

## Das intestinale Immunsystem des Schweines - mögliche Einflussebenen von Probiotika

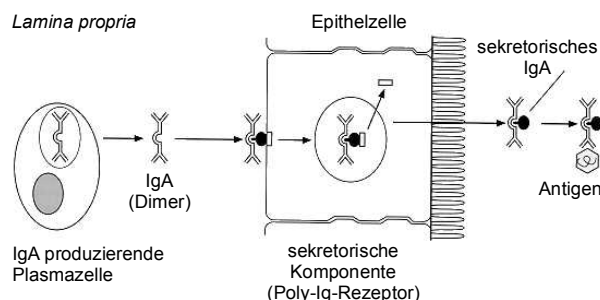
Dr. Lydia Scharek, Dr. Karsten Tedin, Jana Guth und Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt (Berlin)

### Aufbau und Funktion des intestinalen Immunsystems

Neben seiner Funktion als Verdauungsorgan erfüllt der Darm wichtige Aufgaben im Bereich der Immunabwehr. Die Schleimhaut des Intestinaltraktes beherbergt den größten Anteil des Lymphozytenarsenals. Kein anderes Immunorgan des Körpers ist in der Lage, eine ähnlich große Menge an Antikörpern zu bilden. Das Immunsystem des Intestinaltraktes, das so genannte „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) ist ein phylogenetisch früh entstandenes Abwehrsystem des Körpers. Es besitzt funktionelle Unabhängigkeit von der erst in höheren Wirbeltieren auftretenden systemischen Blutabwehr. Der weitaus überwiegende Teil (60-70 %) der insgesamt vom Körper gebildeten Antikörper wird täglich über die Darmschleimhaut sezerniert und mit den Fäzes ausgeschieden (BRANDTZAEG, 1989).

Wie beim Menschen ist das wichtigste Immunglobulin, das in Schleimhäuten gebildet wird, das so genannte Immunglobulin A (IgA). Es wird als Dimer von den Plasmazellen der *Lamina propria* berwiegend im Duodenum produziert und bindet an die so genannte sekretorische Komponente (Poly-Ig-Rezeptor) auf der basolateralen Seite der Epithelzellen. Gemeinsam mit der sekretorischen Komponente wird es internalisiert und auf der luminalen Seite mit dem größten Teil der sekretorischen Komponente abgegeben. Auch Antikörper, die schon einen Komplex mit einem Antigen eingegangen sind, können aktiv ins Lumen transportiert werden, wodurch das Gewebe von eingedrungenen Antigenen befreit wird (Abb. 1). Das sekretorische IgA ist mehr als andere Antikörperklassen vor dem Abbau durch Proteasen geschützt (MARCOTTE und LAVOIE, 1998).

**Abbildung 1: Sekretion von IgA**



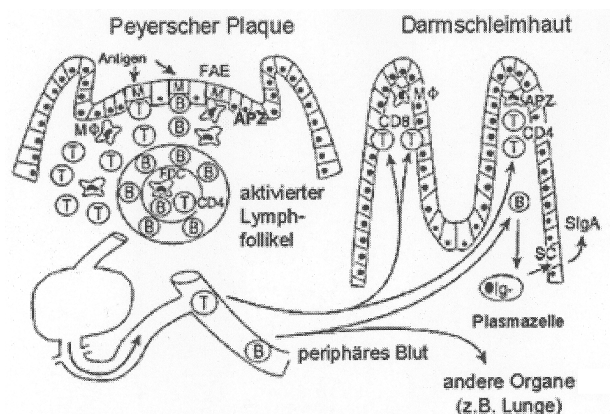
Das Immunsystem des Darms umfasst jedoch noch andere funktionelle Komponenten als die Plasmazellen der *Lamina propria*, in der die IgA-Produktion bewerkstelligt wird. Einen wichtigen Bestandteil stellen die so genannten Peyerschen Plaques dar, bei denen es sich um Lymphaggregatate in der Darmschleimhaut handelt, deren Funktion hauptsächlich in der Antigenerkennung und Lymphozyten-Aktivierung besteht. Weiterhin sind zahlreiche Lymphozyten direkt in der Epithelschicht des Darms angesiedelt (intraepitheliale Lymphozyten) und erfüllen hier ihre Abwehrfunktion in vorderster Front (Abb. 2).

### Besonderheiten des Immunsystems bei Schweinen

Das Immunsystem des Ferkels ist in den ersten Lebenswochen noch nicht so weit ausgebildet, dass es auf eine Infektion mit der Bildung von Antikörpern reagieren könnte. Im Unterschied zum Menschen wird der porcine Embryo unter der Ausbildung einer *Placenta epitheliochorialis* entwickelt. Das heißt, dass die Plazenta der Sau für Antikörper nicht durchlässig ist und sie während der Trächtigkeit keine Immunglobuline an den Embryo weitergibt. In den ersten 24 bis 48 Stunden nach der Geburt nimmt das Ferkel Antikörper über das Kolostrum auf. Diese überwinden die Darmschleimhaut des Ferkels und treten in dessen Blutkreislauf ein. In den Tagen und Wochen danach werden keine maternalen Antikörper mehr resorbiert. Das in der Sauenmilch enthaltene IgA verbleibt im Darmlumen des Ferkels und trägt hier zur Immunexklusion bei.

Laktoferrin und Transferrin sind ebenfalls in der Milch enthalten und haben eine antibakterielle Wirkung. Die Muttermilch inhibiert das Wachstum von *E. coli*, vermindert die Adhäsion von Bakterien an die Enterozyten und neutralisiert Toxine. In den ersten zwei Wochen ist das Ferkel stark von den maternalen Antikörpern abhängig. Erst etwa mit dem zehnten Lebenstag beginnt das Ferkel selbst mit der Produktion von Antikörpern, und erst mit Abschluss der dritten Lebenswoche werden effektive Mengen in den Darm sezerniert (ALLEN und PORTER, 1979).

**Abbildung 2: Aufbau des intestinalen Immunsystems**



Die erste Barriere des Immunsystems, die eindringende Erreger bei einer Infektion überwinden müssen, stellt das Darmepithel dar. Zwischen den Epithelzellen befinden sich die so genannten intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Fast 30 % der epithelialen Zellen sind Lymphozyten (STOKES et al., 1994). Beim erwachsenen Schwein sind die weitaus meisten von ihnen T-Zellen (CD8+ Zellen, 77 %;  $\gamma\delta$ -T-Zellen, 9 %) und Natürliche Killer-Zellen. Die CD8+ Zellen sind große Lymphozyten, die reich an Perforin und Lysozym-Granula sind und somit für die Lyse von Zielzellen ausgerüstet sind. Die Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bisher noch rätselhaft. Einer Hypothese zufolge sind sie für die Entwicklung von oralen Toleranzen wichtig, anderen Ver-

mutungen nach dienen sie der Abwehr von infizierten Wirtszellen und der Identifizierung von mikrobiellen Antigenen (HAAS et al., 1993).

Die dritte Komponente des intestinalen Abwehrsystems stellen die Peyerschen Plaques (PP) dar. Hierbei handelt es sich um massenhafte Ansammlungen von Immunzellen. Diese Lymphagregate liegen in der *Lamina propria* verteilt. Es befinden sich ca. 15 bis 30 separate PPs im Dünndarm des Schweins, die jeweils eine Größe von 1 bis 10 cm haben. Zusätzlich findet man beim Ferkel einen ilealen PP, der sich vom Ileum bis ins Jejunum erstreckt und eine Länge von über 1,5 m einnehmen kann. In der Epithelschicht, die den PPs aufliegt, dem so genannten follikelassoziierten Epithel (FAE), befinden sich zahlreiche so genannte M-(membran)Zellen. Diese speziellen Epithelzellen haben keine Mikrovilli, pinozytieren sehr aktiv und transportieren Makromoleküle vom intestinalen Lumen in den Bereich des PP.

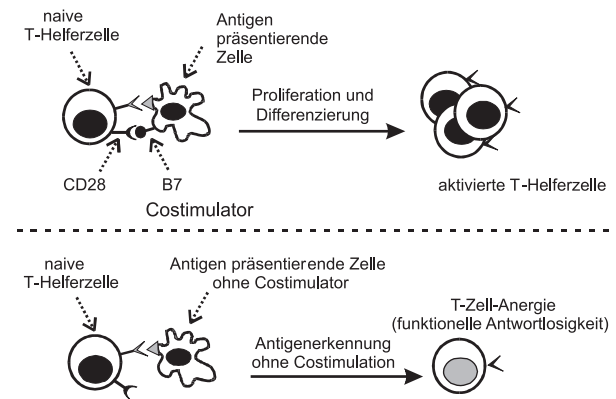
Im Inneren der Peyerschen Plaques befinden sich hauptsächlich B-Zellen (CD21+; ca. 80 %), Antigen präsentierende Zellen (APZ), cytotoxische und Suppressor-Zellen (CD8+) und Helfer T-Zellen (CD4+). Es sind folglich alle Zelltypen vorhanden, die für das Zustandekommen einer Immunreaktion notwendig sind. Lymphozyten, die hier ihren ersten Antigenkontakt haben, werden aktiviert und wandern von hier in die Lymphgefäße und anschließend in die Blutbahn aus. Von hier wandern sie durch einen Vorgang, der sich Homing nennt, in ihre Zielregionen ein, an denen sie ihre Effektorfunktionen ausüben (Antikörperproduktion, Zytokinbildung).

Lymphozyten, die in den Peyerschen Plaques aktiviert wurden, finden sich hauptsächlich in der *Lamina propria* der Dünndarmschleimhaut wieder. Sie wandern aber auch in andere Organe ein, z. B. in die Bronchien und in die laktierende Milchdrüse, und schützen Schleimhautregionen, die weit entfernt von ihrem Aktivierungsort liegen. In der Milchdrüse wiederum sind sie für die Produktion von Antikörpern zuständig, die auf das Ferkel übertragen werden. So erhalten die Ferkel durch die Milch Antikörper gegen intestinal relevante Erreger.

Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Immunsystems stellt die angeborene Immunität dar. Im peripheren Blut des neugeborenen Ferkels sind 60 % der Leukozyten neutrophile Granulozyten und nur 38 % sind Lymphozyten. Um den zehnten Lebenstag des Ferkels kehrt sich dieses Verhältnis um. Überwinden Erreger die Darmschranke, so wandern die neutrophilen Granulozyten in die Darmschleimhaut ein, um sie mittels Phagozytose zu beseitigen. Die eigentlichen Darmmakrophagen, die sich schon vor einer Infektion in der Domregion der Peyerschen Plaques befinden, unterscheiden sich von den Monozyten des Blutes beträchtlich. So haben sie z. B. keine LPS-Rezeptoren, exprimieren wenig Costimulatoren und üben keinen oxidativen Burst aus. Sie sind aber zur Phagozytose von Partikeln fähig. Präsentieren sie den T-Zellen prozessierte Antigene, ohne gleichzeitig Costimulatoren zu exprimieren, so werden diese T-Zellen nicht stimuliert. Sie werden im Gegenteil unfähig, jemals wieder auf das gleiche Antigen zu reagieren, auch wenn das Antigen später gemeinsam mit Costimulatoren auf Makrophagen präsentiert wird. Diesen Zustand nennt man Anergie (Abb.3).

Tatsächlich lösen die meisten der vom Darm resorbierten Antigene keine spezifische Immunantwort aus. Das heißt, gegen die meisten oral aufgenommenen Antigene werden keine Antikörper gebildet, sondern sie werden vom

**Abbildung 3: T-Zell-Aktivierung (oben) und T-Zell-Anergie (unten)**



Immunsystem des Darms toleriert. Das ist wichtig, damit Abwehrreaktionen gegen Nahrungsmittel unterbleiben. Pathogene Bakterien allerdings werden vom intestinalen Immunsystem bekämpft. Es ist bisher nicht geklärt, wie die Immunzellen des Darms entscheiden, gegen welche Antigene eine Immunreaktion eingeleitet werden soll und welche als unschädlich zu betrachten sind und toleriert werden sollen. Vermutlich spielen die Darmmakrophagen bei der Identifizierung der Antigene eine Schlüsselrolle.

**Grundlagen für den Einsatz von Probiotika**

Es wurde aber bereits in den frühen 80er Jahren bewiesen, dass die Fähigkeit zur Ausbildung von oralen Toleranzen und zur Modulation des Immunsystems durch die Besiedlung des Darms mit kommensalischen Mikroorganismen beeinflusst wird. Die Kommensalen unterstützen jedoch nicht nur die Toleranzentwicklung und dämpfen somit das Immunsystem. Es gibt zahlreiche Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, in denen nachgewiesen wurde, dass bestimmte Mikroorganismen auch immunstimulatorische Eigenschaften besitzen. So konnte z. B. *in vitro* die Zytokinproduktion von Makrophagen durch Bifidobakterien stimuliert werden (MARIN et al., 1997). Nach Fütterung von *Lactobacillus casei* an Ratten konnte eine gesteigerte Enzymproduktion von Makrophagen beobachtet werden (PERDIGON et al., 1986). *Bifidobacterium longum* und einige andere Milchsäurebildner führten nach oraler Verabreichung an Mäuse zu einem Anstieg des Gesamt-IgA im Darm (TAKAHASHI et al., 1998; VITINI et al., 2000), *Lactobacillus casei* zeigte Immunadjuvans-Effekte (PERDIGON et al., 1991), und in einer weiteren Studie erhöhte die Gabe von *Lactobacillus plantarum* in Mäusen die Antikörper-Produktion gegen *Escherichia coli*.

Bei der Aufzucht von Nahrungsmittel liefernden Tieren, versucht man möglichst auf die Verwendung von Antibiotika als Futtermittelzusatz zu verzichten. Antibiotika stehen in der Kritik, zur Entstehung von bakteriellen Resistenzen beizutragen. Nach EU-Regularien wird der Einsatz von Antibiotika als Futterzusatzstoff ab Januar 2006 verboten sein. Deswegen wird auch bei der Aufzucht von Schweinen nach Alternativen gesucht, um Krankheitserreger zurückzudrängen und die Tiergesundheit zu verbessern, ohne Antibiotika einzusetzen. Seit einigen Jahren wird verstärkt untersucht, welches Potenzial probiotische Hefen und Bakterien haben, die Ferkelgesundheit positiv zu beeinflussen.

Die höchste Mortalität bei der Ferkelaufzucht ist in der Zeit vor dem Absetzen und wenige Tage danach zu verzeichnen (Tab. 1). Circa 20 % der Ferkel sterben in diesen vier bis sechs Wochen. Die Hälfte dieser Ferkel stirbt an Durchfallerkrankungen, die hauptsächlich durch *Escherichia coli* und Transmissible Gastroenteritis-Viren verursacht werden (HOEFLING, 1989). In der anschließenden Mastphase sterben weitaus weniger Schweine. Aber auch hier stellen Durchfallerkrankungen ein Problem dar, das zu wirtschaftlichen Verlusten führt. In ungefähr 80 % dieser Fälle kann *E. coli* als Erreger identifiziert werden (FAHY et al., 1987). Um pathogene Keime aus dem Darm zu verdrängen, können Probiotika eingesetzt werden. Sie konkurrieren mit den übrigen Mikroorganismen im Darm um Nährstoffe und Bindungsstellen am Darmepithel (STYRIAK und NEMCOVA, 2003). Einige von ihnen verändern das Darmmilieu dahingehend, dass Pathogene schlechtere Vermehrungschancen haben (PATTERSON und BUKHOLDER, 2003).

**Tabelle 1: Erreger von Durchfallerkrankungen beim Schwein**

Erreger	Prozentanteil bei Durchfallerkrankungen
<i>Escherichia coli</i>	26 %
Transmissibles Gastroenteritis-Virus	26 %
Clostridien	18 %
Coccidien	14 %
Rotaviren	8 %
unbekannt	8 %

JONSSON und CONWAY (1992)

### Untersuchungen mit *Enterococcus faecium*

Um Einflüsse von Probiotika auf den Organismus von Schweinen zu untersuchen, haben wir im Rahmen einer von der DFG geförderten Forschergruppe (FOR438) eine Versuchsstudie durchgeführt, in der trächtige Sauen sowie deren Ferkel mit *Enterococcus faecium* SF 68 supplementiert wurden. Am 14., 28., 35. und 56. Tag nach der Geburt wurden Ferkel aus den Versuchsgruppen sowie aus unbehandelten Kontroll-Würfen getötet, um Blut, Organe (Milz, Magen, Darm) und Darminhalt zu gewinnen. An dem Probenmaterial wurden anatomische sowie physiologische, mikrobiologische und immunologische Parameter untersucht. Antikörpermengen wurden im Serum und in den Fäzes der Sauen und Ferkel bestimmt. Immunzellen wurden aus dem Darmepithel (proximales Jejunum) und aus dem kontinuierlichen ilealen Peyerschen Plaque gewonnen und unter Benutzung von Percoll-Gradienten (SOLANO-AGUILAR et al., 2000) aufgereinigt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenantigene behandelt und anschließend im Durchflusssytometer gemessen.

Bezüglich der Mengen an IgG respektive sIgA konnten keine Unterschiede in den Serum- und Kotproben der Sauen festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die probiotisch behandelten Ferkel nach dem Absetzen (28. Tag post partum) tendenziell niedrigere Werte an Serum-IgG aufwiesen als die Kontroll-Gruppe. Die Mengen an Fäzes-Antikörpern unterschieden sich bis zum 56. Lebenstag der Ferkel nicht. Erst am 70. Lebenstag zeigten die Probiotika-Ferkel niedrigere Werte an sIgA in den Fäzes. Weiterhin wiesen die probiotisch behandelten Ferkel während der ersten 8 Lebenswochen weniger CD8+ Zel-

len im Jejunum-Epithel auf als die Tiere der Kontrollgruppe. In den Peyerschen Plaques der Tiere konnten keine Unterschiede an CD4+ und CD8+ Zellen festgestellt werden. Gleichzeitig war das Vorkommen an pathogenen Bakterien wie *E. coli* O141 und *Chlamydia spp.* in den probiotisch behandelten Tieren vermindert.

Die Probiotika-Verabreichung hat offenbar keinen messbaren Einfluss auf die Gesamt-IgG- oder Gesamt-IgA-Produktion der Muttertiere. Es kann daher angenommen werden, dass der Einfluss der Probiotika auf die IgA-Produktion der Ferkel erst sichtbar wird, wenn der Anteil an maternalen Antikörpern abgenommen hat und die ferkel-eigene IgA-Produktion in Gang gekommen ist. Dies ist erst nach der dem Absetzen (28. Tag p.p.) zu erwarten. Am 70. Tag produzieren die Probiotika-Ferkel weniger sIgA. Da diese Ferkelgruppe offenbar auch weniger mit pathogenen Mikroorganismen belastet ist, könnte es sich bei der schwächeren Immunreaktion um eine sekundäre Reaktion auf die veränderte Darmbesiedlung zu handeln. In gleicher Weise ist auch der Befund zu werten, der im Darmepithel der Ferkel erhoben wurde. Die Abnahme der cytotoxischen T-Zellen in den probiotisch behandelten Tieren ist vermutlich auf die geringere mikrobiologische Belastung der Tiere zurückzuführen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine sinnvolle Beurteilung der immunologischen Befunde nur in Zusammenhang mit mikrobiologischen Daten erfolgen kann. Eine immunstimulatorische Wirkung des Probiotikums konnte nicht nachgewiesen werden. Dennoch muss der Einfluss des Probiotikums auf die Tiergesundheit in unserem Fall als positiv beurteilt werden, da Erkrankungen mit schwerer Durchfallssymptomatik in der Probiotika-Gruppe wesentlich seltener auftraten.

### Literatur

- ALLEN, W.D., P. PORTER (1973): Localization by immunofluorescence of secretory component and IgA in the intestinal mucosa of the young pig. *J. Immunol.* 24, 365-74
- BRANDTZAEG, P., T.S. HALSTENSEN, K. KETT, P. KRAJCI, D. KVALE, T.O. ROGNUM, H. SCOTT, L.M. SOLLID (1989): Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol.* 97, 1562-84
- FAHY, V.A., D. CONNAUGHTON, S.J. DRIESEN, E.M. SPICER (1987): Pre-weaning colibacillosis, in *Manipulating Pig Production*. Eds. APSA Committee Australian Pig Science Association, Werribee, Victoria, Australia, 189-201
- HAAS, W., P. PEREIRA, S. TONEGAWA (1993): Gamma/delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 637-85
- HOEFLING, D. (1989): Tracking the culprits behind diarrhea in neonatal pigs. *Vet. Med.* April, 427
- JONSSON und CONWAY (1992): Probiotics for pigs. In *Probiotics*, R. FULLER (ed.)
- KAGNOFF, M.F. (1993): Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterol.* 105, 1275-80
- MARCOTTE, H., M.C. LAVOIE (1998): Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin. *A. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 71-109
- MARIN, M.L., J.H. LEE, J. MURTHA, Z. USTUNOL, J.J. PESTKA (1997): Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J. Dairy Sc.* 80, 2713-20
- MOREAU, M.C., G. CORTHIER (1988): Effect of the gastrointestinal microflora on induction and maintenance of oral tolerance to ovalbumin in C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* 56, 2766-8
- PERDIGON, G., S. ALVAREZ, M.E. NADER de MACIAS, R.A. MARGNI, G. OLIVER, A.A. PESCE de RIUZ HOLGADO (1986): Lactobacilli administered orally induce release of enzymes from peritoneal macrophages in mice. *Milchwissenschaft* 41, 344-8
- PERDIGON, G., S. ALVAREZ, A.A. PESCE de RIUZ HOLGADO (1991): Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J. Dairy Res.* 58, 485-96
- SOLANO-AGUILAR, G.I., K.G. VENGROSKI, E. BESHAN, J. K. LUNNEY

- (2000): Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J. Immunol Methods.* 241, 185-99
- STOKES, C.R, M. BAILEY, A.D. WILSON (1994): Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 143-50
- TAKAHASHI, T., E. NAKAGAWA, T. NARA, T. YAJIMA, T. KUWATA, Y. YAMAMOTO (1998): Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 10-5
- VITINI, E., S. ALVAREZ, M. MEDINA, M. MEDICI, M.V. de BUDEGUER, G. PERDIGON (2000): Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell.* 24, 223-32

#### **Anschrift der Verfasser**

Dr. Lydia Scharek, Dr. Karsten Tedin, Jana Guth,  
Prof. Dr. M.F.G. Schmidt  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Philippstraße 13  
10115 Berlin  
E-Mail: immunologie@vetmed.fu-berlin.de