten Tieren konnte auch die neutralisierende Funktion der induzierten Antikörper gegenüber Suilysin bewiesen werden (Abb. 3). Mit der Applikation der Lebendvaccine ging keine signifikante Induktion opsonisierender Antikörper einher (Abb. 4). Der Opsonophagozytostest wurde mit der gleichen *multiplicity of infection* (MOI) und unter Einsatz derselben Kontrollen wie zuvor durchgeführt (Baums *et al.* 2009). Es lässt sich daher festhalten, dass nur die Applikation der Ganzzellvaccine, nicht aber die einmalige intranasale Applikation des attenuierten Lebendimpfstoffes opsonisierende Antikörper gegen Stamm 10 induzierte. Dieser Unterschied ist auch

eine nahe liegende Erklärung für die mangelnde protektive Wirkung der Lebendvakzine im Vergleich zur Ganzzellvakzine.

D Übergreifende Diskussion

In der tierärztlichen Praxis besteht ein großer Bedarf an einem zugelassenen *S.-suis*-Impfstoff. Die derzeitig häufig praktizierte Immunprophylaxe mit stallspezifischen Vakzinen ist mit zahlreichen Problemen assoziiert (Kock 2009). Die Entwicklung eines serotypübergreifenden Impfstoffs ist aufgrund der hohen Diversität von *S. suis* eine große Herausforderung. Weiterhin sprechen *in vitro* Experimente sowie Ergebnisse der Genomsequenzierung für hoch effiziente Strategien dieses Erregers in der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem. Beispielsweise werden invasive *S.-suis*-Stämme von einer Kapsel umgeben, die den Erreger wirkungsvoll vor der Phagozytose schützt und nur eine sehr schwache immunogene Wirkung besitzt (Baums und Valentin-Weigand, 2009). In dieser Arbeit sollten epidemiologische, pathogenetische und immunprophylaktische Untersuchungen eng verzahnt werden, um der schwierigen Ausgangssituation gerecht zu werden. Leitfaden durch alle Untersuchungen waren spezifische Oberflächen-assoziierte und sezernierte Proteine, da diese Faktoren häufig Schlüsselrollen in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt spielen.

Eine genaue Differenzierung von Genotypen (oder Phänotypen) ist bei *S. suis* sehr wichtig, da sich dieser Erreger durch eine große Diversität auszeichnet und große Virulenzunterschiede zwischen Genotypen (bzw. Phänotypen) bestehen, sogar innerhalb eines Serotyps (Vecht *et al.* 1992). Weiterhin ist zu beachten, dass dieser Keim sehr häufig auf den Schleimhäuten des Schweins vorkommt, häufig auch mit mehreren Genotypen gleichzeitig. Im ersten Teil wurden zwei PCR-Methoden (Multiplex-PCR und *mrp*-Varianten-PCR) etabliert, die eine Differenzierung von zahlreichen spezifischen Genotypen einer *S.-suis*-Population ermöglichen (Silva *et al.* 2006). Einige dieser Genotypen, insbesondere *mrp⁺ epf⁺ sly⁺ cps2*, *mrp^{*} epf⁻ sly⁺ cps9*, *mrp⁺ epf^{*} sly⁺ cps2*, *cps7* und *mrp^s epf⁺ cps1*, spielen im Krankheitsgeschehen der Schweine herausragende Rollen. Beide PCR-Verfahren sind inzwischen weltweit von unterschiedlichen Gruppen in epidemiologischen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt worden, um insgesamt über 600 *S.-suis*-Isolate zu typisieren (Baums *et al.* 2007; Silva *et al.* 2006; Takamatsu *et al.* 2008b; Takamatsu *et al.* 2009; Wei *et al.* 2008). Weiterhin hat sich der Einsatz der Multiplex-PCR in der Routinediagnostik des Instituts für Mikrobiologie bewährt. In dieser Arbeit waren beide PCR-Methoden Voraussetzungen für die epidemiologischen

Untersuchungen sowie für den spezifischen Nachweis der Belastungstämmen in den Infektionsversuchen.

In der durchgeführten Falluntersuchung (Neis *et al.* 2007) wurde deutlich, welches große Interesse auch in der tierärztlichen Praxis an einer *S.-suis*-Genotypisierungsmethode besteht. Grundsätzlich muss hierbei aber kritisch angemerkt werden, dass Trägartiere mit keiner Untersuchungsmethode sicher ausgeschlossen werden können. Aus diesem Grund können entsprechende Untersuchungsergebnisse nur als Hinweise verstanden werden. In dem konkreten Fall bedeutete dies, dass ein Vorkommen der Problemgenotypen der Aufzuchtbetriebe in dem Ferkelerzeugerbestand nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund ist auch die Zielsetzung spezifisch pathogenfreie Bestände aufzubauen, die frei von bestimmten *S.-suis*-Genotypen sind, problematisch. Als Alternative zur Typisierung von *S.-suis*-Isolaten kann in vielen Fällen auch eine direkte PCR-Diagnostik vorgenommen werden (Swildens *et al.* 2005).

Eine Analyse von Trägartieren erfolgte auch in der Arbeit zur Charakterisierung einer Wildschwein-assoziierten *S.-suis*-Population (Baums *et al.* 2007). Für die Fragestellungen dieser Arbeit war es zwingend erforderlich eine kulturelle Untersuchung mit einer Genotypisierung der *S.-suis*-Isolate zu verknüpfen. Nur so war es möglich aufzuzeigen, dass der aus dem *Liquor cerebrospinalis* isolierte Genotyp eines norddeutschen Jägers bei fast 10% der untersuchten Wildschweine vorkommt. Diese Aussage stützt sich sowohl auf die Untersuchung von Virulenz-assoziierten Genen mit der Multiplex-PCR als auch auf die unabhängige AFLP-Analyse. Die Arbeit zeigt damit zum ersten Mal die Bedeutung des Wildschweins als wichtiges Reservoir für humanpathogene *S.-suis*-Stämme auf. Im Zusammenhang mit publizierten Fallberichten von *S.-suis*-Erkrankungen bei Jägern muss daher die Wildschweinjagd als Risikofaktor für eine *S.-suis*-Zoonose eingestuft werden. In den letzten Jahren hat es noch eine Reihe von weiteren Arbeiten gegeben, in denen das Vorkommen von Zoonoseerregern bei Wildschweinen bzw. entsprechende Seroprävalenzen untersucht wurden, insbesondere zu Hepatitis-E-Viren (Schielke *et al.* 2009; Wichmann *et al.* 2008), Trichinen (Garcia-Sanchez *et al.* 2009; Hurnikova und Dubinsky 2009; Jansen *et al.* 2008), *Toxoplasma gondii* (Bartova *et al.* 2006; Gauss *et al.* 2005), Leptospiren (Jansen *et al.* 2006; Jansen *et al.* 2007) sowie Brucellen, Yersinien und Francisellen (Al Dahouk *et al.* 2005). Für alle genannten

Zoonoseerreger liegen Hinweise auf Infektionen bei Wildschweinen in Europa vor. Das Wildschwein spielt somit als Reservoir und Quelle für Zoonoseerreger in Europa eine wichtige Rolle.

Experimentelle Untersuchungen zu *S. suis* haben sich in der Vergangenheit auf den Serotyp 2 konzentriert, da diesem Serotypen weltweit die größte Bedeutung zukommt und Infektionen beim Menschen fast ausschließlich durch Serotyp-2-Infektionen hervorgerufen werden. Andere Serotypen tragen aber auch wesentlich zum Krankheitsgeschehen in der modernen Schweinehaltung bei. Epidemiologische Untersuchungen dieser Arbeit (Silva *et al.* 2006) und eine vorangegangene Studie (Wisselink *et al.* 2000) hatten gezeigt, dass in Europa Serotyp-9-Stämme eine mit Serotyp-2-Stämmen vergleichbare Bedeutung besitzen. Daher wurde auch in den weiteren Untersuchungen der Serotyp 9 (*cps9*) besonders berücksichtigt. Ein wichtiges Ergebnis des epidemiologischen Teils dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die überwiegende Mehrzahl der Serotyp-9-Stämme ein identisches Profil von Virulenz-assoziierten Faktoren (*mrp* epf- sly+ cps9*) und nach den Ergebnissen der AFLP-Analyse eine relativ hohe Ähnlichkeit auszeichnet (Rehm *et al.* 2007; Silva *et al.* 2006). Ferner ergab die MLST-Analyse erste Hinweise auf eine Assoziation von *mrp* epf- sly+ cps9* Stämmen mit dem ST87-Komplex (Rehm *et al.* 2007). Diese Assoziation war unerwartet, da in der ersten *S.-suis*-MLST-Studie keine Anhäufung von Serotyp-9-Stämmen im ST87-Komplex beobachtet wurde und dieser Komplex weniger invasive Isolate enthielt als der ST1-Komplex (King *et al.* 2002). Auf der Grundlage der epidemiologischen Ergebnisse wurde ein repräsentativer Serotyp-9-Stamm (A3286/94) für die experimentellen Infektionen ausgewählt. Nach der Etablierung eines Infektionsmodells (Beineke *et al.* 2008) erfolgte in allen Immunisierungsversuchen auch eine Belastung mit diesem Serotyp-9-Referenzstamm, um den entsprechenden Impfstoffkandidaten auf eine heterologe Schutzwirkung zu testen. Die mangelnde Protektion aller untersuchten Impfstoffkandidaten gegenüber diesem wichtigen *S.-suis*-Pathotypen unterstreicht die Problematik der *S.-suis*-Immunprophylaxe. Es ist zu diskutieren, ob die Zunahme von Serotyp-9-Stämmen in Zusammenhang mit einem verbreiteten Einsatz von Ganzzellvakzinen steht, die früher fast ausschließlich auf der Grundlage von invasiven Serotyp-2-Isolaten hergestellt wurden (Wisselink *et al.* 2000). Die mangelnde Protektion der Serotyp-2-Ganzzellvakzine gegenüber der experimentellen

Serotyp-9-Belastung steht im Einklang mit dieser Hypothese (Baums *et al.* 2009). Weiterhin sprach der Vergleich der Hausschwein- und Wildschwein-assoziierten *S.-suis*-Population für eine Selektion der *mrp* epf- sly+ cps9* und *mrp+ epf+ sly+ cps2* Genotypen durch die veränderten Lebensbedingungen (oder Genetik) der Hausschweine (Baums *et al.* 2007). Unter der Annahme einer Selektion von *mrp* epf- sly+ cps9* Stämmen bei Einsatz von *mrp+ epf+ sly+ cps2* Ganzzellvakzinen ist es wahrscheinlich, dass es nur wenige oder gar keine kreuzprotektiven Antigene für diese beiden Pathotypen gibt. Mit Proteomanalysen sind in der jüngsten Zeit zahlreiche immunogene Oberflächenproteine in Serotyp-2- und -9-Stämmen identifiziert worden, deren Schutzwirkung für Schweine noch nicht bestimmt wurde (Wu *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008). Aufgrund der negativen Ergebnisse, die mit der Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen erzielt wurden (Baums *et al.* 2009), muss in Betracht gezogen werden, dass keines dieser immunogenen Proteine eine ausreichende protektive Wirkung erzielen könnte. Um gegebenenfalls dieser schwierigen Situation gerecht zu werden, sollen in Zukunft auch Kombinationsvakzinen auf ihre Schutzwirkung untersucht werden, insbesondere eine Kombination aus einer Serotyp-9- und Serotyp-2-Ganzzellvakzine sowie eine entsprechende Kapselkonjugatvakzine.

Die zur Differenzierung von Serotyp-2-Stämmen eingesetzten Marker *epf*, *mrp* und *sly* sind für die Virulenz von *epf+ mrp+ sly+* Serotyp-2-Stämmen nicht essentiell (Lun *et al.* 2003; Smith *et al.* 1996). Die Funktionen von MRP und EF sind bis heute nicht bekannt. Da keine phänotypischen Unterschiede zwischen *mrp-* bzw. *epf-* Mutante und Wildtyp-Stamm beschrieben sind (mit Ausnahme der fehlenden Expression von MRP bzw. EF), konnten bis heute keine Erkenntnisse zur *S.-suis*-Pathogenese durch die Charakterisierung von MRP und EF gewonnen werden. In dieser Arbeit sollte daher gezielt nach einem neuen Virulenzfaktor gesucht werden, der eine Schlüsselrolle in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt spielen könnte. Die Identifikation eines solchen Virulenzfaktors eröffnet die Möglichkeit, diesen wichtigen Aspekt der *S.-suis*-Pathogenese in Zukunft gezielter zu untersuchen, insbesondere durch den Vergleich des Wildtyps mit der entsprechenden isogenen Mutante. Für einige MSCRAMMs, wie Sfb1 und SOF von *S. pyogenes* oder *clumping factor* von *Staphylococcus aureus*, sind so wichtige Funktionen in der Interaktion mit dem Wirt entschlüsselt worden (Courtney *et al.* 1999; Molinari *et al.* 1997; Que *et al.* 2005;

Talay *et al.* 2000; Timmer *et al.* 2006). Für *S. suis* lagen keine Hinweise auf die Ausstattung mit einem Protein der MSCRAMM-Familie vor. Aus diesem Grund wurde in dem publizierten Genom gezielt nach einem MSCRAMM-Leserahmen gesucht. Nach der Identifikation eines Leserahmens mit Homologie zu dem MSCRAMM SOF von *S. pyogenes*, mussten zunächst eine Reihe von wichtigen Werkzeugen generiert werden, insbesondere rekombinante Proteinkonstrukte, isogene Mutanten, heterologe Expressionsvektoren und spezifische Antiseren. Mit diesen Werkzeugen konnten folgende Schlussfolgerungen bewiesen werden: 1. *S.-suis*-Serotyp 2 (ST Komplex 1) exprimiert einen Serumtrübungsfaktor (OFS). 2. Die Serumtrübung wird durch die N-terminalen Domäne des OFS hervorgerufen. Die C-terminalen repetitiven Sequenzen und die Prolin-reiche Region sind für diese Funktion nicht notwendig. 3. OFS ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Eine isogene *ofs*-Mutante ist zwar stark Virulenz-attenuiert, aber noch in der Lage den oberen Respirationstrakt zu besiedeln (Baums *et al.* 2006). Die Serumtrübungsfunktion geht nach neuesten Untersuchungen zur Funktion von SOF von *S. pyogenes* auf die Disruption des *high-density lipoproteins* (HDL) zurück, insbesondere katalysiert rSOF die Disproportionierung von HDL zu großen Cholesterylester-reichen Mikroemulsionen (CERM) und neo HDL, ein Apo A-II und Phospholipid HDL-ähnliches Partikel, mit der gleichzeitigen Freisetzung von lipidfreiem Apo A-1 (Gillard *et al.* 2007). Die CERM-Bildung führt zur makroskopisch erkennbaren und photometrisch quantifizierbaren Serumtrübung. Die Desorption von lipidfreiem Apo A-1 aus dem HDL ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Han *et al.* 2009). Da Apo A-1 zu den Akute-Phase-Proteinen gehört, könnte die Serumtrübungsfunktion von OFS mit einer immunmodulatorischen Funktion dieses Virulenzfaktors zusammenhängen. Nach experimentellen subkutanen *S.-suis*-Infektionen zeigten Schweine innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Infektion einen sehr deutlichen Abfall von Apo A-1, der sich innerhalb von zwei Wochen *post infectionem* wieder normalisierte (Sorensen *et al.* 2006). Ob *S. suis* durch die Expression von OFS in den Verlauf der Akuten-Phase eingreift, ist aber zurzeit offen.

Das Gen *ofs* zeichnet sich durch einen Polymorphismus aus, der vergleichbar ist mit der Variabilität der CWS-Proteingene *mrp* und *sao*. Für alle drei Gene sind Größenvariationen beschrieben worden, die auf eine unterschiedliche Anzahl von repetitiven Sequenzen zurückzuführen sind (Feng *et al.* 2007; Li *et al.* 2006; Silva *et al.* 2006; Takamatsu *et al.* 2008a). Nach Ergebnissen von Takamatsu *et al.* (2008a)

besitzen aber nur Stämme des ST Komplexes 1 ein intaktes *ofs* Gen mit einer CWS Sequenz (Typ 1 *ofs*). Dem Typ 2 *ofs* fehlt ein CWS, so dass vor allem Kulturüberstände der entsprechenden Stämme Serumtrübungsaktivität aufweisen. In allen untersuchten *S.-suis*-Stämmen des ST27-Komplexes waren *frameshift* Mutationen im *ofs* Gen vorhanden (Takamatsu *et al.* 2008a). Weiterhin besitzen *mrp* epf- sly+* Serotyp-9-Stämme (ST87-Komplex) zwei Punktmutationen im *ofs* Gen (eigene unveröffentlichte Ergebnisse, *gene accession* GQ303144). Nach diesen Ergebnissen trägt OFS vor allem zur Virulenz des ST1-Komplexes bei, der für einen Großteil der *S.-suis*-Erkrankungen beim Schwein und Menschen verantwortlich ist, aber nicht zur Virulenz von anderen invasiven ST-Komplexen. Auf der anderen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, dass *S.-suis*-Stämme mit *frameshift* Mutationen im *ofs* Gen, diese unter bestimmten Umweltbedingungen überlesen und funktionelles OFS exprimieren. Für *Clostridium perfringens* konnte ein solcher Mechanismus für das β 2-Toxigen nachgewiesen werden: Antibiotika wie Gentamicin und Temperaturerhöhungen induzieren ein Überlesen der *frameshifts* und führen so zur Induktion der Toxinbildung (Vilei *et al.* 2005). Über die Stressfaktoren Temperatur und Antibiotika konnte aber bei dem *S.-suis*-Serotyp 9 Referenzstamm A3286/94 keine nachweisbare Serumtrübungsaktivität induziert werden (eigene unveröffentlichte Ergebnisse).

Die *ofs*-Mutante des Serotyp-2-Stammes 10 (ST1-Komplex) zeigt im Opsonophagozytostest mit naivem Serum und gereinigten neutrophilen Granulozyten vom Schwein eine verminderte Fitness im Vergleich zum Wildtyp (unveröffentlichte Ergebnisse, Ramachandran 2009). Nach Inaktivierung des Serums durch Erhitzen besteht keine Attenuation der *ofs*-Mutante mehr. Dieser wichtige Phänotyp soll in Zukunft im Rahmen des SFB587 näher untersucht werden, um die Funktion von OFS in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt besser zu verstehen. Es ist geplant, mit Komplement-defizienten Seren, spezifischen Inhibitoren und *knock-out*-Mäusen, eine mögliche Interaktion zwischen OFS und dem Komplementsystem genauer zu untersuchen.

Im Opsonophagozytostest wird die Interaktion zwischen dem Pathogen und dem neutrophilen Granulozyten *in vitro* rekonstruiert. Für die Bedeutung dieser Interaktion in der *S.-suis*-Pathogenese spricht zum einen die in akuten Fällen beobachtete Infiltration des *S.-suis*-infizierten Gewebes mit neutrophilen Granulozyten (Beineke *et*

al. 2008; Chabot-Roy *et al.* 2006; Vasconcelos *et al.* 1994; Williams und Blakemore 1990). Zum anderen konnten auch in den Immunisierungsversuchen dieser Arbeit wichtige Hinweise auf eine zentrale Bedeutung der Opsonophagozytose gewonnen werden: Die im Opsonophagozytostest ermittelten Titer opsonisierender Antikörper korrelierten deutlich mit dem klinischen Verlauf der Versuchstiere, im Gegensatz zur quantitativen Antikörpertiterbestimmung im ELISA und im Gegensatz zur Bestimmung neutralisierender Antikörper gegenüber Suilysin (Baums *et al.* 2009; Kock *et al.* 2009). Demnach sollte die Auseinandersetzung zwischen *S. suis* und neutrophilen Granulozyten (sowie Makrophagen) den Verlauf einer Infektion wesentlich bestimmen.

Neben der Opsonophagozytose ist auch die Ausbildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) ein wichtiger Abwehrmechanismus des neutrophilen Granulozyten. Das Grundgerüst der NETs besteht aus nukleärer oder mitochondrialer DNA, in das antimikrobielle Peptide, Histone und Proteasen eingebettet sind (Brinkmann *et al.* 2004). Der Nachweis von NETs wurde bis heute noch in keiner *S.-suis*-Arbeit in Angriff genommen. Es ist aber davon auszugehen, dass *S. suis*, vergleichbar mit *S. pneumoniae* und *S. pyogenes*, effiziente Strategien entwickelt hat, diesem Abwehrmechanismus zu entgehen. Beispielsweise könnten die Oberflächen-assoziierten und sezernierten Nukleasen von *S. suis* zum Abbau von NETs beitragen, vergleichbar mit der Funktion extrazellulärer DNAsen von *S. pyogenes* (Fontaine *et al.* 2004; Sumby *et al.* 2005; Zhang und Lu 2007). Weiterhin ist es nahe liegend, dass, wie bei *S. pneumoniae*, die Polysaccharidkapsel und die D-Alanylierung von Lipoteichonsäure zum Schutz vor NETs beitragen (Fittipaldi *et al.* 2008; Wartha *et al.* 2007). Diese Virulenzmechanismen würden erklären, warum virulente *S.-suis*-Stämme, insbesondere *mrp+ epf+ sly+ cps2* (ST1-Komplex), in der Lage sind, sich in der Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten (MOI = 1) und naivem Serum zu vermehren. Ein Abtöten durch neutrophile Granulozyten wird erst durch die Anwesenheit opsonisierender Antikörper ermöglicht (Baums *et al.* 2009).

Nach den Ergebnissen der Immunisierungsversuche könnten die im Opsonophagozytostest ermittelten opsonisierenden Antikörpertiter als prognostischer Indikator für *S.-suis*-Infektionen eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass in der Humanmedizin der Opsonophagozytostest als bester Indikator für eine protektive Immunität gegenüber *S.-pneumoniae*-Infektionen eine herausragende Rolle spielt und in modifizierter Form

auch in der klinischen Mikrobiologie zur Verbesserung der Prophylaxe und Therapie eingesetzt wird (Nahm und Romero-Steiner 2008).

In dieser Arbeit wurde die Schutzwirkung von drei sehr unterschiedlichen Immunisierungsstrategien (Ganzzell-, Subunit- und Lebendvakzine) bestimmt (Baums *et al.* 2009; Kock *et al.* 2009). Obwohl unterschiedliche Oberflächenproteine wie SAO, MRP und FBPS in der Subunitvakzine enthalten waren und deren Applikation Serokonversionen gegen SAO und MRP induzierte, konnte keine protektive Wirkung erzielt werden. Die mangelnde Schutzwirkung ging einher mit sehr niedrigen Titern an opsonisierenden Antikörpern. Weiterhin rief die einmalige intranasale Applikation der Lebendvakzine Antikörperanstiege gegen MRP, EF und Suilylin aber weder opsonisierende Antikörper noch Protektion hervor. Für die unzureichende Bildung opsonisierender Antikörper kommen mehrere Ursachen in Betracht: Da der IgG-Isotyp die Funktion des Antikörpers bestimmt, könnte das induzierte Isotypenprofil verantwortlich für die mangelnde Opsonophagozytose sein. Die Differenzierung von IgG1 und IgG2 offenbarte jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen der Subunit- und Ganzzellvakzinegruppe und somit auch keine Erklärung für die Unterschiede in der protektiven Wirkung (Baums *et al.* 2009). Nach neueren Sequenzanalysen besitzen IgG3-Antikörper vom Schwein potentielle FC γ R- und C1q-Bindungsstellen, so dass dieser Isotyp für die Opsonophagozytose eine wichtige Rolle spielen könnte (Butler *et al.* 2009). Aus diesem Grund sollte nach der experimentellen Bestätigung dieser Funktion in Zukunft auch eine Bestimmung des IgG3-Titers in *S.-suis*-Immunisierungsversuchen durchgeführt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die mangelnde Induktion opsonisierender Antikörper durch die Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen könnte mit der Funktion der *S.-suis*-Kapsel zusammenhängen. Die Kapsel besitzt die Fähigkeit Oberflächenproteine zu maskieren und so eine Bindung von Antikörpern zu verhindern. Im extremen Fall wären demnach nur Antikörper, die gegen die Polysaccharide der Kapsel gerichtet sind, in der Lage, eine Opsonophagozytose einzuleiten. Gegen diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass mit der kapsellosen Mutante die opsonisierenden Antikörper absorbiert werden konnten, die durch die Applikation der Ganzzellvakzine induziert wurden (Baums *et al.* 2009). Nach diesem Ergebnis kann davon ausgegangen werden, dass auch andere Antigene als die Kapselpolysaccharide für Antikörper zugänglich sind. Für die

Induktion von Antikörpern gegen diese exponierten Antigene bzw. Epitope ist es wahrscheinlich von Vorteil, wenn die Struktur der Bakterienoberfläche in dem Impfstoff intakt ist. Dies wäre eine Erklärung für die vergleichsweise gute Schutzwirkung der Ganzzellvakzine. Da Bakterien im Verlauf der Infektion ihre Genexpression verändern, steht die Frage im Raum, ob die Expression der postulierten exponierten *S.-suis*-Antigene zwischen der Schleimhautkolonisation, der Gewebeinvasion und Bakteriämie stark moduliert wird. Die Regulation der Genexpression würde erklären, warum die intranasale Applikation einer attenuierten *S.-suis*-Lebendvakzine trotz Persistenz auf den Schleimhäuten zu einer systemischen Immunantwort aber nicht zu einer Ausbildung einer belastbaren systemischen Immunität geführt hat (Kock *et al.* 2009).

Auf der Grundlage von Arbeiten zu anderen pathogenen Bakterien (Faucher *et al.* 2006; Larocque *et al.* 2005; Shelburne, III *et al.* 2008) und den sehr unterschiedlichen Anforderungen in den verschiedenen Stadien der Invasion ist eine veränderte Genexpression bei *S. suis* sehr wahrscheinlich. Die Entschlüsselung der Genexpression in den verschiedenen Infektionsstadien und die Identifikation der exponierten Proteinantigene könnten wichtige Impulse für die *S.-suis*-Immunprophylaxe setzen. Mit diesem Wissen wäre es beispielsweise möglich, *Lactococcus-lactis*-Stämme zu konstruieren, die (kreuz-) protektive Antigene der unterschiedlichen Infektionsstadien auf ihrer Oberfläche konstitutiv exprimieren. Diese *Lactococcus-lactis*-Stämme könnten als Lebendimpfstoff mit Markerfunktion sicher und wirkungsvoll eingesetzt werden (Daniel *et al.* 2009; Mannam *et al.* 2004). Bis zur Verwirklichung dieser oder ähnlicher Visionen muss in der tiermedizinischen Praxis jedoch auf *S.-suis*-Ganzzellvakzinen zurückgegriffen werden. Denn trotz umfangreicher Proteomanalysen und einigen Impfstoffstudien konnte bis heute kein besserer Impfstoff identifiziert werden.

E Zusammenfassung

S. suis gehört zu den wichtigsten bakteriellen Krankheitserregern des Schweins. Weiterhin hat *S. suis* als Zoonoseerreger, vor allem in Asien, eine zunehmende Bedeutung in der Humanmedizin erlangt. Meningitis, Septikämie, Arthritis, Serositis und Bronchopneumonie sind häufige Manifestationen beim Schwein. *S.-suis*-Infektionen des Menschen äußern sich meistens in Meningitis, Septikämie oder Endokarditis. Klinisch unauffällige Trägartiere spielen für die *S.-suis*-Epidemiologie eine herausragende Rolle. Der Erreger zeichnet sich durch eine große Diversität aus, die unter anderem in der Ausbildung von mindestens 33 unterschiedlichen Kapselserotypen zum Ausdruck kommt. Zu Beginn dieser Arbeit war die Kapsel der einzige nachgewiesene Virulenzfaktor von *S. suis*. Durch den Nachweis des *muramidase-released proteins* (MRP) und des *extracellular factors* (EF) konnten bereits drei wichtige Phänotypen unter Serotyp-2-Stämmen differenziert werden, die sich in ihren virulenten Eigenschaften unterschieden. Experimentelle Untersuchungen konzentrierten sich auf MRP+ EF+ Serotyp-2-Stämme, die sich durch eine hohe Virulenz auszeichnen. In Impfstoffversuchen konnte eine partielle Protektion von Ganzzellvakzinen gegenüber diesem Pathotypen nachgewiesen werden. Es war jedoch weder bekannt, wie diese Schutzwirkung zustande kommt, noch ob sich diese Wirkung auch auf andere Serotypen erstreckt.

In dieser Arbeit sollte vor allem das relativ enge Spektrum der experimentellen *S.-suis*-Forschung erweitert werden, um grundlegend neue Fragestellungen bearbeiten zu können. Für diese Zielsetzung wurden folgende Arbeitspunkte definiert:

- Differenzierung und Charakterisierung von *S.-suis*-Pathotypen in epidemiologischen Untersuchungen
- Etablierung von Infektionsmodellen für die beiden wichtigsten invasiven Pathotypen in Europa mit klinischen, pathohistologischen und bakteriologischen Analyse-Parametern
- Identifikation und Charakterisierung eines neuen Virulenzfaktors von *S. suis* unter besonderer Berücksichtigung der Erreger-Wirt-Interaktion
- Vergleich unterschiedlicher Immunisierungsstrategien mit einer qualitativen und quantitativen Analyse der humoralen Immunantwort in homologen und heterologen Belastungsversuchen

Leitfaden durch alle Arbeitspunkte waren bestimmte auf der Bakterienoberfläche lokalisierte oder sezernierte Faktoren von *S. suis*, die mit der Virulenz des Erregers

assoziiert sind. Aus diesem Arbeitsprogramm konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden:

Circa 40% der *S.-suis*-Erkrankungen in Norddeutschland werden durch zwei *S.-suis*-Genotypen hervorgerufen, *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* und *mrp** *epf-* *sly+* *cps9*. Diese Genotypen zeichnen sich nach AFLP-Analysen durch eine hohe Homogenität aus. In MLST-Untersuchungen konnte die Assoziation von *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* Stämmen mit dem klonalen ST1-Komplex bestätigt und die Assoziation von *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* mit dem ST87-Komplex erstmals postuliert werden. Vergleichende epidemiologische Untersuchungen zwischen der Haus- und Wildschwein-assoziierten *S.-suis*-Population legten nahe, dass beide Genotypen durch die Haltungsbedingungen (oder durch die genetischen Veränderungen) des Hausschweins selektioniert wurden. Die oben genannten invasiven Genotypen konnten zwar, mit einer Ausnahme, beim Wildschwein nicht nachgewiesen werden, es war aber eine hohe Prävalenz (10%) von *mrp+* *epf** *sly+* *cps2* Stämmen festzustellen. Diese Stämme mussten als humanpathogen eingestuft werden, da sie nach den Ergebnissen umfangreicher Genotypisierungen identisch bzw. sehr ähnlich waren zu einem *Liquor-cerebrospinalis*-Isolat eines erkrankten Jägers.

S.-suis-Stämme des Genotyps *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* exprimierten einen Oberflächen-assoziierten Serumtrübungsfaktor (*opacity factor of S. suis*, OFS) mit Homologie zum *serum opacity factor* von *S. pyogenes*. Die Serumtrübungsfunktion wurde durch die N-terminale Domäne von OFS vermittelt. Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse zeigten weiterhin Fibrinogenbindung von OFS auf und sprachen für eine Schlüsselfunktion von OFS im Schutz vor Opsonophagozytose. Eine isogene *ofs*-Mutante war stark attenuiert in ihren virulenten Eigenschaften im Schwein, aber noch in der Lage den oberen Respirationstrakt zu besiedeln.

Intranasale experimentelle Infektionen von Läufer Schweinen mit dem *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* Referenzstamm (A3286/94) führten im Gegensatz zu *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* Infektionen nur zu subklinischen Veränderungen. Durch intravenöse Applikation konnte aber für einen Serotyp-9-Stamm (A3286/94) erstmals ein Infektionsmodell etabliert werden, in dem Morbidität, Mortalität und typische pathohistologische Veränderungen reproduziert werden konnten.

Alle drei getesteten Immunisierungsstrategien (Subunitvakzine aus Oberflächenproteinen, Ganzzellvakzine und Lebendvakzine) induzierten eine deutliche Serokonversion gegenüber dem Oberflächenprotein MRP. Die Bildung von

MRP-spezifischen Antikörpern korrelierte nicht mit einer protektiven Wirkung, da weder die Subunitvakzine noch die Lebendvakzine einen signifikanten Schutz hervorriefen. Durch die Differenzierung der IgG-Isotypen (IgG1 und IgG2) konnten die unterschiedlichen Schutzwirkungen nicht erklärt werden. Weiterhin wurden durch die intranasale Applikation der Lebendvakzine Suilysin neutralisierende IgG-Antikörpertiter induziert, die nicht zu einer signifikanten Protektion führten. Der einzige Analyse-Parameter, mit dem sowohl die unterschiedliche protektive Wirkung der verschiedenen Immunisierungsstrategien erklärt werden konnte, als auch auf Einzeltierebene eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf beobachtet wurde, war der Titer opsonisierender Antikörper. Die durch die Applikation der Serotyp-2-Ganzzellvakzine induzierten opsonisierenden Antikörper führten zum Abtöten des homologen Serotyp-2-, aber nicht des heterologen Serotyp-9-Stammes. Interessanter Weise waren diese opsonisierenden Antikörper aber nicht gegen die Kapsel gerichtet.

Diese Arbeit hat durch die Identifikation und Charakterisierung eines invasiven Pathotypen (*mrp* epf- sly+ cps9*), eines neuen Virulenzfaktors (OFS) und eines prognostischen Indikators (Titer opsonisierender Antikörper) zum Fortschritt in der *S.-suis*-Forschung zur Epidemiologie, Pathogenese und Immunprophylaxe beigetragen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion von OFS in der *S.-suis*-Pathogenese besser zu verstehen. Das Ziel einen serotypübergreifenden Impfstoff zu entwickeln wurde zwar noch nicht erreicht. Mit der Etablierung von Infektionsmodellen und Evaluierungen von Analyse-Parametern wurden jedoch gute Voraussetzungen geschaffen, dieses Problem mittelfristig zu lösen.

F Summary

S. suis is one of the most important bacterial porcine pathogens. Furthermore, *S. suis* has obtained increasing relevance as a zoonotic agent in human medicine, especially in Asia. Meningitis, septicaemia, arthritis, serositis and bronchopneumoniae are common manifestations in swine. *S. suis* infections in humans result typically in meningitis, septicaemia or endocarditis. Inapparent carrier animals play an important role in the epidemiology of *S. suis* diseases. This pathogen is characterized by a great diversity, as exemplified by the presence of 33 different serotypes. At the beginning of this work, the capsule was the only known virulence factor of *S. suis*. Through detection of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) it was already possible to differentiate between three important phenotypes of serotype 2 strains, which possess different virulence potential. Experimental investigations concentrated on highly virulent MRP⁺ EF⁺ serotype 2 strains. Immunization trials demonstrated that partial protection against this pathotype might be induced by bacterins. However, neither the mechanism of protection was known, nor if protection against other serotypes was also elicited.

An important objective of this work was to broaden the relatively narrow area of experimental *S. suis* research, in order to work on different problems and new objectives. For this a number of specific milestones were defined:

- Differentiation and characterization of *S.-suis*-pathotypes in epidemiological investigations
- Establishing infection models for the two most important invasive pathotypes in Europe with clinical, pathohistological und bacteriological read out parameters
- Identification and characterization of a novel virulence factor of *S. suis* with specific consideration of host-pathogen interactions
- Comparison of different immunization strategies with qualitative and quantitative analysis of the humoral immune response in homologous and heterologous challenge experiments

Guidelines throughout the different milestones were specific surface and secreted factors of *S. suis*, which are associated with the virulence of this pathogen. The followings results were obtained:

Approximately 40% of *S. suis* diseases in Northern Germany were caused by two *S. suis* genotypes, namely *mrp⁺ epf⁺ sly⁺ cps2* and *mrp^{*} epf⁻ sly⁺ cps9*. Isolates of

these genotypes were found to share a high degree of similarity in AFLP analysis. In MLST investigations, an association of *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* strains with the clonal ST1-complex was confirmed and association of *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* strains with the ST87-complex was postulated for the first time. Comparative epidemiological investigations of *S. suis* populations associated with domesticated pigs and wild boars suggested that both genotypes were selected through the housing and raising conditions of domesticated piglets (or through their different genetics). Whereas the above mentioned invasive genotypes were, with one exception, not detectable in wild boars, a high prevalence (10%) of *mrp+* *epf** *sly+* *cps2* strains was registered. These strains had to be considered as pathogenic for humans, because comprehensive genotyping revealed that they were identical or very similar to a cerebrospinal fluid isolate from an infected hunter.

S. suis strains of the *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* genotype expressed a surface-associated serum opacity factor (OFS, opacity factor of *S. suis*) with homology to serum opacity factor (SOF) of *S. pyogenes*. The N-terminal domain of OFS encoded this function. Furthermore, unpublished results demonstrated fibrinogen binding of OFS and a key function in protection against opsonophagocytosis. An isogenic *ofs* mutant was severely attenuated in virulence in swine, but still capable of colonizing the upper respiratory tract.

In contrast to *mrp+* *epf+* *sly+* *cps2* infections, intranasal experimental infections of growers with the *mrp** *epf-* *sly+* *cps9* reference strain (A3286/94) resulted only in subclinical changes. Through intravenous application of the serotype 9 strain A3286/94 it was however possible to establish for the first time an infection model, in which morbidity, mortality and typical pathohistological lesions were reproducible.

All three tested immunization strategies (subunit vaccine consisting of surface-associated proteins, bacterin and live vaccine) induced prominent humoral immune responses. However, induction of MRP-specific antibodies did not correlate with protection as the subunit and live vaccine did not elicit a significant protection. Differentiation of IgG1 and IgG2 isotypes did not allow explanation of differences in protection. Furthermore, intranasal application of the live vaccine induced suilysin neutralising IgG antibodies, which did not result in protection. The only read out parameter which explained differences in protective efficacies of the three immunization strategies was the titer of opsonizing antibodies. Furthermore, this parameter correlated well with the time that animals were free of disease after

infection. Opsonizing antibodies elicited by the serotype 2 bacterin induced killing of the homologous serotype 2 strain but not the heterologous serotype 9 strain. Interestingly, these opsonizing antibodies were not directed against the capsule.

This work contributed to research on epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis of *S. suis* by identification and characterization of an invasive pathotype (*mrp* epf- sly+ cps9*), a new virulence factor (OFS) and a prognostic indicator (titer of opsonizing antibodies). Further investigations are necessary to better understand the function of OFS in the pathogenesis of *S. suis*. The objective to develop a cross protective vaccine was not yet achieved. However, development of animal models and evaluation of read out parameters can be considered an excellent basis to solve this problem in the near future.

G Literaturverzeichnis

Al Dahouk, S., Nockler, K., Tomaso, H., Splettstoesser, W. D., Jungersen, G., Riber, U., Petry, T., Hoffmann, D., Scholz, H. C., Hensel, A., und Neubauer, H. (2005). Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *J.Vet.Med.B Infect. Dis. Vet. Public Health* **52**, 444-455.

Andresen, L. O. und Tegtmeyer, C. (2001). Passive immunization of pigs against experimental infection with *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.* **81**, 331-344.

Bartova, E., Sedlak, K., und Literak, I. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* **142**, 150-153.

Baums, C. G., Kaim, U., Fulde, M., Ramachandran, G., Goethe, R., und Valentin-Weigand, P. (2006). Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect.Immun.* **74**, 6154-6162.

Baums, C. G., Kock, C., Beineke, A., Bennecke, K., Goethe, R., Schröder, C., Waldmann, K. H., und Valentin-Weigand, P. (2009). *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 200-208.

Baums, C. G. und Valentin-Weigand, P. (2009). Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Anim. Health Res. Rev.* **10**, 65-83.

Baums, C. G., Verkühlen, G. J., Rehm, T., Silva, L. M., Beyerbach, M., Pohlmeier, K., und Valentin-Weigand, P. (2007). Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 711-717.

Beineke, A., Bennecke, K., Neis, C., Schröder, C., Waldmann, K. H., Baumgärtner, W., Valentin-Weigand, P., und Baums, C. G. (2008). Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet. Microbiol.* **128**, 423-430.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., und Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535.

Butler, J. E., Wertz, N., Deschacht, N., und Kacs Kovics, I. (2009). Porcine IgG: structure, genetics, and evolution. *Immunogenetics* **61**, 209-230.

Chabot-Roy, G., Willson, P., Segura, M., Lacouture, S., und Gottschalk, M. (2006). Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. *Microb. Pathog.* **41**, 21-32.

Courtney, H. S., Hasty, D. L., Li, Y., Chiang, H. C., Thacker, J. L., und Dale, J. B. (1999). Serum opacity factor is a major fibronectin-binding protein and a virulence determinant of M type 2 *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **32**, 89-98.

Daniel, C., Sebbane, F., Poiret, S., Goudercourt, D., Dewulf, J., Mullet, C., Simonet, M., und Pot, B. (2009). Protection against *Yersinia pseudotuberculosis* infection conferred by a *Lactococcus lactis* mucosal delivery vector secreting LcrV. *Vaccine* **27**, 1141-1144.

Faucher, S. P., Porwollik, S., Dozois, C. M., McClelland, M., und Daigle, F. (2006). Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1906-1911.

Feng, Y., Zheng, F., Pan, X., Sun, W., Wang, C., Dong, Y., Ju, A. P., Ge, J., Liu, D., Liu, C., Yan, J., Tang, J., und Gao, G. F. (2007). Existence and characterization of allelic variants of Sao, a newly identified surface protein from *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **275**, 80-88.

Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Dominguez-Punaro, Mde L., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M., und Gottschalk, M. (2008). D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* **76**, 3587-3594.

Fontaine, M. C., Perez-Casal, J., und Willson, P. J. (2004). Investigation of a novel DNase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.* **72**, 774-781.

- Garcia-Sanchez, R. N., Nogal-Ruiz, J. J., Manzano-Lorenzo, R., Diaz, J. M., Lopez, G. P., Ruano, F. J., Casas, A. R., Bascon, C. C., Bolas-Fernandez, F., und Martinez-Fernandez, A. R. (2009). Trichinellosis survey in the wild boar from the Toledo mountains in south-western Spain (2007-2008): molecular characterization of *Trichinella* isolates by ISSR-PCR. *J. Helminthol.* **83**, 117-120.
- Gauss, C. B., Dubey, J. P., Vidal, D., Ruiz, F., Vicente, J., Marco, I., Lavin, S., Gortazar, C., und Almeria, S. (2005). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet. Parasitol.* **131**, 151-156.
- Gillard, B. K., Courtney, H. S., Massey, J. B., und Pownall, H. J. (2007). Serum opacity factor unmasks human plasma high-density lipoprotein instability via selective delipidation and apolipoprotein A-I desorption. *Biochemistry* **46**, 12968-12978.
- Han, M., Gillard, B. K., Courtney, H. S., Ward, K., Rosales, C., Khant, H., Ludtke, S. J., und Pownall, H. J. (2009). Disruption of human plasma high-density lipoproteins by streptococcal serum opacity factor requires labile apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **48**, 1481-1487.
- Hurnikova, Z. und Dubinsky, P. (2009). Long-term survey on *Trichinella* prevalence in wildlife of Slovakia. *Vet. Parasitol.* **159**, 276-280.
- Jansen, A., Luge, E., Guerra, B., Wittschen, P., Gruber, A. D., Loddenkemper, C., Schneider, T., Lierz, M., Ehlert, D., Appel, B., Stark, K., und Nockler, K. (2007). Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 739-742.
- Jansen, A., Nockler, K., Schonberg, A., Luge, E., Ehlert, D., und Schneider, T. (2006). Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 544-546.
- Jansen, A., Schoneberg, I., Stark, K., und Nockler, K. (2008). Epidemiology of trichinellosis in Germany, 1996-2006. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **8**, 189-196.
- King, S. J., Leigh, J. A., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., und Whatmore, A. M. (2002). Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: Identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3671-3680.

Kock, C. (2009). Vergleich verschiedener Immunisierungsstrategien gegen *Streptococcus suis* beim Schwein: Zusammenhang zwischen humoraler Immunantwort und Protektion. Dissertation. Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland.

Kock, C., Beineke, A., Seitz, M., Ganter, M., Waldmann, K. H., Valentin-Weigand, P., und Baums, C. G. (2009). Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic of mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **132**: 135-145.

Larocque, R. C., Harris, J. B., Dziejman, M., Li, X., Khan, A. I., Faruque, A. S., Faruque, S. M., Nair, G. B., Ryan, E. T., Qadri, F., Mekalanos, J. J., und Calderwood, S. B. (2005). Transcriptional profiling of *Vibrio cholerae* recovered directly from patient specimens during early and late stages of human infection. *Infect. Immun.* **73**, 4488-4493.

Li, Y., Martinez, G., Gottschalk, M., Lacouture, S., Willson, P., Dubreuil, J. D., Jacques, M., und Harel, J. (2006). Identification of a surface protein of *Streptococcus suis* and evaluation of its immunogenic and protective capacity in pigs. *Infect. Immun.* **74**, 305-312.

Lun, S. C., Perez-Casal, J., Connor, W., und Willson, P. J. (2003). Role of suilysin in pathogenesis of *Streptococcus suis* capsular serotype 2. *Microb. Pathog.* **34**, 27-37.

Mannam, P., Jones, K. F., und Geller, B. L. (2004). Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **72**, 3444-3450.

Molinari, G., Talay, S. R., Valentin-Weigand, P., Rohde, M., und Chhatwal, G. S. (1997). The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 1357-1363.

Nahm, M. N. und Romero-Steiner, S. (2008). Functional assays for pneumococcal antibody. In "Pneumococcal vaccines". Herausgeber: G. R. Siber, K. P. Klugman, and P. H. Mäkelä. ASM Press, Washington, U.S.A., 213-226.

Que, Y. A., Haefliger, J. A., Piroth, L., Francois, P., Widmer, E., Entenza, J. M., Sinha, B., Herrmann, M., Francioli, P., Vaudaux, P., und Moreillon, P. (2005). Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* **201**, 1627-1635.

Ramachandran, G. (2008). Functional characterization of OFS, a virulence factor of *Streptococcus suis*. PhD-These. Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland.

Rehm, T., Baums, C. G., Strommenger, B., Beyerbach, M., Valentin-Weigand, P., und Goethe, R. (2007). Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Med. Microbiol.* **56**, 102-109.

Roche, A. M., King, S. J., und Weiser, J. N. (2007). Live attenuated *Streptococcus pneumoniae* strains induce serotype-independent mucosal and systemic protection in mice. *Infect. Immun.* **75**, 2469-2475.

Schielke, A., Sachs, K., Lierz, M., Appel, B., Jansen, A., und Johne, R. (2009). Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virology* **6**, 58.

Shelburne, S. A., III, Keith, D., Horstmann, N., Sumby, P., Davenport, M. T., Graviss, E. A., Brennan, R. G., und Musser, J. M. (2008). A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1698-1703.

Silva, L. M., Baums, C. G., Rehm, T., Wisselink, H. J., Goethe, R., und Valentin-Weigand, P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* **115**, 117-127.

Smith, H. E., Vecht, U., Wisselink, H. J., Stockhofe-Zurwieden, N., Biermann, Y., und Smits, M. A. (1996). Mutants of *Streptococcus suis* types 1 and 2 impaired in expression of muramidase-released protein and extracellular protein induce disease in newborn germfree pigs. *Infect. Immun.* **64**, 4409-4412.

Sorensen, N. S., Tegtmeyer, C., Andresen, L. O., Pineiro, M., Toussaint, M. J., Campbell, F. M., Lampreave, F., und Heegaard, P. M. (2006). The porcine acute

phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **113**, 157-168.

Sumby, P., Barbian, K. D., Gardner, D. J., Whitney, A. R., Welty, D. M., Long, R. D., Bailey, J. R., Parnell, M. J., Hoe, N. P., Adams, G. G., Deleo, F. R., und Musser, J. M. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 1679-1684.

Swildens, B., Wisselink, H. J., Engel, B., Smith, H. E., Nielen, M., Verheijden, J. H., und Stegeman, J. A. (2005). Detection of extracellular factor-positive *Streptococcus suis* serotype 2 strains in tonsillar swabs of live sows by PCR. *Vet. Microbiol.* **109**, 223-228.

Takamatsu, D., Nishino, H., Ishiji, T., Ishii, J., Osaki, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., Tharavichitkul, P., Takai, S., und Sekizaki, T. (2009). Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. *Vet. Microbiol.* **138**, 132-139.

Takamatsu, D., Osaki, M., Tharavichitkul, P., Takai, S., und Sekizaki, T. (2008a). Allelic variation and prevalence of serum opacity factor among the *Streptococcus suis* population. *J. Med. Microbiol.* **57**, 488-494.

Takamatsu, D., Wongsawan, K., Osaki, M., Nishino, H., Ishiji, T., Tharavichitkul, P., Khantawa, B., Fongcom, A., Takai, S., und Sekizaki, T. (2008b). *Streptococcus suis* in humans, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 181-183.

Talay, S. R., Zock, A., Rohde, M., Molinari, G., Oggioni, M., Pozzi, G., Guzman, C. A., und Chhatwal, G. S. (2000). Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2**, 521-535.

Tan, C., Liu, M., Jin, M., Liu, J., Chen, Y., Wu, T., Fu, T., Bei, W., und Chen, H. (2008). The key virulence-associated genes of *Streptococcus suis* type 2 are upregulated and differentially expressed in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 108-114.

Timmer, A. M., Kristian, S. A., Datta, V., Jeng, A., Gillen, C. M., Walker, M. J., Beall, B., und Nizet, V. (2006). Serum opacity factor promotes group A streptococcal epithelial cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* **62**, 15-25.

Vasconcelos, D., Middleton, D. M., und Chirino-Trejo, J. M. (1994). Lesions caused by natural infection with *Streptococcus suis* type 9 in weaned pigs. *J. Vet. Diagn. Invest* **6**, 335-341.

Vecht, U., Wisselink, H. J., van Dijk, J. E., und Smith, H. E. (1992). Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.* **60**, 550-556.

Vilei, E. M., Schlatter, Y., Perreten, V., Straub, R., Popoff, M. R., Gibert, M., Grone, A., und Frey, J. (2005). Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine β 2-toxigenic *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1570-1581.

Wartha, F., Beiter, K., Albiger, B., Fernebro, J., Zychlinsky, A., Normark, S., und Henriques-Normark, B. (2007). Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cell. Microbiol.* **9**, 1162-1171.

Wei, Z., Li, R., Zhang, A., He, H., Hua, Y., Xia, J., Cai, X., Chen, H., und Jin, M. (2009). Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Vet. Microbiol.* **137**, 196-201.

Wichmann, O., Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., Jilg, W., und Stark, K. (2008). Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.* **198**, 1732-1741.

Williams, A. E. und Blakemore, W. F. (1990). Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2. *J. Infect. Dis.* **162**, 474-481.

Wisselink, H. J., Smith, H. E., Stockhofe-Zurwieden, N., Peperkamp, K., und Vecht, U. (2000). Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Vet. Microbiol.* **74**, 237-248.

Wu, Z., Zhang, W., und Lu, C. (2008). Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 52-59.

Zhang, A., Xie, C., Chen, H., und Jin, M. (2008). Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. *Proteomics.* **8**, 3506-3515.

Zhang, W. und Lu, C. P. (2007). Immunoproteomics of extracellular proteins of Chinese virulent strains of *Streptococcus suis* type 2. *Proteomics.* **7**, 4468-4476.

H Erklärung über den eigenen Anteil an den Publikationen

Silva, L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Vet. Microbiol.* 115: 117-127.

L. M. Silva und C. G. Baums trugen zu gleichen Anteilen zum Manuskript bei.

Konzept, Versuchsplanung:	Baums, Goethe, Valentin-Weigand
Experimentelle Durchführung:	Silva, Rehm, Baums
Diskussion, Beratung:	Baums, Valentin-Weigand, Goethe, Wisselink
Manuskript, Korrespondenz:	Baums

Baums, C. G., U. Kaim, M. Fulde, G. Ramachandran, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006): Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. *Infect .Immun.* 74: 6154-6162.

Konzept, Versuchsplanung:	Baums, Goethe, Valentin-Weigand
Experimentelle Durchführung:	Baums, Kaim, Fulde, Ramachandran
Diskussion, Beratung:	Baums, Valentin-Weigand, Goethe
Manuskript, Korrespondenz:	Baums

Baums, C. G., G. J. Verkühlen, T. Rehm, L. M. Silva, M. Beyerbach, K. Pohlmeier und P. Valentin-Weigand (2007): Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 711-717.

Konzept, Versuchsplanung:	Baums
Experimentelle Durchführung:	Verkühlen, Rehm, Baums, Silva
Diskussion, Beratung:	Baums, Valentin-Weigand, Beyerbach, Pohlmeier
Manuskript, Korrespondenz:	Baums

Rehm, T., C. G. Baums, B. Strommenger, M. Beyerbach, P. Valentin-Weigand und R. Goethe (2007): Amplified fragment length polymorphism of *Streptococcus suis* strains correlates with their profile of virulence-associated genes and clinical background. *J. Med. Microbiol.* 56, 102-109.

Konzept, Versuchsplanung: Goethe, Baums, Valentin-Weigand
 Experimentelle Durchführung: Rehm, Strommenger, Baums
 Diskussion, Beratung: Baums, Goethe, Valentin-Weigand,
 Beyerbach
 Manuskript, Korrespondenz: Baums

Neis, C., J. Rohde, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2007): Untersuchungen einer möglichen *Streptococcus suis*-Infektionskette in einer Schweineerzeugergemeinschaft mittels PCR-gestützter Genotypisierung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 120: 202-206

Konzept, Versuchsplanung: Baums, Valentin-Weigand
 Experimentelle Durchführung: Neis, Rehm, Baums
 Diskussion, Beratung: Baums, Valentin-Weigand
 Manuskript, Korrespondenz: Baums

Beineke, A., K. Bennecke, C. Neis, C. Schröder, K.-H. Waldmann, W. Baumgärtner, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2008): Comparative evaluation of virulence and pathology of *Streptococcus suis* serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers. *Vet. Microbiol.* 128: 423-430.

Konzept, Versuchsplanung: Baums, Beineke, Valentin-Weigand
 Experimentelle Durchführung: Bennecke, Beineke, Baums, Neis, Schröder
 Diskussion, Beratung: Baums, Beineke, Baumgärtner, Waldmann,
 Valentin-Weigand
 Manuskript, Korrespondenz: Baums, Beineke

Baums, C. G., C. Kock, A. Beineke, K. Bennecke, R. Goethe, C. Schröder, K.-H. Waldmann und P. Valentin-Weigand (2009): *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine induced immunogenicities and their protective efficacy against serotypes 2 and 9. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 200-208.

C. Kock und C. G. Baums trugen in gleichen Anteilen zum Manuskript bei.

Konzept, Versuchsplanung: Baums, Goethe, Valentin-Weigand,
Waldmann
Experimentelle Durchführung: Kock, Baums, Bennecke, Beineke
Diskussion, Beratung: Baums, Kock, Valentin-Weigand, Goethe,
Waldmann, Schröder
Manuskript, Korrespondenz: Baums, Kock

Kock, C., A. Beineke, M. Seitz, M. Ganter, K.-H. Waldmann, P. Valentin-Weigand und C. G. Baums (2009): Intranasal immunization with a live *Streptococcus suis* isogenic ofs mutant elicited suilysin-neutralization titers but failed to induce opsonizing antibodies and protection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132: 135-145

Konzept, Versuchsplanung: Baums, Valentin-Weigand, Waldmann, Kock
Experimentelle Durchführung: Kock, Baums, Beineke, Seitz, Ganter
Diskussion, Beratung: Baums, Kock, Valentin-Weigand, Waldmann
Manuskript, Korrespondenz: Kock, Baums

Baums, C. G. und P. Valentin-Weigand (2009): Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. *Animal Health Research Review.* 10: 65-83.

Konzept: Baums
Diskussion, Beratung: Baums, Valentin-Weigand
Manuskript, Korrespondenz: Baums

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Peter Valentin-Weigand für die uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit herzlich danken. Ich habe vor allem die Möglichkeit sehr geschätzt, meine eigenen Ideen umsetzen zu können und mich gleichzeitig auf sein Interesse, sein Engagement und seine Kenntnisse verlassen zu können. Neben der Schaffung zahlreicher Voraussetzungen möchte ich auch seinen Einsatz für die Gewinnung von Kooperationspartnern und sein Engagement für eine offene und angenehme Arbeitsatmosphäre herausstellen. Ich bin ihm außerdem sehr dankbar, dass er meine Weiterbildung „Professionelle Lehre“ und meine Elternzeit unterstützt hat.

Neben Herrn Prof. Valentin-Weigand hat vor allem Herr Prof. Ralph Goethe durch viele Diskussionen, seine technische Expertise und eine hervorragende Labororganisation zu meiner Arbeit beigetragen. Hierfür möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Am Institut für Mikrobiologie habe ich eine sehr angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre erlebt und bin allen Mitarbeitern dafür zu Dank verpflichtet. Alle beteiligten Doktoranden (Frau Luciana da Silva, Herr PhD Marcus Fulde, Herr Dr. Gerd-Josef Verkühlen, Herr PhD Girish Ramachandran, Frau Dr. Katharina Bennecke, Herr Dr. Christoph Kock und Frau Maren Seitz) und Praktikanten (u. a. Herr Dr. Thomas Rehm, Frau Dr. Christina Neis, Frau Kristin Laarmann und Herr Andreas Mietze) haben sich dankenswerter Weise sehr für ihre Arbeit engagiert. Weiterhin möchte ich Sabine Göbel für die technische Unterstützung, eine vorbildliche Laborlogistik und eine angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Weiterhin bin ich noch PhD Laurentiu Benga für seine Hilfe sehr verbunden. Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Sekretariates (Frau Martina Paul und Frau Sabine Baumert), der Nährbodenküche (Herrn Jörg Henstorf und Frau Claudia Otto) und der Spülküche (Herrn Arno Krüger und Herrn Antonio Eramo) sei Dank für Ihre Unterstützung. Werner Scharnhorst danke ich für seine wertvolle Hilfe im Stall. Das diagnostische Labor, insbesondere Herr Prof. Gunter Amtsberg, Frau Dr. Jutta Verspohl, Frau Dr. Judith Rohde und Herr Dr. Alexander Maas, haben dankenswerter Weise zahlreiche *S.-suis*-Isolate für die epidemiologischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Herr Jörg Merkel stand bei vielen technischen Problemen mit Rat und Tat an meiner Seite. Ich danke ihm auch für zahlreiche Formatierungsarbeiten

und vor allem seine Geduld. Meine Arbeit am Institut für Mikrobiologie wurde glücklicherweise wesentlich inspiriert durch das unermüdliche Engagement von Herrn Prof. Gerald Gerlach und seiner intensiven Auseinandersetzung mit dem Fach. Unter den Mikrobiologen gilt mein besonderer Dank auch Herrn Prof. Gunter Amtsberg, der mein Interesse an der veterinärmedizinischen Mikrobiologie nachhaltig geweckt und gefördert hat.

Für die Umsetzung meiner Projekte waren Kooperationen mit anderen Instituten bzw. Kliniken der TiHo sehr wichtig. Ich möchte allen beteiligten Kooperationspartnern für die konstruktive Zusammenarbeit sehr danken, insbesondere auch Herrn Prof. Karl-Heinz Waldmann (Klinik für kleine Klautiere und forensische Medizin und Ambulatorische Klinik), Herrn Prof. Wolfgang Baumgärtner und Herrn Prof. Andreas Beineke (Institut für Pathologie), Herrn Dr. Martin Beyerbach (Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung) und Herrn Prof. Klaus Pohlmeier (Institut für Wildtierforschung).

In der Klinik für kleine Klautiere haben meine zahlreichen Anliegen bei allen Mitarbeitern stets Unterstützung erfahren. Ich möchte vor allem Frau PD Isabel Hennig-Pauka, Frau Dr. Kerstin Thies, Frau Dr. Charlotte Schröder und Herrn Klaus Schlotter für die Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der Infektionsversuche danken. Herrn Prof. Martin Ganter und den Mitarbeiterinnen seines Labors sei Dank für die Erstellung zahlreicher Blutbilder.

Herrn Prof. Andreas Beineke danke ich für die histologischen Untersuchungen von mehr als 500 Gewebeproben, für hervorragende Auswertungen, lehrreiche Diskussionen und eine angenehme Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich Frau Dr. Ute Kaim, Frau Julia Schirrmeier und Frau Kerstin Rohn vom Institut für Pathologie für ihre Unterstützung herzlich danken.

Frau Dr. Sandra Blome, Herrn Günter Thiem und Frau Monika Berg vom Institut für Virologie danke ich für die Mithilfe bei den Infektionsversuchen unter S2 Bedingungen.

Die IVD GmbH, insbesondere Herr Dr. Sebastian Fischer, gab mir dankenswerter Weise wertvolle Ratschläge zu *S.-suis*-Immunisierungen.

Zahlreichen externen Wissenschaftlern sei Dank für wichtige Stämme und Materialien, insbesondere Frau PhD Hilde Smith und Frau PhD Astrid de Greef (beide *Central Veterinary Institute of Wageningen*, Lelystadt, Niederlande), Herrn Dr. Bernd Kreikemeyer (Universität Rostock), Herrn Prof. Dieter Reinscheid

(Fachhochschule Bonn-Rhein-Sieg), Herrn PhD Daisuke Takamatsu und Herrn PhD Tsutomu Sekizaki (beide *National Institute of Animal Health*, Ibaraki, Japan).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 587), dem Impfstoffwerk Dessau-Tornau Biologika GmbH, der Akademie für Tiergesundheit e. V. und dem Land Niedersachsen (Mittel der Jagdabgabe) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre Liebe und ihr Vertrauen. Schließlich bin ich meiner Frau Cordula dankbar für das Korrekturlesen, wertvolle Diskussionen und vor allem für ihre starke Liebe.