

Aus der Klinik für Schweine in Oberschleißheim
(Vorstand Prof. Dr. Dr. Karl Heinritzi)
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Überprüfung der Verträglichkeit des
Salmonella Typhimurium – Lebendimpfstoffes
Salmoporc®
bei oraler Anwendung
für drei Tage alte Saugferkel
unter Berücksichtigung der Ausscheidung,
Persistenz und
Immunogenität des Impfstamms**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Matthias Eddicks
aus Kiel

München 2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Heinritzi

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. H. Erhard

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Ag	Antigene
BDI	Blinddarminhalt
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
DID	Dickdarm
DÜD	Dünndarm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
HMKS	Herzmuskulatur
Ig	Immunoglobulin
KBE	Koloniebildende Einheiten
Kg	Kilogramm
Ln.	Lymphonodus
LPS	Lipopolysaccharid
ml	Milliliter
n.d.	nicht durchgeführt
NaCl	Natrium-Chlorid
OD	optische Dichte
OD%	anhand der optischen Dichte ermittelter Antikörpergehalt
PCR	Polymerase Chain Reaktion
QS	Qualität und Sicherheit
S.	Salmonella
Ser.	Serovar
SMKS	Skelettmuskulatur
Subsp.	Subspezies
u.a.	unter anderem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Literaturübersicht	8
2.1	Spezifische Eigenschaften von Salmonellen.....	8
2.1.1	Taxonomie	8
2.1.2	Morphologie	8
2.1.3	Biochemische Eigenschaften	8
2.1.4	Serologische Eigenschaften.....	9
2.1.5	Tenazität und Persistenz in der Umwelt.....	9
2.2	Pathogenität und Virulenz von Salmonellen.....	10
2.2.1	Pathogenese und Virulenzfaktoren	10
2.2.1.1	Infektion mit Salmonellen	10
2.2.1.2	Pathogenese und Virulenzfaktoren bei der Adhäsion an den Darm.....	11
2.2.1.3	Pathogenese und Virulenzfaktoren bei der Invasion in Enterozyten oder M- Zellen des Darms	12
2.2.1.4	Pathogenese der enterischen Erscheinungsform einer Salmonelleninfektion.....	13
2.2.1.5	Pathogenese der Systemischen Verbreitung von Salmonellen ..	13
2.3	Salmonelleninfektionen und Salmonellose beim Schwein	14
2.3.1	Infektion mit wirtsadaptierten Serovaren	15
2.3.2	Infektion mit nicht wirtsadaptierten Serovaren	16
2.4	Bekämpfungsmöglichkeiten von Salmonellen.....	17
2.4.1	Antibiotische Therapie klinisch erkrankter Schweine	18
2.4.2	Immunprophylaxe.....	19
2.4.3	Immunologische Grundlagen	19
2.4.4	Lebendimpfstoffe	20
2.4.5	Totimpfstoffe	22
2.4.6	Anforderungen an Impfstoffe hinsichtlich ihrer Sicherheit	22
2.5	Nachweismethoden.....	23
2.5.1	Kultureller Erregernachweis	23
2.5.2	Molekularbiologische Nachweismethoden	24

3	Material und Methoden	27
3.1	Ziel der Untersuchungen.....	27
3.2	Auswahl der Versuchstiere	27
3.3	Stallbauliche Merkmale.....	28
3.4	Vakzine	28
3.5	Placebo.....	28
3.6	Impfschema	29
3.6.1	Klinisch kontrollierter Versuch 1: Überprüfung der Unschädlichkeit bei 10facher Überdosierung von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag	29
3.6.2	Klinisch kontrollierter Versuch 2: Überprüfung von Unschädlichkeit und Serokonversion nach einfacher Dosierung von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag.....	29
3.7	Versuchsandordnung.....	29
3.8	Probennahme	30
3.8.1	Blutprobenentnahme.....	30
3.8.1.1	Blutprobenentnahme bei den Jungsau.....	30
3.8.1.2	Blutprobenentnahme bei den Ferkeln.....	31
3.8.2	Kotproben	31
3.8.2.1	Kotproben von den Ferkeln	31
3.8.2.2	Kotproben von den Sauen.....	33
3.8.3	Euthanasie und Gewebeprobenentnahme.....	33
3.8.3.1	Euthanasie.....	33
3.8.3.2	Gewebeprobenentnahme	33
3.9	Gewichtsentwicklung.....	35
3.10	Klinische Untersuchung der Ferkel	36
3.10.1	Tägliche Untersuchungen	36
3.10.2	Untersuchungen im Verlauf der Impfungen.....	36
3.11	Bakteriologische Untersuchungen	37
3.11.1	Bakteriologische Untersuchung der Sammelkotproben	37
3.11.2	Untersuchung der Kottupferproben	37
3.11.3	Untersuchung der Organproben	38
3.12	Serologische Untersuchungen	38
3.13	Statistik	39

4	Ergebnisse.....	40
4.1	Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Applikation einer 10fachen Überdosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag	40
4.1.1	Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach oraler Verabreichung einer 10fachen Überdosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag	40
4.1.1.1	Klinische Beobachtungen	40
4.1.1.1.1	Impfgruppe	40
4.1.1.1.2	Kontrollgruppe	40
4.1.1.2	Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag	41
4.1.1.2.1	Impfgruppe	41
4.1.1.2.2	Kontrollgruppe	41
4.1.1.3	Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag, Tiere mit Fieber	44
4.1.1.3.1	Impfgruppe	44
4.1.1.3.2	Kontrollgruppe	45
4.1.1.4	Säugehäufigkeit	45
4.1.1.4.1	Impfgruppe	45
4.1.1.4.2	Kontrollgruppe	45
4.2	Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Applikation einer 10fachen Überdosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag	46
4.2.1	Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach oraler Verabreichung einer 10fachen Überdosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag	47
4.2.1.1	Klinische Beobachtungen	47
4.2.1.1.1	Impfgruppe	47
4.2.1.1.2	Kontrollgruppe	47
4.2.1.2	Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 21. Lebenstag	48
4.2.1.2.1	Impfgruppe	48
4.2.1.2.2	Kontrollgruppe	48

4.2.1.3	Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 21. Lebenstag, Tiere mit Fieber.....	52
4.2.1.3.1	Impfgruppe	52
4.2.1.3.2	Kontrollgruppe	52
4.2.1.4	Säugehäufigkeit.....	53
4.2.1.4.1	Impfgruppe	52
4.2.1.4.2	Kontrollgruppe	52
4.2.2	Ergebnisse über den Untersuchungszeitraum von 70 Tagen	54
4.2.2.1	Gewichtsentwicklung	54
4.2.2.2	Kotkonsistenz im Untersuchungszeitraum von 10 Wochen	56
4.2.2.2.1	Impfgruppe	57
4.2.2.2.2	Kontrollgruppe	57
4.2.2.3	Verlauf der Körpertemperatur vom Zeitpunkt der Geburt bis zum 50. Lebenstag	58
4.3	Bakteriologische Untersuchungen	60
4.3.1	Sammelkotproben Ferkel	60
4.3.1.1.1	Impfgruppe	60
4.3.1.1.2	Kontrollgruppe	60
4.4	Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Applikation einer einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag	62
4.4.1	Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmoporc® am 3. Lebenstag	62
4.4.1.1	Klinische Beobachtungen	62
4.4.1.1.1	Impfgruppe	62
4.4.1.1.2	Kontrollgruppe	62
4.4.1.1.3	Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmoporc®	63
4.4.1.1.4	Impfgruppe	63
4.4.1.1.5	Kontrollgruppe	63
4.4.1.2	Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® am 3. Lebenstag, Tiere mit Fieber	66
4.4.1.2.1	Impfgruppe	66

4.4.1.2.2	Kontrollgruppe	67
4.4.1.3	Säugehäufigkeit.....	67
4.4.1.3.1	Impfgruppe	67
4.4.1.3.2	Kontrollgruppe	67
4.5	Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag	69
4.5.1	Kontinuierliche Beobachtung innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach oraler Applikation einer einfachen Dosis von Salmoporc®.....	69
4.5.1.1	Klinische Beobachtungen	69
4.5.1.1.1	Impfgruppe	67
4.5.1.1.2	Kontrollgruppe	67
4.5.1.2	Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® am 21. Lebenstag	69
4.5.1.2.1	Impfgruppe	70
4.5.1.2.2	Kontrollgruppe	70
4.5.1.3	Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach einfach dosierter oraler Impfung von Salmoporc® am 21. Lebenstag	72
4.5.1.3.1	Impfgruppe	72
4.5.1.3.2	Kontrollgruppe	72
4.5.2	Ergebnisse über den Versuchszeitraum von 70 Tagen.....	73
4.5.2.1	Säugehäufigkeit.....	73
4.5.2.1.1	Impfgruppe	73
4.5.2.1.2	Kontrollgruppe	73
4.5.2.2	Gewichtsentwicklung	74
4.5.2.3	Einfluss auf die Kotkonsistenz innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 Wochen	76
4.5.2.3.1	Impfgruppe	76
4.5.2.3.2	Kontrollgruppe	77
4.5.2.4	Verlauf der mittleren Körpertemperatur von der Geburt bis zum 50. Lebenstag.....	78
4.5.3	Bakteriologische Untersuchungen	78
4.5.3.1	Sammelkotproben von den Ferkeln.....	78

4.5.3.1.1	Impfgruppe	79
4.5.3.1.2	Kontrollgruppe	79
4.5.3.2	Kotproben der Sauen.....	80
4.5.3.3	Differentialdiagnostische Untersuchung	80
4.5.3.4	Bakteriologische Untersuchung der Organproben	80
4.5.3.4.1	Impfgruppe	80
4.5.3.4.2	Kontrollgruppe	80
4.5.4	Ergebnisse der serologischen Untersuchungen.....	83
4.5.4.1.1	Impfgruppe	83
4.5.4.1.2	Kontrollgruppe	83
4.5.5	Vergleich der Entwicklung der Antikörpertiter einzelner Würfe	86
4.5.5.1.1	Impfgruppe	86
4.5.5.1.2	Kontrollgruppe	86
4.5.6	Antikörperentwicklung einzelner Ferkel der Impf- und Kontrollgruppe.....	90
4.6	Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Muttersauen von Impf- und Kontrollgruppe.....	93
5	Diskussion.....	95
5.1	Ergebnisse der klinischen Beobachtungen	95
5.1.1	Einfluss der oralen Verabreichung einer 10fachen Dosis von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag auf die Körpertemperatur, Säugehäufigkeit und Gesundheit der Ferkel	95
5.1.2	Einfluss der oralen Verabreichung einer einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag auf die Körpertemperatur, Säugehäufigkeit und Gesundheit der Ferkel	97
5.2	Einfluss des Impfstoffs auf die Kotkonsistenz und Gewichtsentwicklung im Untersuchungszeitraum von 70 Tagen ...	97
5.2.1	Einfluss auf die Kotkonsistenz	97
5.2.2	Einfluss auf die Gewichtsentwicklung	98
5.3	Bakteriologische Untersuchungen	99
5.3.1	Untersuchung der Organproben	99
5.3.2	Ausscheidung des Impfstamms	101
5.4	Serologische Untersuchungen	102
5.4.1	Serologische Untersuchung der Ferkel.....	102

5.4.2	Serologische Untersuchung der Muttersauen	104
6	Schlussfolgerungen	105
6.1	Verträglichkeit einer 10fachen Dosis.....	105
6.2	Verträglichkeit einer einfachen Dosis am 3. und 21. Lebenstag	105
6.3	Organbesiedlung und Persistenz des Impfstamms.....	105
6.4	Dauer der Impfstammausscheidung	106
6.5	Immunologische Reaktionen.....	106
7	Zusammenfassung	107
8	Summary	109
9	Literatur	111
	Danksagung	124
	Lebenslauf	125

1 Einleitung

Salmonellen stellen als Erreger von nicht typhoiden Salmonellosen beim Menschen eine bedeutende Zoonose dar. Schätzungen zu Folge sind in Deutschland ca. 20 % der Salmonellen-Infektionen des Menschen auf den Genuss von Schweinefleisch zurückzuführen (Steinbach u. Hartung, 1999; Steinbach u. Kröll, 1999).

Der im Jahr 2005 vom BMVEL vorgelegte Entwurf der Verordnung zur Verminderung des Salmonelleneintrags durch Schlachtschweine bei der Fleischgewinnung, soll das bisherige auf freiwilliger Basis laufende Salmonellenmonitoring-Programm ablösen. In Betrieben mit einem Anteil von 40 % oder mehr positiven Stichproben sollen dann, unter anderem, geeignete Maßnahmen zur Verminderung der Seroprävalenz durchgeführt werden.

In den Jahren 1999 und 2000 sind im Nationalen Referenzlabor für Salmonellen aus 1171 von Schweinen stammenden Isolaten, bzw. den daraus hergestellten Lebensmitteln zu 74 % *S. Typhimurium*, gefolgt von *S. Derby* (6 %) und weniger häufig *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. London* und *S. Livingston* isoliert worden. Bei den vom Schwein stammenden Isolaten von *S. Typhimurium* dominiert mit 60 % der multiresistente Lysotyp DT104. In Deutschland sind inzwischen 79 % aller eingesandter Salmonella-Isolate vom Schwein resistent, wobei 66 % der Isolate Mehrfachresistenzen aufweisen (Helmuth et al., 2002). Die Verbreitung von multiresistenten Salmonellen stellt für die Gesundheit des Menschen ein großes Gesundheitsrisiko hinsichtlich ihrer Therapierbarkeit dar (Rabsch et al., 2001). Auf Grund der Gefahr die Resistenzsituation weiter zu verschärfen und der zu befürchtenden negativen Reaktion des Verbrauchers hinsichtlich der zusätzlichen Gefährdung durch Arzneimittelrückstände in aus Schwein gewonnenen Lebensmitteln, ist der Einsatz von Antibiotika zur Senkung der Seroprävalenz einer Herde denkbar ungeeignet. Neben hygienischen Maßnahmen, sowie Maßnahmen von Seiten der Fütterung hat sich der Einsatz des Salmonella-Lebendimpfstoffs Salmoporc[®] als geeignet erwiesen Salmonellen in betroffenen Betrieben zu bekämpfen, ohne zu Beeinträchtigung hinsichtlich der serologischen Untersuchungen bei Schlachttieren zu führen (Ortmann et al., 2004; Selbitz et al., 2003). Die orale Anwendung des Impfstoffs für Ferkel mit einem Alter von 3 sowie 6 Wochen geht jedoch mit einer erheblichen körperlichen Belastung für Mensch und Tier einher. In der vorliegenden Untersuchung sollte daher die Unschädlichkeit des

Impfstoffs für Ferkel mit einem Erstimmunisierungsalter von 3 Tagen, sowie einer Revakzination mit 21 Tagen überprüft werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen über die Verteilung des Impfstamms im Organismus des geimpften Tieres und die mit der oralen Impfung einhergehenden Ausscheidung des Impfstammes mit dem Kot durchgeführt. Anhand der Bestimmung von Antikörpern gegen das LPS von Salmonellen ist die immunologische Reaktion der Ferkel auf die Impfung überprüft worden.

2 Literaturübersicht

2.1 Spezifische Eigenschaften von Salmonellen

2.1.1 Taxonomie

Die international verbindliche Grundlage für die Ordnung der Salmonellen bildet das Kauffmann-White-Schema, welches regelmäßig vom WHO Collaborating Centre for Reference and Research am Pariser Pasteur-Institut aktualisiert wird. Der Genus *Salmonella* gliedert sich demnach in zwei Spezies. Zum einen handelt es sich um *Salmonella enterica* mit den 6 Subspezies *enterica*, *salamea*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* und zum anderen um *Salmonella bongori*. Für Stämme der Subspezies *enterica* wird zur korrekten Bezeichnung erst der Gattungsname, gefolgt von Subspeziesbezeichnung und Serotyp genannt. Im Sinne einer übersichtlicheren Schreibweise wird aber in der Regel nur der Gattungsname *Salmonella*, gefolgt von der Serovarenbezeichnung, beginnend mit einem Großbuchstaben, verwendet. So wird aus der eigentlich korrekten Schreibweise *S. enterica* spp. *enterica* ser. *Typhimurium*, die Kurzbezeichnung *S. Typhimurium* (Rolle u. Mayr, 2002). Für alle anderen Stämme, außer der Subspezies *enterica*, wird die Kurzbezeichnung gefolgt von der Antigenformel genannt (Bisping u. Amtsberg, 1988; Rolle u. Mayr, 2002).

2.1.2 Morphologie

Salmonellen sind fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende, ovoide, 0,5-0,8 x 1-3,5 µm große und, mit Ausnahme von *S. Gallinarum-Pullorum* auf Grund peritricher Begeißelung, bewegliche gramnegative Kurzstäbchen (Bisping u. Amtsberg, 1988; Libby, 2004).

2.1.3 Biochemische Eigenschaften

Zur Abgrenzung gegenüber anderen Enterobakterien können bestimmte charakteristische Stoffwechselfparameter genutzt werden (Rolle u. Mayr 2002). Salmonellen sind mit Ausnahme von den Subspezies *Arizonae* und *Diarizonae* nicht in der Lage Lactose abzubauen. So können auf lactosehaltigen Nährböden anhand eines Farbumschlages von Indikatoren salmonellenverdächtige lactosenegative, von lactosepositiven Kolonien (*E. coli*, Klebsiellen) unterschieden werden. Durch die

Bildung von H₂S, in dessen Folge Sulfide entstehen, kommt es zu schwärzlichen Aussehen der Kolonien (XLT-4-Agar), oder des Nährmediums (Kligler-Agar). Die beim Abbau von Propylenglycol entstehende Säure führt auf Rambach-Agar zu einer Rotfärbung bei salmonellenpositiven Kolonien. Durch die Fähigkeit Glucuronat zu fermentieren entsteht auf SMID-Agar ein Farbumschlag nach pink. Weitere charakteristische Stoffwechseleigenschaften sind die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, Gasbildung aus Glucose, und die Fähigkeit Citrat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Selbitz, 1995; Rolle u. Mayr, 2002; Libby, 2004).

2.1.4 Serologische Eigenschaften

Die bei Salmonellen vorkommenden Antigene lassen sich in somatische- (O-Ag), Geißel- (H-Ag), Kapsel (K-Ag) und Fimbrien-Antigene (F-Ag) unterscheiden. Die serologische Diagnostik und Einordnung in das Kauffmann-White-Schema bauen auf der Bestimmung der O- und H-Antigene auf. Die hitzestabilen O-Ag sind Bestandteil des LPS-Komplexes der Zellwand, deren serologische Spezifität von Polysaccharidketten bestimmt wird. O-Ag werden im Kauffmann-White-Schema mit arabischen Ziffern bezeichnet. Serovare mit gemeinsamen Haupt-O-Ag werden in Gruppen eingeteilt. Sogenannte Minor-O-Ag können dagegen bei mehreren Gruppen vorkommen. Bei H-Ag handelt es sich um hitzelabile Proteine. Die H-Ag liegen häufig in 2 Phasen vor, wobei die Kultur einer diphasischen Serovar sowohl aus Zellen mit der 1. Phase, als auch aus Zellen mit der 2. Phase bestehen kann. Die einzelne Zelle bildet jedoch immer nur H-Ag einer Phase aus. Ausschließlich monophasisch sind z.B. *S.Typhi* oder *S.Dublin*. H-Ag mit der 1. Phase werden mit kleinen lateinischen Buchstaben, die mit der 2. Phase mit arabischen Ziffern bezeichnet. Von den F-Ag ist vor allem das Fimbrien-Antigen SEF-14 von *S.Enteritidis* für die serologische Diagnostik von Interesse. K-Ag kommen nur bei wenigen Serovaren vor, liegen den O-Ag als Hülle auf, und können die Agglutination von O-Ag verhindern (Selbitz, 1995; Rolle u. Mayr, 2002).

2.1.5 Tenazität und Persistenz in der Umwelt

Das Überleben von Salmonellen in der Umwelt ist von vielen Faktoren abhängig. So spielen die Ausgangskeimzahl, die Temperatur, die relative Luftfeuchte, einwirkende Strahlung, sowie konservierende Schutzsubstanzen eine Rolle. In biologischen

Flüssigkeiten ist der Antagonismus anderer Keime, in festen Medien wie z.B. dem Boden, die Wasseraktivität von Bedeutung (Böhm, 1993). Salmonellen können sich in einem Temperaturbereich von +5°C bis +45°C vermehren, wobei das Temperaturoptimum für ihre Vermehrungsfähigkeit bei 37°C liegt. Sonnenlicht und Temperaturen über 70°C, sowie gebräuchliche Desinfektionsmittel töten Salmonellen innerhalb von Minuten ab (Libby, 2004; Waldmann u. Wendt, 2004). In feuchtem Schweinekot können Salmonellen 2 Monate, in getrocknetem Schweinekot 13 Monate nachgewiesen und als infektiös für Schweine dargestellt werden (Gray u. Fedorka-Cray, 2001). Aus Geflügelkot sind Salmonellen sogar noch nach 26 Monaten anzüchtbar (Davies u. Breslin, 2002). In einer Untersuchung über die Anreicherung von Salmonellen in der Umwelt kann Köhler (1993) in einem Abwasserteich einer Tierkörperbeseitigungsanstalt noch 18 Monate nach ihrer Stilllegung, *S. Enteritidis* nachweisen.

2.2 Pathogenität und Virulenz von Salmonellen

Die Pathogenität einer Bakterienart ist ein speziesspezifisches, qualitatives Merkmal. So wird eine Bakterienart entweder als pathogen oder als apathogen eingestuft (Selbitz, 1995). Bei Salmonellen wurden inzwischen über 200 Virulenzfaktoren identifiziert. Diese sind an Adhäsion, Invasion, Zytotoxizität, sowie der Möglichkeit des intrazellulären Überlebens beteiligt (Schwartz, 1999). Zu diesen gehören die Salmonella-Pathogenitätsinseln 1-5, Salmonella-Virulenzplasmide, das LPS, Flagella und Gene, die intrazelluläres Überleben und Vermehren von Salmonellen ermöglichen.

2.2.1 Pathogenese und Virulenzfaktoren

2.2.1.1 Infektion mit Salmonellen

Eine Infektion mit Salmonellen findet für gewöhnlich über die orale Aufnahme von kontaminierten Futtermitteln, Kot, sowie Sekreten von infizierten Buchtengenossen, oder über die Inhalation von kontaminierten Aerosolen statt (Schwartz, 1999; Proux et al., 2001; Rolle u. Mayr, 2002; Oliviera, 2004). Um in den Dünndarm zu gelangen müssen die aufgenommenen Salmonellen die Magenbarriere passieren. Da der pH-Wert im Magen durch die Eigenschaften und Menge der aufgenommenen Nahrung beeinflusst wird, ist die Effektivität der Magensäure als Barriere gegenüber Bakterien

variabel. So können Salmonellen mit dem Nahrungsbrei die Magenbarriere überwinden und in den Dünndarm gelangen (Libby, 2004). Salmonellen sind in der Lage sowohl organischen als auch anorganischen Säuren zu widerstehen. Diese Resistenz gegenüber Säuren wird durch Säure-Schock-Proteine vermittelt, für deren Produktion zwei Säure-Resistenz-Mechanismen verantwortlich sind. Sobald Salmonellen während der log-Wachstumsphase einem pH-Wert von 4,5 oder niedriger ausgesetzt sind, wird ein kurzzeitiger Säure-Schutz-Mechanismus aktiviert, der durch einen sog. Ferric-uptake-Regulator (FUR) gesteuert wird. Ein zweites, länger arbeitendes, Säure-Resistenz-System entwickelt sich in der stationären Phase des Wachstums (Lee et al., 1995; Audia et al., 2001).

2.2.1.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren bei der Adhäsion an den Darm

Um eine enterische oder systemische Form einer Erkrankung herbeiführen zu können, müssen Salmonellen an Darmepithelzellen oder Microfold-Zellen anheften und in sie eindringen (Tsolis et al., 1999). Die Adhäsion von Salmonellen an die Zellen des Darmepithels ist ein initialer Schritt der Pathogenese einer Salmonelleninfektion. Als bekannteste Adhäsionsfaktoren gelten Fimbrien, die sich als fädige Proteinstrukturen an der Bakterienoberfläche befinden. Diese Fimbrien können mit Hilfe ihrer Lektine an Mannose- oder andere Kohlenhydrat beinhaltende Rezeptoren, sowie an Fibronektine der Zielzellen binden. Fimbrien deren Hämagglutination sich durch Zugabe von Mannose verhindern lässt, werden als Typ 1 Fimbrien bezeichnet. Mannoseresistente Fimbrien lassen sich dagegen nur sehr selten nachweisen (Selbitz, 1995; Rolle u. Mayr, 2002). Die verschiedenen Fimbrientypen werden nach den Molmassen der Fimbrienuntereinheiten in kDa als *Salmonella Enteritidis*-Fimbrae (SEF) 14, 17, 18, und 21 bezeichnet (Rolle u. Mayr, 2002). Während Typ 1 Fimbrien für die Adhäsion an die Enterozyten des Dünndarms verantwortlich gemacht werden (Althouse et al., 2003), können Bäumlner et al. (1996) an einem Mausmodell zeigen, dass für die Adhäsion an Microfold-Zellen sog. Long polar fimbrae (Lpf) verantwortlich sind.

2.2.1.3 Pathogenese und Virulenzfaktoren bei der Invasion in Enterozyten oder M- Zellen des Darms

Schon 1967 kann Takeuchi mit Hilfe eines Elektronenmikroskops zeigen, dass sich Mikrovilli und Tight-Junctions morphologisch verändern, sobald sich Salmonellen in direkter Nähe zu den Enterozyten befinden und dass Salmonellen über diese Gebiete in die Enterozyten oder Microfoldzellen (M-Zellen) eindringen. M-Zellen sind einzigartige epitheliale Zellen, durch eine erhöhte Pinozytoseaktivität gekennzeichnet sind. Ihre Aufgabe besteht in der Präsentation von Antigenen aus dem Darm an die Lymphzellpopulation der darunter liegenden Lymphfollikel (Neutra et al., 1996; Clark et al. 1998).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Invasion von Salmonellen in die Enterozyten oder M-Zellen des Darms von Virulenzfaktoren die durch Salmonella-Pathogenitäts-Inseln (SPI) kodiert sind, abhängig ist. Als Salmonella-Pathogenitäts-Inseln werden Regionen auf der chromosomalen DNA pathogener Salmonella spp. bezeichnet, die für die Ausbildung verschiedener Virulenzfaktoren verantwortlich gemacht werden. Inzwischen sind fünf Salmonella-Pathogenitätsinseln in *S. Typhimurium* und *S. Typhi* identifiziert (Groisman u. Ochman, 1997; Wong et al., 1998; Wood et al., 1998). Die Regulation von SPI erfolgt über Stimuli aus der die Salmonellen umgebenden Umwelt. So wird SPI-1 durch Bedingungen die denen des Verdauungsapparates ähneln aktiviert (Galan u. Curtis, 1990; Francis et al., 1992). Auch die SPI-2-Gene werden durch spezielle Umweltfaktoren wie z.B. geringem Magnesium- oder Calcium-Gehalt sowie Phosphatmangel aktiviert (Valdivia u. Falkow, 1997; Cirillo et al., 1998; Deiwick et al., 1998). Durch das Injizieren von Effektorproteinen in das Zytoplasma von Enterozyten oder M-Zellen mittels eines Typ III Salmonella-Sekretionssystems (TTSS) entstehen morphologische Veränderungen am Zytoskelett dieser Zellen, sog. Ruffles. Diese umschließen als Makropinosomen die Salmonellen und transportieren diese in das Zytoplasma. Auf diesem Weg sind Salmonellen in der Lage, in nicht phagozytierende Zellen wie Enterozyten oder M-Zellen einzudringen (Finlay et al., 1991; Jones et al, 1991; Garcia del Portillo, 1994; Zhou u. Galan, 2001). Das TTSS wird durch die Salmonella-Pathogenitätsinseln 1 und 2 (SPF-1 und SPF-2) kodiert. Auch SPI-4 wird eine Rolle bei der Invasion von Epithelzellen angedacht (Allen, 2001). SPI-5 ist zuerst bei *S. Dublin* identifiziert worden (Wood et al., 1998; Murray u. Lee, 2000) und soll an der enterischen Form der Salmonellose bei Rindern beteiligt sein.

2.2.1.4 Pathogenese der enterischen Erscheinungsform einer Salmonelleninfektion

Das Eindringen von Salmonellen in die Enterozyten hat eine starke entzündliche Reaktion zur Folge, die durch eine Fülle von polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (PMN's) gekennzeichnet ist (Libby, 2004). Für diese entzündliche Reaktion wird das Flagellin von Salmonellen als Hauptverursacher verantwortlich gemacht (Zeng et al., 2003). Durch das Einwandern der PMN's entstehen Lücken in den Tight-Junktions zwischen den Enterozyten. Dieses ermöglicht den Salmonellen oder ihnen zugehörigen pathogenen molekularen Teilen wie z.B. dem LPS oder dem Flagellin, den Zugang zu den Toll-like Rezeptoren auf der basolateralen Seite der Enterozyten (Galan, 2001). Dieses hat eine steigende Produktion proinflammatorischer Cytokine zur Folge, was zu einer weiteren Potenzierung der Entzündungsreaktionen führt (Libby, 2004). Einer durch Salmonellen induzierten Apoptose von Makrophagen folgt ist eine erhöhte Produktion von Prostaglandinen (PG), Leukotrienen und Histaminen. Prostaglandin E₂ (PGE₂) verursacht eine vermehrte CL-Sekretion in den Darm. Auf Grund des osmotischen Drucks folgt Wasser in das Darmlumen nach. Die ablaufende akute entzündliche Reaktion geht einher mit einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und einem daraus resultierendem Ödem der Darmmucosa. Es folgt ein weiterer massiver Einstrom von polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten in das Darmlumen, was mit einer Nekrose der obersten Schicht der Dünndarmmucosa assoziiert ist. Zusammen mit dem Ausstrom proteinhaltiger Flüssigkeit in den Darm bilden sich pseudomembranöse Auflagerungen (Libby, 2004). Die Unterbrechung der normalen Darmfunktion führt so zu einer gesteigerten Flüssigkeitssekretion in das Darmlumen mit einhergehender Enteritis (Zhang et al., 2003).

2.2.1.5 Pathogenese der Systemischen Verbreitung von Salmonellen

Mittels der Transzytose durch die Peyerschen Platten gelangen Salmonellen zu den darunter liegenden Lymphfollikeln, wo sie auf Makrophagen des Wirts treffen. Bei den meisten Makrophagen induzieren die phagozytierten Salmonellen durch ein SPI-1 kodiertes, Autophagie auslösendes Protein den Zelltod dieser Makrophagen (Hernandez et al., 2003). Andere Salmonellen verhindern die nach ihrer Phagozytose normalerweise zu ihrem Tod führenden Reaktionen, ohne erkennbaren Zellschaden

an den Wirtszellen durch einen SPI-1 und SPI-2 abhängigen Weg (Donne et al., 2005). Zum einen wird die Fusion der Salmonellen beinhaltenden Phagosomen mit Lysosomen oder Endosomen der Makrophagen durch ein spezifisches SPI-2 kodiertes Protein verhindert (Uchiya et al., 1999) und zum anderen die Übertragung der NADPH-Oxidase in Salmonella beinhaltende Phagosomen beeinträchtigt. Oxidatives Abtöten der Salmonellen in den Phagosomen kann auf diesem Weg erfolgreich verhindert werden (Vasquez-Torres et al., 2000). 2004 können Uchiya und Nikai zeigen, dass eine Infektion von Makrophagen mit Salmonellen zu einem Ansteigen der Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression führt. Die Folge ist eine Hochregulierung von PG_{E1} und PG_{E2} , was wiederum eine Deaktivierung der Abwehrmechanismen der Makrophagen zur Folge hat. Zusätzlich wird das Überleben in Makrophagen unter magnesiumarmen Bedingungen durch SPI-3 kodierte Virulenzfaktoren unterstützt. (Blanc-Potard u. Groisman, 1997; Smith et al., 1998). Salmonellen die in den Makrophagen überleben und sich vermehren, werden in die regionären Lymphknoten und von dort aus über den Ductus Thoracicus in das Retikuloendotheliale System, vor allem in Leber und Milz transportiert (Libby, 2004). Salmonellen können nach experimenteller oraler Infektion außerhalb des Verdauungsapparates außer aus Proben von der Leber und der Milz auch aus Proben der Lunge, der Nieren und der Skelettmuskulatur isoliert werden (Coté et al., 2004). Der häufigste Nachweis von *S. Typhimurium* gelingt aus den Tonsillen, gefolgt von kaudalen Teilen des Jejunum bis zum Rectum, wo *S. Typhimurium* vor allem aus dem Caecum erfolgreich isoliert werden kann. Die nächst häufig besiedelten Gewebe sind die Mandibularlymphknoten, gefolgt von den Lnn. Ileocolici (Wood et al., 1989; Foster et al. 2003).

2.3 Salmonelleninfektionen und Salmonellose beim Schwein

Bei den Salmonelleninfektionen des Schweins muss zwischen einer Infektion mit septikämischen Verlauf oder einer als Enterocolitis verlaufenden Form der Erkrankung unterschieden werden. Während die septikämische Verlaufsform den an das Schwein adaptierten Serovaren wie *S. Choleraesuis* oder *S. Typhisuis* zugeschrieben wird, sollen an der enterocolitischen Form der Salmonelleninfektion nicht wirtsadaptierte Serovare wie z.B. *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* aber auch die wirtsadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* beteiligt sein (Selbitz, 1995; Schwarz, 1998

Rolle u. Mayr, 2002). Infektionen mit *S. Choleraesuis*, wie auch mit *S. Typhisuis* sind in Deutschland heute nicht mehr von Bedeutung (Bauer u. Hörmannsdorfer, 1995). Infektionen mit *S. Choleraesuis* verursachen in den USA und Kanada aufgrund ihrer meist septikämischen Verlaufsform jedoch hohe wirtschaftliche Verluste (Reed et al., 1986; Kramer, 1995). Auch in Osteuropa und Asien spielt *S. Choleraesuis* eine wichtige Rolle bei den porcinen Salmonellosen (Selbitz et al., 2003). Neben Hausschweinen sind auch Wildschweine für diese Serovar empfänglich. Durch *S. Typhisuis* verursachte Erkrankungen sind selten und von geringer Bedeutung. Durch nicht wirtsadaptierte Serovare hervorgerufene klinisch manifeste Erkrankungen werden vor allem *S. Typhimurium* zugeschrieben. Neben der enterocolitischen Verlaufsform können bei Absatzferkeln und Mastschweinen auch septikämische Verläufe hervorgerufen werden. Seltener werden *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* und *S. Saintpaul* bei einer klinischen Salmonellose isoliert (Bauer u. Hörmannsdorfer, 1995). 82% aller 1999 im Nationalen Veterinärmedizinischen Referenzlabor für Salmonellen untersuchten porcinen Stämme gehören der Serovar Typhimurium an, gefolgt von *S. Derby*, mit einem Anteil von 8%. Alle anderen Serovare haben wesentlich geringere Anteile (Dorn et al., 2002). Die meisten Infektionen mit nicht an den Wirt adaptierten Serovaren verlaufen jedoch latent, was vor allem für die Lebensmittelhygiene von Bedeutung ist. Latent infizierte, klinisch unauffällige Tier stellen so eine ständige Infektionsquelle für den Menschen dar (Blaha, 1993; Schwartz, 1999).

2.3.1 Infektion mit wirtsadaptierten Serovaren

Der Verlauf einer Infektion mit *S. Choleraesuis* variiert von einer perakut-septikämischen bis chronisch latenten Verlaufsform. Die klinische Form der Salmonellose zeigt sich vor allem bei Absatzferkeln und Jungschweinen mit bis zu 60 kg Körpergewicht. Jüngere, sowie ältere Schweine sind meist latente Keimträger, können aber auch Symptome einer Erkrankung zeigen. Bei Sauen kommt es gelegentlich zu Aborten. Häufig sind Stressfaktoren wie z.B. Umgruppierungen beim Einstellen in die Mast maßgebend an der Auslösung der Erkrankung beteiligt. Die septikämische Verlaufsform ist gekennzeichnet durch Inappetenz, Lethargie und hohem Fieber bis über 41°C. Ein leichter, feuchter Husten mit geringer expiratorischer Dyspnoe kann in seltenen Fällen beobachtet werden. Zusätzlich zeigen die Schweine Zyanosen an den Ohren, der Rüsselscheibe und der

Bauchdecke. Durchfall tritt bei der septikämischen Verlaufsform für gewöhnlich erst am dritten oder vierten Tag der Erkrankung in Form von wässrigem, gelben Kot auf. Überstehen infizierte Schweine die akute Form der Salmonellose können sich auch weitere klinische Symptome in Form von Pneumonien, Hepatitis, Enterokolitis und in seltenen Fällen Meningoenzephalitis entwickeln (Turk, 1992; Schwartz, 1999; Waldmann u. Wendt, 2004). Die Verbreitung des Erregers innerhalb eines erkrankten Bestandes erfolgt über die Aufnahme von kontaminiertem Kot oder über nasopharyngeale Sekrete bei nasalem Kontakt (Selbitz, 1995; Schwartz 1999; Rolle u. Mayr, 2002). Die Inkubationszeit variiert von 2 Tagen bis zu mehreren Wochen. Überlebende Schweine bleiben latente Träger und können Salmonellen bis zu 12 Wochen ausscheiden. Für experimentell mit *S. Choleraesuis* infizierte 2 Tage alte Saugferkel können Anderson et al. (2000) die Ausscheidung des Erregers bis zum 85. Tag nach der Infektion nachweisen. Eine Infektion mit *S. Typhisuis* soll in noch stärkerem Maße ohne immunsupprimierende Faktoren wie Umstallen o. ä., als eine *S. Choleraesuis*-Infektion zu einer Erkrankung führen. Betroffen sind vor allem Absatzferkel. Die Klinik ist gekennzeichnet durch einen schleichenden Krankheitsverlauf mit intermittierenden Durchfällen, Abmagerung und teilweise chronischen Pneumonien (Selbitz, 1995 Rolle u. Mayr, 2002).

2.3.2 Infektion mit nicht wirtsadaptierten Serovaren

Betroffen sind vor allem Schweine vom Zeitpunkt des Absetzens bis zu einem Alter von 4 Monaten. Die Krankheit verläuft sowohl akut als auch chronisch und wird in den meisten Fällen *S. Typhimurium* zugeschrieben. Weniger häufig sind *S. Choleraesuis* oder *S. Heidelberg* an einer Enterocolitis beteiligt. Als erstes Symptom tritt gelber, wässriger Durchfall auf. Die erste Phase des Durchfalls ist individuell unterschiedlich lang, mit einer Dauer von 3-7 Tagen. Innerhalb weniger Tage breitet sich die Krankheit aus und betrifft dann meist alle Tiere einer Bucht. In wiederkehrenden Durchfallperioden kann Blut im Kot auftreten. Betroffene Tiere zeigen neben Durchfall auch Fieber, eine verminderte Futteraufnahmen und erscheinen dehydriert. Zusätzlich können Strikturen des Rektums als Folge einer Proktitis beobachtet werden. Die Mortalitätsrate ist gering und Todesfälle treten erst nach mehreren Tagen Durchfall als Folge von Hypokalämie und Dehydratation auf. Die meisten Schweine überstehen die Erkrankung, bleiben aber latente Keimträger und Ausscheider mit einer Dauer von bis zu 5 Monaten (Schwartz, 1999; Waldmann

u. Wendt, 2004). Wood et al. (1992) können sogar noch 7 Monaten nach experimenteller Infektion mit *S. Typhimurium* den Erreger in unterschiedlichen Mengen, sowohl aus dem Inhalt, als auch aus den Wänden von Zaekum, Colon und Ileum isolieren.

2.4 Bekämpfungsmöglichkeiten von Salmonellen

Für die Bekämpfung der Salmonellose des Schweins bedarf es komplexer Bekämpfungsstrategien um nachhaltige Ergebnisse zu erzielen. Als Hauptinstrumente sehen Selbitz et al. (2003) die Diagnostik auf Einzeltier- und Bestandesebene, die Verhinderung der Erregereinschleppung, Hygienemaßnahmen zur Senkung des Infektionsdrucks, den Einsatz von Antiinfektiva sowie Impfungen. Wenn die Immunprophylaxe sinnvoll in die Bekämpfungskonzepte eingeordnet wird, hat sie im Rahmen der Salmonellenbekämpfung die besten Erfolgsaussichten. Wichtig hierfür ist jedoch die Diagnostik der jeweils im Bestand vorherrschenden Serovare um über die Antigenzusammensetzung möglicher Impfstoffe entscheiden zu können. Um besonders salmonellenbelastete Mastbestände herauszufinden ist die Bestimmung der Gesamtantikörperwerte als diagnostisches Mittel geeignet (Steinbach et al., 2003). Als Voraussetzung für gute Ergebnisse bei der Bekämpfung von Salmonellen in einem Bestand nennen Meyer et al. (1993) gutes Management, konsequent durchgeführte veterinärhygienische Maßnahmen und zusätzlich durchgeführte antiinfektiöse Maßnahmen wie z.B. eine Immunprophylaxe. Für eine erfolgreiche Bekämpfung auf einem mit Salmonellen belasteten Betrieb ist zusätzlich die Kenntnis über mögliche Eintragsquellen von großer Bedeutung (Selbitz, 1995). Eine sorgfältige Analyse der Infektionsquellen und Risikofaktoren in diesen Beständen ist unerlässlich (Große Austing et al., 2004). Um zu verhindern, dass Tiere aus anderen Beständen Salmonellen mitbringen, sollten diese im Herkunftsbetrieb bakteriologisch beprobt werden. Das Einhalten des „Alles-Rein, Alles-Raus“-Prinzips sowie regelmäßige Reinigung und Desinfektion sind Grundvoraussetzungen in einem strategischen Bekämpfungsprogramm. Auch alle zuführenden Wege, wie Rampen und Gänge sowie Tröge und Tränken müssen in die Reinigung miteinbezogen werden. Diese Hygienemaßnahmen können durch die Untersuchung von Umgebungsproben überprüft werden (Blaha, 2001; Große Austing et al., 2004). Zusätzlich gehören eine kontinuierliche, systematische Schadhagerbekämpfung und das Verhindern des Eindringens von Vögeln in Ställe

und Futterlager zu den wichtigen prophylaktische Maßnahmen. Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von Salmonellen stellt die Wahl des Futters dar. Der Zusatz von Säuren zum Futter, kann die Vermehrung unerwünschter Keime im Verdauungstrakt unterdrücken, wobei ein pH-Wert des Futters von 5 angestrebt werden sollte (Jørgensen et al., 2001). Auch die Struktur des Futters kann einen positiven Einfluss auf die Salmonellenprävalenz einer Herde bewirken. Durch die Fütterung von schrotförmigen Futter (d.h. weder thermisch behandelt noch pelletiert) kann das Vorkommen von Salmonellen in der Endmast gesenkt werden. Ein Nachteil ist jedoch ein bis zu 6% höherer Futteraufwand um herkömmliche Mastleistungen zu erzielen. Günstige Ergebnisse können auch durch den Einsatz von organischen Säuren erreicht werden. Ameisensäure oder Milchsäure in einer Konzentration von mindestens 0,5 -1% reine Säure zum Futter kann sich ebenfalls positiv auf die Salmonellen-Herdenprävalenz auswirken. Die maximale Konzentration wird mit 1,4% für Ameisensäure und 3% für Milchsäure angegeben (Jørgensen, 2005; Øverland, 2005).

2.4.1 Antibiotische Therapie klinisch erkrankter Schweine

Als Mittel erster Wahl bei klinisch erkrankten Schweinen gelten in der Veterinärmedizin Aminopenicilline, Gyrasehemmer und moderne Cephalosporine. Wann immer es möglich ist sollte die Auswahl der Substanzen zur antimikrobiellen Therapie nach den Ergebnissen eines Resistenztests erfolgen. Auf Grund der zunehmenden Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antibiotika ist eine prophylaktische Anwendung nicht akzeptabel (Selbitz, 1995). Ein Therapieversuch bei akut erkrankten Schweinen mit hochgradiger Zyanose und Atemnot, sowie kümmernden Tieren ist abzulehnen. Solche Tiere sind auf Grund geringer Heilungsaussichten und der Fortdauer der Erkrankung mit andauernder Erregerausscheidung aus dem Bestand zu entfernen (Waldmann u. Wendt, 2004). Eine Bestandsbehandlung mit antimikrobiologisch wirksamen Substanzen führt jedoch nicht zur Salmonellenfreiheit eines Bestands (Rolle u. Mayr, 2002). So kann in einer Untersuchung von Roesler et al., (2005) durch eine Langzeittherapie mit Enrofloxacin bei Sauen und deren Nachkommen bis zum Zeitpunkt des Absetzens, die Ausscheidung von Salmonellen durch die Sauen und die daraus resultierende Infektion der Ferkel nicht verhindert werden.

2.4.2 Immunprophylaxe

Die Indikation für eine Impfung gegen Salmonellen zur Prophylaxe und Bekämpfung ergibt sich aus epidemiologischen Gegebenheiten wie den vielfältigen Infektionsmöglichkeiten, hohem Infektionsdruck, oder aus der Schwierigkeit der Sanierung latenter Salmonellenträger mittels Antiinfektiva und zunehmender Resistenz von Salmonellen gegen Antibiotika (Selbitz, 1995). Ein idealer Impfstoff zum Schutz vor *S. Typhimurium* sollte die Besiedlung von Tonsillen, Ileum, Zäkum und Colon, sowie die Ausscheidung von Salmonellen in die Umwelt verhindern. Klinische Symptome und die Entstehung latent infizierter Tiere, sollten durch den Impfstoff ebenfalls erfolgreich bekämpft werden. Ein eher realistisches Ziel für einen Salmonellen-Impfstoff ist jedoch die Fähigkeit klinische Symptome zu verhindern, die Ausscheidung von Salmonellen durch infizierte Schweine zu reduzieren und die Infektionsschwelle für empfängliche Schweine zu erhöhen (Haesebrouk, 2004). Als Ergebnis sollte eine Reduktion des Infektionsdrucks und somit eine Unterbrechung der Infektionskette gesehen werden. Neben dem Schutz vor einer klinischen Erkrankung beim Schwein sollte aber auch eine epidemiologisch relevante Reduzierung der Salmonellenbelastung von Schweinebeständen, mit dem Ziel der Verringerung des Eintrags von Salmonellen in Lebensmittel, als Ziel einer Salmonellen-Schutzimpfung gesehen werden (Selbitz u. Lindner, 2003).

2.4.3 Immunologische Grundlagen

Kenntnisse über die Abwehrmechanismen des Organismus sind für die Immunprophylaxe sowie für die Diagnostik von großem Interesse. Für die Abwehr von intrazellulär parasitierenden Bakterien wie Salmonellen, spielt die zelluläre Immunantwort und hier vor allem T-Zell abhängige Mechanismen eine wichtige Rolle (Selbitz, 1995; Libby, 2004; Tyzard, 2004). In der frühen Phase einer Infektion mit Salmonellen sind die angeborenen Immunmechanismen von Bedeutung. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen sind bei der Immunantwort während der Invasion von Salmonellen in den Darm beteiligt. Dendritische Zellen können nicht nur Antigene von aufgenommenen Erregern, sondern auch Teile von Makrophagen, bei denen Salmonellen Apoptose ausgelöst haben, über MHC-I- oder MHC-II- Moleküle an ihrer Oberfläche CD4+ oder CD8+ Zellen präsentieren (Libby, 2004). Peptide von Pathogenen die sich im

Zytoplasma einer Zelle vermehren, werden über MHC-I- Moleküle CD8+-T-Zellen präsentiert. Diese differenzieren sich daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen und können so infizierte Zellen töten. Antigene von Krankheitserregern, die in intrazellulären Vesikeln wachsen und solche, die von aufgenommenen extrazellulären Bakterien oder Toxinen abstammen, werden von MHC-II-Klasse-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und CD4+ Zellen präsentiert. Pathogene die sich in großer Zahl in Vesikeln von Makrophagen sammeln stimulieren für gewöhnlich die Differenzierung von Th 1-Zellen, extrazelluläre Antigene eher die Differenzierung von Th 2-Zellen (Janeway, 1994). Ein gegenüber intrazellulären Bakterien wie z.B. Salmonellen wirksamer Mechanismus ist die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. Antigen-spezifische Helferzellen können verschiedene Zytokine freisetzen, die mit zwei unterschiedlichen Resistenzmustern korrelieren. Man bezeichnet diese als Typ-I oder Typ-II Muster. Die T-Helferzellen (Th-Zellen), die mit ihnen in Verbindung gebracht werden, werden entsprechend als Th 1- oder Th 2-Zellen benannt. Das von Th 1-Zellen freigesetzte Interferon γ (INF γ) führt zur Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T- Zellen, was als Typ 1 Immunantwort bezeichnet wird. Eine Typ 2 Immunantwort wird durch Th 2 Zellen vermittelt und ist gekennzeichnet durch die Stimulierung von B-Zellen mittels Interleukin 4 (IL 4) Freisetzung. Dieses führt zu einer Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen und zur Produktion neutralisierender Antikörper die in der Lage sind freie Bakterien zu binden und zu inaktivieren (Murthaugh, 2004). Ein Teil dieser spezifischen B- und T-Zellen zirkulieren über lange Zeit als so genannte Gedächtniszellen im Blut. Im Falle einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger ist so eine sehr schnelle und spezifische Immunantwort möglich, die zusammen mit den natürlichen Immunmechanismen einen hochwirksamen Schutz bewirkt.

2.4.4 Lebendimpfstoffe

Die Immunreaktionen die an Schleimhäuten ablaufen, unterscheiden sich wesentlich von der systemischen Immunantwort. Entsprechend wichtig für die Effizienz eines Impfstoffes ist die Applikationsart. Intramuskulär oder subkutan verabreichte Vakzinen induzieren hohe Spiegel von IgG im Blut aber nur einen vernachlässigbaren sekretorischen IgA Antikörperspiegel. Diese Immunreaktion ist zwar effektiv um frei in der Blutbahn vorliegende Erreger zu eliminieren, aber nicht in

der Lage eine ausreichende Immunität an den Schleimhäuten zu induzieren. Antigene die oral verabreicht werden und z.B. eine Immunantwort im Darm initiieren, induzieren hingegen eine starke Produktion von sekretorischem IgA, aber nur geringe Mengen an IgG im Blut. Sekretorisches IgA kann eine wichtige Rolle bei der Infektionsabwehr von Salmonellen spielen, da es sich an die Oberfläche der Bakterien anlagert und so die Aufnahme der Salmonellen in Enterozyten oder M-zellen verhindert (Libby et al., 2004; Murthogh, 2004). Zusätzlich wird eine ausgeprägtere zelluläre Immunantwort durch Lebendimpfstoffe herbeigeführt, was die Auffassung bestimmt, dass Lebendimpfstoffe einen besseren Schutz gegen Salmonellen-Infektionen bieten als inaktivierte Vakzinen (Selbitz, 1995; Libby et al., 2004; Tizard, 2004). Wichtig für die oben erwähnten Mechanismen ist die kurzzeitige Besiedlung und Vermehrung des Impfstamms im Organismus des geimpften Tieres (Selbitz, 1995; Selbitz, 2001; Haesebrouk, 2004; Murtough, 2004).

Aus immunologischer Sicht ist die komplexe Stimulation der Immunitätsmechanismen, insbesondere der zellvermittelten Komponenten infolge der Antigenpräsentation im MHC-I- und die MHC-II-abhängige Th 1-Zellreaktion wesentlich (Selbitz 2001; Tizard 2004). Im Fall eines *S. Enteritidis* – Impfstamms konnte neben der Induktion von IgM, IgG-, und IgG2a- Antikörpern auch die Stimulation von Interferon- γ , Interleukin 4, der Stickoxidkonzentration und einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ und damit eine Th1/Th2-Mischantwort nachgewiesen werden (Springer et al., 2000). Für die Herstellung von Salmonellen-Lebendimpfstoffen sind inzwischen viele verschiedene Ansätze unterschiedlich attenuierter Salmonellen-Stämme in Betracht gezogen worden. Ein Ansatz beinhaltet Salmonellen-Stämme, deren Induktion der Mutation nicht gezielt herbeigeführt worden ist, sondern auf dem Zufallsprinzip basiert und weder genauer charakterisiert noch lokalisiert ist. Bei anderen Stämmen ist die Attenuierung der Bakterien auf Mutationen in Genen zurückzuführen, die für den Bakterienstoffwechsel essentiell sind. Hierzu zählen z.B. *aroA*- (Lumsden et al., 1991) oder Adenin-Histidin-auxotrophe Mutanten (Springer et al., 2001), oder Stämme mit Mutationen in wichtigen Regulorgenen oder Membranproteinen (Coe u. Wood, 1992; Roesler et al., 2004). Einen weiteren Ansatzpunkt stellen Stämme dar, bei denen gezielt spezifische Virulenzgene entfernt worden sind (Kramer et al., 1992).

Zur Anwendung beim Schwein sind in Deutschland derzeit zwei Lebendimpfstoffe gegen Salmonellose zugelassen. Der Lebendimpfstoff Salmoporc[®] basierend auf einer Histidin-Adenin-auxotrophen *Salmonella Typhimurium* Mutante und der auf Basis einer Hypoxanthin-auxotrophen R- Form Mutante von *Salmonella choleraesuis* hergestellte Lebendimpfstoff Suisoral[®] (beide Impfstoffwerk Dessau-Thornau).

2.4.5 Totimpfstoffe

Das Einsatzgebiet von inaktivierten Salmonellen-Impfstoffen bezieht sich auf Grund der großen Serovarenvielfalt auf den Gebrauch von bestandsspezifischen Vakzinen, die sich nicht generell durch kommerziell erhältliche Impfstoffe ersetzen lassen (Selbitz 1995; Libby, 2004). Es wird so stets gegen die tatsächlich in einem Bestand vorkommenden Salmonellen-Serovare geimpft. Eine Kontamination von Schlachtkörpern oder ein Persistieren des Impfstamms in der Herde kann durch den Einsatz von inaktivierten Vakzinen ebenfalls vermieden werden (Hensel, 2003). Roesler et al. verglichen 2004 eine bestandsspezifische inaktivierte Salmonellen-Vakzine für die Impfung von Muttersauen mit einer Langzeit-Antibiotika-Behandlung von Sauen und deren Ferkel bis zum Absetzen. Nach der Impfung konnten spezifische Salmonella Antikörper in Serum und Milch der Sauen sowie im Serum der Ferkel nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist eine signifikant niedrigere Salmonellen Prävalenz bei den abgesetzten Ferkeln der geimpften Sauen im Vergleich zu den antibiotisch behandelten Kontrolltieren.

2.4.6 Anforderungen an Impfstoffe hinsichtlich ihrer Sicherheit

Die Zulassung von Impfstoffen ist in der europäischen Union einheitlich geregelt. Sie kann in einem zentralisierten Verfahren durch die European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMA) mit Sitz in London, oder in einem dezentralen Verfahren, durch eine nationale Zulassungsbehörde mit anschließender Anerkennung durch andere europäische Staaten in der Mutual recognition procedure erfolgen. Die bestimmende Gesetzgebung für die Zulassungsanforderungen für Tierimpfstoffe ist in der EU durch das Europäische Arzneibuch und die Richtlinie 92/18 EWG vom 20. März 1992 geregelt. Für die nationale Gesetzgebung ist die Tierimpfstoffverordnung maßgebend. Dazu kommen noch die mehrbändigen Rules governing medicinal products in the EU mit Requirements und Guidelines, in denen

auch Anforderungen an Lebendimpfstoffe formuliert werden. Im Europäischen Arzneibuch wird neben der Bewertung der Unschädlichkeit des Impfstoffes für Tiere, Untersuchungen über Übertragbarkeit des Impfstammes von geimpften auf ungeimpfte Tiere, die Verbreitung des Impforganismus im geimpften Tier, die Rückkehr oder Erhöhung der Virulenz, die biologischen Eigenschaften sowie Rekombination oder genomische Neuordnung des Impfstammes gefordert. Zusätzlich gehört die exakte Charakterisierung des Impfstamms und die dadurch gegebene Unterscheidbarkeit von Feldstämmen zu den unabdingbaren Anforderungen (Selbitz, 2001; Schwaning, 2002). Für Lebendimpfstoffe auf der Basis humanpathogener Erreger muss die Unschädlichkeit auch für den Menschen nachgewiesen werden. Am Beispiel für Salmonellen-Lebendimpfstoffen wird weltweit die Maus als Modelltier verwendet. Neben der anschließenden Erprobung an der Zieltierart wird die Unschädlichkeit auch an weiteren Tierarten erprobt. Ist die Unschädlichkeit für mehrere Tierarten zweifelsfrei erwiesen, kann daraus mit ziemlicher Sicherheit auf ein vergleichbares Verhalten beim Menschen geschlossen werden (Selbitz, 2001). Zusätzlich muss auch die Ökotoxizität beurteilt werden. So muss überprüft werden ob Impfstamm in die Umwelt ausgeschieden wird und wie lange die Überlebenszeit in der Umwelt andauert. Die Tenazität des Impfstammes muss in jedem Fall geringer sein als beim entsprechenden Feldstamm.

2.5 Nachweismethoden

2.5.1 Kultureller Erregernachweis

Bei dem kulturellen Nachweis von Salmonellen können drei Arbeitsschritte unterschieden werden. Ein erster Schritt ist die nichtselektive Voranreicherung z.B. mit gepufferten Peptonwasser, wodurch die Keimausbeute durch Aktivierung subletal geschädigter Bakterien erhöht werden kann. Durch eine anschließende Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium wird das Wachstum von unerwünschten Begleitkeimen durch Hemmstoffe vermindert und das ungestörte Wachstum von Salmonellen ermöglicht. Am weitesten verbreitet sind Selektivmedien auf Basis von Tetrathionat, Selenit, oder Rappaport-Vassiliadis-Bouillon. Zuletzt werden für die Abgrenzung von anderen Bakterienarten feste Differenzialnährböden verwendet, bei denen sich spezielle Stoffwechselfparameter von Salmonellen zunutze gemacht werden (vergl. biochem. Eigensch. v. Salmonellen). Grundsätzlich sollten immer zwei

unterschiedliche Selektivnährböden eingesetzt werden. Zu den am häufigsten verwendeten Differenzialnährböden zählen BPLS-Agar, Rambach-Agar, XLT-Agar, Gassner-Agar oder SMID-Agar. Die Bebrütung der Nährmedien erfolgt bei 37°C oder 43°C. Die höhere Temperatur empfiehlt sich vor allem wenn mit einer starken Begleitflora zu rechnen ist. Die Bestimmung der Serovare wird mittels käuflicher O- und H- Antiseren in der Objektträgeragglutination durchgeführt (Bisping u. Amtsberg, 1988; Selbitz, 1995; Rolle u. Mayr, 2002). Für den Nachweis einer Salmonelleninfektion von Schweinen oder einer Kontamination von aus ihnen produzierten Lebensmitteln, werden inzwischen verschiedene Verbesserungen und Weiterentwicklungen der Nachweismethoden eingesetzt, da die geringeren Keimzahlen in Lebens- und Futtermitteln eine Verbesserung der Nachweismethoden erforderlich machen. Zu diesen gehören Verbesserung des kulturellen Nachweises durch Anreicherungs- und Selektivnährmedien, Veränderungen von Bebrütungszeit und Temperatur, Membranfiltertechnik zur Konzentration von Salmonellen, sowie Impedanzmessungen, bei denen durch Salmonellen verursachte Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit in Selektivmedien ermittelt werden (Selbitz, 1995).

2.5.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

Als molekularbiologische Untersuchungsmethoden können PCR und immunomagnetische Separation, oder die Kopplung beider Methoden, helfen, eine schnellere Diagnostik ohne Voranreicherungen durchzuführen (Helmuth 1993, Erol et al. 1999, Pan u. Liu, 2002;). Für eine PCR können sowohl chromosomale DNA-Abschnitte, als auch Plasmid-abgeleitete Sequenzen eingesetzt werden. Für die Untersuchung von Organproben von experimentell mit *S. Typhimurium* infizierten Schweinen, konnten Scholz et al. (2001) zeigen, dass die Untersuchungsergebnisse die mit Hilfe einer PCR gewonnen wurden, exakt mit den Ergebnissen des routinemäßig durchgeführten kulturellen Nachweises übereinstimmten. Bei der immunomagnetischen Separation werden Salmonella-spezifische Antikörper an superparamagnetische Polysterol-Kugeln (Dynabeads®) gekoppelt. In flüssigen Nährmedien binden sie an Zellen mit den entsprechenden Antigenen. Hält man einen Magneten parallel zum Inkubationsgefäß sammeln sich die Kugeln an der Gefäßwand und die nicht gebundenen Bakterien werden mit dem Nährmedium abgegossen. So angereicherte Salmonellen können mittels PCR, kulturell oder biochemisch nachgewiesen werden (Skjerve u. Olsvik, 1991; Erol et al., 1999;

Rijpens et al., 1999). Die Kombination von kulturellen Nachweismethoden mit molekularbiologischen Methoden kann ebenfalls mit Erfolg durchgeführt werden. Für den Nachweis von Salmonellen aus Kotproben ist eine Kombination von selektiver Voranreicherung mit anschließender PCR möglich, wobei sich Rappaport-Vassiliadis und Tetrathionat-Bouillon zur Voranreicherung als kontraproduktiv herausgestellt haben (Sibley et al. 2003; Stone et al. 1994). Auch nichtselektive Voranreicherungen können erfolgreich mit einer PCR kombiniert werden (De Medici et al., 2003; Lee et al., 1990). Fravallo et al. können 2001 in einer Untersuchung über pathogene Keime auf Schlachtkörpern von Schweinen, Salmonellen auf deren Haut durch Immunofluoreszenz-Untersuchungen nachweisen.

Durch die Untersuchung von Fleischsaft oder Blutserum läßt sich eine Salmonelleninfektion indirekt über den Nachweis von Salmonella-Antikörpern feststellen. Hierfür werden verschiedene ELISA-Testsysteme verwendet. Bei dem in Dänemark entwickelten (Nielsen et al., 1995) und auch in Deutschland eingesetzten Fleischsaft-ELISA wird ein Mischantigen aus Lipopolysaccharid (LPS) der Serovaren *S. Typhimurium* mit den O-Ag 1, 4, 5, und 12 und *S. Infantis* mit den O-Ag 6, 7 und 14 oder *S. Choleraesuis* mit den O-Ag 6 und 7 verwendet. Da bei den meisten beim Schwein vorkommenden Salmonellaserovaren mindestens eins dieser sechs, bzw. sieben O-Antigene vorkommt, eignet sich der Test außer für den Nachweis von *S. Typhimurium* und *S. Infantis*, bzw. *S. Choleraesuis* auch für einen großen Teil der anderen beim Schwein vorkommenden Serovare (Steinbach et al. 2000). Um Schweineherden zu identifizieren, die einer hohen Salmonellenbelastung ausgesetzt sind, sehen Steinbach et al. (2003) es für gerechtfertigt an, Fleischsaftproben einer Verdünnung von 1:30 mit Blutserumproben einer Verdünnung von 1:400 gleichzusetzen. In Untersuchungen von Proux et al. (2000) korrelieren positive ELISA-Ergebnisse im Serum von Schweinen mit Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchungen von Mesenteriallymphknoten. Für Kotproben können diese Übereinstimmung nicht festgestellt werden. Sörensen et al. konnten 2003 eine starke Assoziation zwischen der Herden-Seroprävalenz und positiven bakteriologischen Befunden aus Blinddarminhalt, Pharynx und Schlachtkörperoberfläche feststellen. Nollet et al. (2005) zeigen hingegen, dass es zu Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von Serologie und bakteriologischen Untersuchungen von Mesenteriallymphknoten kommen kann, so dass seronegative Schweine Salmonellen beherbergen können. Die Chance eines positiven bakteriologischen

Befundes steigt mit zunehmender Salmonella-Antikörperprävalenz einer Herde. Die serologische Untersuchung ist somit geeignet die Seroprävalenz einzelner Herden zu bestimmen (Nielsen et al., 1995; Wong et al., 2002; Wong et al., 2004; Funk et al., 2005) und kann über den zeitlichen Ablauf und die Intensität eines Salmonellengeschehens in Schweinebeständen Auskunft geben und besonders salmonellenbelastete Bestände identifizieren (Steinbach et al., 2003).

3 Material und Methoden

3.1 Ziel der Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es die Unschädlichkeit des *Salmonella-Typhimurium*-Lebendimpfstoffes Salmoporc® (Fa. IDT, Dessau) nach oraler Applikation bei Saugferkeln mit einem Erstimpfalter von 3 Tagen und einer zweiten oralen Impfung mit einem Alter von 21 Tagen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde den Ferkeln am 3. sowie am 21. Lebenstag eine 10fache Überdosis des Impfstoffs oral verabreicht. In einem zweiten Versuch wurden die Ferkel am 3. und 21. Lebenstag mit der einfachen vom Hersteller empfohlenen Dosis oral geimpft. Zusätzlich sollte die Immunantwort der Ferkel nach der einfach dosierten Impfung am 3. und 21. Lebenstag untersucht werden. Die Untersuchungen wurden in Universitatseigenen Stallungen von August 2004 bis Februar 2005 nacheinander durchgeführt.

Die Versuche wurden mit einer Ausnahmegenehmigung gemäß § 17 c Abs. 4 Nr. 2 a Tierseuchengesetz (TierSG) vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Die Anwendung des noch nicht zugelassenen Impfstoffes nach § 17 c Abs. 4 Nr. 2 a Tierseuchengesetz kann ausnahmsweise erlaubt werden, weil sie im Rahmen eines wissenschaftlichen Versuches zur Erprobung des Impfstoffes (Wirksamkeit, Unschädlichkeit) erforderlich ist und bei Beachtung der genannten Nebenbestimmungen eine Verschleppung von Krankheitserregern nicht zu befürchten ist.

3.2 Auswahl der Versuchstiere

Für die durchgeführten Untersuchungen wurden 6 hochtragende Jungsauen aus einem salmonellenunverdachtigen, geschlossenen Betrieb angekauft und zum Abferkeln eingestallt. Die neugeborenen Ferkel wurden in die Versuche mit einbezogen. Im Vorfeld der durchgeführten Versuche wurde der Kot der anzukaufenden Jungsauen, sowie von auf dem Betrieb befindlichen Ferkeln dreimal bakteriologisch negativ auf Salmonellen untersucht. Weiterhin konnten *Clostridium perfringens* Typ C, *Brachyspira hyodysenterica*, *Lawsonia intracellularis* sowie toxinbildende *E.coli* bakteriologisch nicht nachgewiesen werden. Die parasitologische Untersuchung der Sauen und Ferkel verlief negativ. Serologisch konnte nach

zweimaliger Untersuchung ein nach BMELV negativer Antikörpertiter bei den anzukaufenden Sauen festgestellt werden.

3.3 Stallbauliche Merkmale

Bei dem Versuchsstall handelte es sich um einen Abferkelstall mit Kastenständen, sowie planbefestigten Böden. Der Stall wurde täglich mit Stroh eingestreut und gemistet. Nach dem Absetzen verblieben die Ferkel bis zur 6. Lebenswoche im Abferkelstall. Anschließend wurden die Ferkel in einen mit Teilspaltenboden ausgestatteten Maststall umgestallt und bis zum Versuchsende dort gehalten. Die Fütterung erfolgte sowohl im Abferkelstall, als auch im Maststall mit Futter nach DLG-Norm von Hand. Die Wasserversorgung erfolgte mittels Nippeltränken ad libitum.

3.4 Vakzine

Für die Versuche wurde der in Deutschland bereits bei 21 Tage alten Ferkeln zur oralen Applikation, sowie bei Sauen zur subcutanen Injektion zugelassene *Salmonella Typhimurium*-Lebendimpfstoff Salmoporc® (Fa. IDT, Dessau) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine genetisch stabile, doppelt attenuierte (Histidin-Adenin-auxotrophe) *Salmonella Typhimurium*-Mutante, in gefriergetrockneter Form, zur Resuspension. Nach Auflösung des gefriergetrockneten Impfstoffes in 20 ml Suspensionsflüssigkeit enthält eine Impfdosis (1 ml) 5×10^8 KBE der attenuierten *Salmonella Typhimurium*-Mutante. Der Impfstamm kann auf Grund seiner Auxotrophie und dem daraus resultierenden Wachstumsverhalten mittels eines speziellen Nährmediums (Salmonella Diagnostikum, Fa. IDT, Dessau) von Feldstämmen unterschieden werden.

3.5 Placebo

Für die Kontrollgruppen wurde an Stelle des Impfstoffes jeweils die gleiche Menge steriler, physiologischer Kochsalzlösung oral verabreicht.

3.6 Impfschema

3.6.1 Klinisch kontrollierter Versuch 1: Überprüfung der Unschädlichkeit bei 10facher Überdosierung von Salmoporc[®] am 3. und 21. Lebenstag

Um die Unschädlichkeit einer Überdosis des Impfstoffes für Ferkel mit einem Erstvakzinierungsalter von 3 Tagen und einer Revakzinierung mit 21 Tagen Alter zu überprüfen, wurden die Versuchstiere am 3. sowie am 21. Lebenstag mit der 10fachen vom Hersteller empfohlenen Impfdosis (10 ml resuspendierter Impfstoff bzw. 5×10^9 KBE attenuierter *Salmonella-Typhimurium*-Mutante) geimpft. Die Impfstoffapplikation erfolgte am 3. sowie am 21. Lebenstag oral. Hierzu wurde der Impfstoff mit einer 10 ml Einwegspritze, auf die eine leicht gebogene Knopfkanüle aufgesetzt war, über den Zungengrund schluckweise appliziert.

3.6.2 Klinisch kontrollierter Versuch 2: Überprüfung von Unschädlichkeit und Serokonversion nach einfacher Dosierung von Salmoporc[®] am 3. und 21. Lebenstag

Zur Überprüfung der Unbedenklichkeit des Impfstoffes sowie der Immunantwort nach der Impfung, wurden die Ferkel am 3. und 21. Lebenstag mit der einfachen vom Hersteller empfohlenen Impfdosis (1 ml resuspendierter Impfstoff bzw. 5×10^8 KBE *Salmonella-Typhimurium*-Mutante) oral geimpft. Der resuspendierte Impfstoff wurde mit einer 1 ml Einwegspritze über den Zungengrund schluckweise appliziert.

3.7 Versuchsanordnung

Für die zwei Versuche wurden die Ferkel von je 6 Jungsaugen in eine Kontrollgruppe und eine Impfgruppe mit jeweils 3 Würfen eingeteilt. Im Überdosisversuch umfasste die Impfgruppe (im folgendem Impfgruppe 1 genannt) zum Zeitpunkt der ersten Impfung 30 Ferkel und zum Zeitpunkt der zweiten Impfung 26 Ferkel. Die Kontrollgruppe (im Folgenden Kontrollgruppe 1 genannt) umfasste 18 Ferkel zu beiden Impfzeitpunkten. Im zweiten klinisch kontrollierten Versuch bestand die Impfgruppe (im Folgenden Impfgruppe 2 genannt) zum Zeitpunkt der ersten Impfung aus 32 Ferkeln, zum Zeitpunkt der zweiten Impfung aus 27 Ferkeln. Die Kontrollgruppe (im Folgendem Kontrollgruppe 2 genannt) bestand aus 28 Ferkeln zum ersten bzw. 23 Ferkeln zum 2. Impfzeitpunkt.

Tabelle 1: Einteilung der Versuchsgruppen nach Anzahl der Ferkel und Impfdosis.

Versuchsgruppe	Anzahl Ferkel am 3. Lebenstag I. vacc.	Anzahl Ferkel am 21. Lebenstag II. vacc.	Dosierung Impfstoff/Placebo
Impfgruppe 1 10fach überdosiert	30	26	10 ml Impfstoff (5×10^9 KbE)
Kontrollgruppe 1	18	18	10 ml physiologische NaCl-Lösung
Impfgruppe 2 einfach dosiert	32	27	1 ml Impfstoff (5×10^8 KbE)
Kontrollgruppe 2	28	23	1 ml physiologische NaCl-Lösung

3.8 Probennahme

3.8.1 Blutprobenentnahme

3.8.1.1 Blutprobenentnahme bei den Jungsauen

Blutproben wurden von allen Jungsauen der Impfgruppe 2, sowie der Kontrollgruppe 2 gewonnen. Die Blutprobenentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena jugularis externa*. Zur Blutentnahme wurden Monovetten[®] (No. 02.261, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) mit sterilen Einwegkanülen (TSK-Supra-Kanülen, 1,2 x 100 mm, Fa.TSK, Tochigi, Japan) gewonnen.

Tabelle 2: Blutentnahmezeitpunkte von den Jungsauen der Impf- und Kontrollgruppe 2

1. Blutprobenentnahme	vor dem Abferkeln
2. Blutprobenentnahme	nach dem Absetzen der Ferkel

3.8.1.2 Blutprobenentnahme bei den Ferkeln

Blutproben wurden von allen Ferkeln der Impfgruppe 2 und der Kontrollgruppe 2 entnommen. Bis einschließlich des 28. Lebensstages erfolgte die Entnahme der Blutproben durch Punktion der *Vena cava cranialis*. Ab einem Alter von 4 Wochen erfolgte die Entnahme der Blutproben durch Punktion der *Vena jugularis externa*. Zur Entnahme der Blutproben dienten Monovetten[®] (No. 02.261, Fa. Sarstedt, Nümbrecht). Bis zum Alter von 28 Tagen wurden die Blutproben mit Hilfe von Sterican[®]-Kanülen (Fa. Braun, Melsungen) der Größe 0,80 x 40 mm, ab der 4. Lebenswoche mit Sterican[®]-Kanülen der Größe 1.10 x 50 mm verwendet.

Tabelle 3: Blutentnahmezeitpunkte von den Ferkeln der Impf- und Kontrollgruppe 2

1. Blutprobenentnahme	vor der I. Vacc. am 3. Lebenstag
2. Blutprobenentnahme	vor der II. Vacc. am 21. Lebenstag
3. Blutprobenentnahme	zum Absetzzeitpunkt am 28. Lebenstag
4. Blutprobenentnahme	42. Lebenstag
5. Blutprobenentnahme	56. Lebenstag
6. Blutprobenentnahme	70. Lebenstag

Die Verarbeitung der Blutproben erfolgte am Tag der Gewinnung. Hierfür wurden sie nach vollständiger Gerinnung bei 3000 U/min zentrifugiert (Fa. Hettich, Rotixa/AP) und das so gewonnene Serum in 2 Portionen abportioniert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C in Polystyrol Rundbogenröhrchen tiefgefroren gelagert.

3.8.2 Kotproben

3.8.2.1 Kotproben von den Ferkeln

Von den Ferkeln beider Versuche wurden Sammelkotproben gewonnen und bakteriologisch auf Salmonellen untersucht. Hierzu wurden insgesamt mindestens 10 Gramm frisch abgesetzter Kot von möglichst allen Tieren jedes Wurfes in einem Kotbecher gesammelt und vermischt. Bei Auftreten von Durchfall wurden von den betroffenen Tieren zusätzlich jeweils zwei Kottupferproben zwecks differentialdiagnostischer Untersuchung genommen. Ein Tupfer wurde in eigenen Untersuchungen auf Salmonellen, der zweite im Institut für Hygiene und

Infektionskrankheiten der Tiermedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Gießen differentialdiagnostisch untersucht.

Tabelle 4: Entnahmezeitpunkte für Sammelkotproben bei den Ferkeln der Impfgruppe 1 und der Kontrollgruppe 1

1. Kotprobenentnahme	3. Lebenstag, vor der I. Vacc.
2. Kotprobenentnahme	21. Lebenstag, vor der II. Vacc.
3. Kotprobenentnahme	28. Lebenstag
4. Kotprobenentnahme	35. Lebenstag
5. Kotprobenentnahme	42. Lebenstag
6. Kotprobenentnahme	56. Lebenstag
7. Kotprobenentnahme	63. Lebenstag
8. Kotprobenentnahme	70. Lebenstag

Tabelle 5: Entnahmezeitpunkte für Sammelkotproben bei den Ferkeln der Impfgruppe 2 und der Kontrollgruppe 2

1. Kotprobenentnahme	3. Lebenstag, vor der I. Vacc.
2. Kotprobenentnahme	7. Lebenstag
3. Kotprobenentnahme	14. Lebenstag
4. Kotprobenentnahme	21. Lebenstag, vor der II. Vacc.
5. Kotprobenentnahme	28. Lebenstag
6. Kotprobenentnahme	35. Lebenstag
7. Kotprobenentnahme	42. Lebenstag
8. Kotprobenentnahme	49. Lebenstag
9. Kotprobenentnahme	56. Lebenstag
10. Kotprobenentnahme	63. Lebenstag
11. Kotprobenentnahme	70. Lebenstag

3.8.2.2 Kotproben von den Sauen

Von den Sauen der Impf- sowie der Kontrollgruppe 2 wurden Einzelkotproben von je 10 Gramm zur bakteriologischen Untersuchung auf Salmonellen gewonnen.

Tabelle 6: Entnahmezeitpunkte für Kotproben bei den Sauen der Impfgruppe 2 und der Kontrollgruppe 2

1. Kotprobenentnahme	14. Lebenstag der Ferkel
2. Kotprobenentnahme	21. Lebenstag der Ferkel
3. Kotprobenentnahme	28. Lebenstag der Ferkel

3.8.3 Euthanasie und Gewebeprobenentnahme

Um die Verteilung und die Dauer der Persistenz des Impfstammes in verschiedenen Organen des Organismus zu überprüfen, wurden von jeweils 2 Ferkeln der Impfgruppe 2 und der Kontrollgruppe 2 zu bestimmten Zeitpunkten nach Euthanasie Gewebeproben entnommen und bakteriologisch auf Salmonellen, insbesondere auf den Impfstamm, untersucht.

3.8.3.1 Euthanasie

Die Euthanasie erfolgte durch intravenöse Injektion mit Pento-Barbital-Natrium (Eutha[®]77, Essex Pharma GmbH). Bis zum Alter von 28 Tagen wurde in die *Vena cava cranialis*, ab der 4. Lebenswoche in die *Vena jugularis externa* injiziert. Zur Injektion dienten Einwegspritzen mit Sterican[®] Kanülen (Fa. Braun) der Größe 1.10 x 50 mm.

3.8.3.2 Gewebeprobenentnahme

Von jeweils 2 Ferkeln der Impfgruppe 2 und der Kontrollgruppe 2 wurden nach Euthanasie Gewebeproben entnommen und bakteriologisch auf Salmonellen untersucht. Folgende Organe wurden beprobt: Herz, Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskulatur, Dünndarm, Dickdarm, Blinddarminhalt und Lymphknoten (*Lymphonodi ileocolici*). Die Entnahme der Proben erfolgte am 3. und 7. Tag nach

der ersten Impfung und am 7. und 14. Tag nach der zweiten Impfung. Anschließend wurden die Gewebeproben wöchentlich entnommen, bis alle Proben an zwei aufeinander folgenden Probezeitpunkten bakteriologisch negativ auf Salmonellen getestet waren. Anschließend wurden die restlichen Ferkel der Versuchsgruppen euthanasiert und die entsprechenden Organproben wiederum bakteriologisch auf Salmonellen untersucht. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte direkt im Anschluss an die Euthanasie. Die zur Probengewinnung dienenden Instrumente wurden nach jeder Probe unter fließendem Wasser abgespült, getrocknet und anschließend mittels Ethanol abgeflammt. Die so gewonnenen Proben wurden einzeln in Kunststoffbechern zwischengelagert und anschließend direkt bakteriologisch weiterverarbeitet.

Tabelle 7: Beprobungszeitpunkte der Organe zur bakteriologischen Untersuchung, sowie Anzahl euthanasierter Ferkel pro Beprobungszeitpunkt

1. Gewebeprobenentnahme	3. Tag nach I. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
2. Gewebeprobenentnahme	7. Tag nach I. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
3. Gewebeprobenentnahme	7. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
4. Gewebeprobenentnahme	14. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
5. Gewebeprobenentnahme	21. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
6. Gewebeprobenentnahme	28. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
7. Gewebeprobenentnahme	35. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
8. Gewebeprobenentnahme	42. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
9. Gewebeprobenentnahme	56. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
10. Gewebeprobenentnahme	63. Tag nach II. Vacc.	2 Ferkel Kontrolle / 2 Ferkel Impfgruppe
11. Gewebeprobenentnahme	70. Tag nach II. Vacc.	5 Ferkel Kontrolle / 5 Ferkel Impfgruppe

Tabelle 8: Art und Reihenfolge der entnommenen Organproben pro Tier

1. Gewebeprobenentnahme	Skelettmuskulatur
2. Gewebeprobenentnahme	Herzmuskulatur
3. Gewebeprobenentnahme	Niere
4. Gewebeprobenentnahme	Lunge
5. Gewebeprobenentnahme	Leber
6. Gewebeprobenentnahme	Lnn. ileocolici
7. Gewebeprobenentnahme	Dickdarm
8. Gewebeprobenentnahme	Dünndarm
9. Gewebeprobenentnahme	Blinddarminhalt

3.9 Gewichtsentwicklung

Das Körpergewicht wurden bei allen Ferkeln beider Versuche bis zum Absetzen mit einem Alter von 28 Tagen wöchentlich gemessen. Die weiteren Gewichtskontrollen fanden in einem Abstand von 14 Tagen statt.

Tabelle 9: Wiegezeitpunkte in beiden Versuchen

1. Gewichtskontrolle	1. Lebenstag
2. Gewichtskontrolle	7. Lebenstag
3. Gewichtskontrolle	14. Lebenstag
4. Gewichtskontrolle	21. Lebenstag
5. Gewichtskontrolle	28. Lebenstag
6. Gewichtskontrolle	42. Lebenstag
7. Gewichtskontrolle	56. Lebenstag
8. Gewichtskontrolle	70. Lebenstag

3.10 Klinische Untersuchung der Ferkel

In beiden Versuchen wurden die Ferkel sowohl täglich, als auch gesondert in einem Zeitraum von 8 Stunden nach den Impfungen klinisch untersucht und beobachtet.

3.10.1 Tägliche Untersuchungen

Zu den täglichen Untersuchungen zählte die Kontrolle der Körpertemperatur, des Allgemeinbefindens und der Kotkonsistenz. Auffällige Tiere wurden einer genaueren klinischen Untersuchung unterzogen.

3.10.2 Untersuchungen Im Verlauf der Impfungen

In einem Zeitraum von 8 Stunden nach Impfstoffapplikation, bzw. nach Gabe des Placebo, wurden die Ferkel beider Versuche kontinuierlich beobachtet. Protokolliert wurden die Säugehäufigkeit, die Kotkonsistenz und das Verhalten der Ferkel. Zusätzlich wurde die Körpertemperatur vor den Impfungen, sowie 2, 4, 6 und 8 Stunden nach den Impfungen gemessen. Für die Messung der Körpertemperatur wurden Microlife® VT 1831vet-Temp. Thermometer (Microlife® Corporation) verwendet. Dabei wurde für jeden Messvorgang eine neue Thermometerhülle (Servoprax® GmbH) verwendet.

Tabelle 10: Untersuchungsparameter innerhalb von 8 Stunden nach der Impfstoffapplikation

Körpertemperatur	vor der Vacc., 2, 4, 6, und 8 Stunden nach der Vacc.
Säugehäufigkeit	Kontinuierlich innerhalb von 8 Stunden nach der Vacc.
Kotkonsistenz	Kontinuierlich innerhalb von 8 Stunden nach der Vacc.
Verhalten	Kontinuierlich innerhalb von 8 Stunden nach der Vacc.

3.11 Bakteriologische Untersuchungen

3.11.1 Bakteriologische Untersuchung der Sammelkotproben.

Für die bakteriologische Untersuchung der Sammelkotproben von den Ferkeln wurden 10 Gramm Sammelkot von jedem einzelnen Wurf durchmischt und in einen mit 90 ml Tetrathionat Bouillon nach Kauffmann (Tetrathionat Lösung Basis, Fa. Oxoid CM 343) gefüllten Glaskolben verbracht und verrührt. Die Glaskolben wurden mit einem Aluminiumdeckel verschlossen und bei 37°C für 24 Std. aerob inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben nach leichtem Aufschütteln des Bodensatzes mittels fraktioniertem Drei-Ösen-Ausstrich direkt auf 2 verschiedene Selektivnährböden ausgestrichen. Als Nährböden dienten Rambach Agar (Fa. Merck 1.07500 und Rambach Agar Supplement Fa. Merck 1.07500) und BPLS Agar (Fa. Merck 1.07237). Als Positivkontrolle diente nach gleicher Methode ausgestrichener resuspendierter Impfstoff. Die ausgestrichenen Platten wurden für 24 Std. bei 37°C aerob bebrütet. Zur Auswertung der Ausstriche wurden die Kolonien der Versuchsplatten mit denen der Positivkontrolle verglichen. Sowohl salmonellenverdächtige Kolonien der Testplatten, als auch der Positivkontrolle wurden mit physiologischer NaCl- Lösung und omnivalentem Testserum (*Salmonella* Test Sera Omnivalent/Polyvalent, Fa. Dade Behring Marburg GmbH) agglutiniert. Von Kolonien mit positiver Objektträgeragglutination wurden Reinkulturen angezüchtet. Hierfür wurde Bakterienmaterial von der entsprechenden Kolonie wiederum auf Rambach- und BPLS- Agar mit fraktioniertem Drei-Ösen-Ausstrich ausgestrichen und erneut für 24 Std. bei 37°C aerob bebrütet. Salmonellentypisches Wachstum der Kolonien und ein positives Ergebnis bei Objektträgeragglutination wurde als salmonellenpositives Ergebnis gewertet. Salmonellenpositive Kolonien wurden zwecks Unterscheidung zwischen Impf- oder Feldstamm in *Salmonella* Diagnostikum (IDT *Salmonella* Diagnostikum, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) überimpft und nach Anleitung bewertet.

3.11.2 Untersuchung der Kottupferproben

Die zu untersuchenden Kottupfer wurden in mit 10ml Tetrathionat-Lösung nach Müller-Kaufmann (Oxoid GmbH) gefüllte Röhrchen verbracht, mit Hilfe eines

Schüttlers durchmischt und bei 37°C für 24 Std. aerob inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht der Untersuchung der Sammelkotproben.

3.11.3 Untersuchung der Organproben

Von den entnommenen Organproben wurden jeweils 1-2 Gramm Material abgewogen und in ca. Reiskorngröße Stückchen zerteilt. Das hierfür gebrauchte Werkzeug wurde zwischen jeder Probe trocken gereinigt und mittels Ethanol abgeflammt. Die so gewonnenen Proben wurden zur Voranreicherung in 10 ml gepuffertes Peptonwasser (Fa. Merck 1.07228) verbracht und für 24 Std. bei 37°C aerob inkubiert. Anschließend wurde nach leichtem Aufschütteln des Probenmaterials 100µl der inkubierten Voranreicherung in 9 ml Rappaport Vassiliadis Anreicherungsbouillon (Fa. Merck 1.07700) überimpft. Diese wurde nach 24 sowie 48 Std. Inkubationszeit bei 37°C, sowie 5 Tage bei 20°C aerob inkubiert und jeweils mit fraktioniertem 3-Ösen-Ausstrich auf Rambach-, sowie BPLS- Agar ausgestrichen. Als Positivkontrolle diente auf gleiche Weise ausgestrichener, resuspendierter Impfstoff. Das weitere Vorgehen entspricht der Untersuchung der Sammelkotproben.

3.12 Serologische Untersuchungen

Die Untersuchung der Serumproben wurde mit dem SALMOTYPE® Pig Screen Plus ELISA (Labor Diagnostik Leipzig) von dem Labor der Labor Diagnostik Leipzig durchgeführt. Dieses Testsystem dient der quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Salmonellen in Fleischsaft-, Serum- oder Plasmaproben von Schweinen. Dieser ELISA ist in der Lage verschiedene Antikörperisotypen zu erkennen. Es erfolgt eine Ein-Punktbestimmung, bei der ein Konjugatmix aus relevanten *Salmonella*-Antikörperisotypen IgM, IgG, IgA genutzt wird, welches in ausgewogenen Teilen zusammengestellt ist. Erfasst werden Antikörper gegen die O-Antigene 1, 4, 5, 6, 7 und 12. Auf einer mit Salmonellenantigen beschichteten Mikrotiterplatte binden spezifische Antikörper und bilden mit dem Antigen einen Komplex. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Antikörper-Enzymkonjugat bindet an die antigengebundenen Proben-Antikörper. Ungebundenes Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Enzymsubstrat-Chromogenlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch das antikörpergebundene Enzym. Die Farbreaktion korreliert mit der Konzentration der

anti-*Salmonella*-Antikörper in der Probe. Für die Auswertung sind die Mittelwerte (MW) der gemessenen OD der Negativkontrolle (NK) und der Positivkontrolle (PK) zu ermitteln und der Proben-OD%-Wert nach der folgenden Formel zu berechnen:

$$\text{Proben-OD\%-Wert} = (\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}) / (\text{MW OD}_{\text{PK}} - \text{MW OD}_{\text{NK}}) \times 72,1 \text{OD\%}$$

Für die Bestandsbewertung nach Vorbild der ersten Stufe des Dänischen und Deutschen Monitoringprogrammes sind Proben mit OD%-Werten ≥ 40 als positiv zu bewerten.

Für die Bewertung des Salmonellengeschehens in Beständen sind die Proben laut Herstellerangaben wie folgt zu bewerten:

OD%-Wert < 10	negativ
OD%-Wert 10 bis < 20	fraglich
OD%-Wert >20	positiv

3.13 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels chi-Quadrat oder T-Test. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte für die Parameter Gewicht, Häufigkeiten klinischer Beobachtungen und Temperaturerhöhungen, sowie Häufigkeit von ungeformten Kot im gesamten Versuchszeitraum, im Vergleich zwischen Impf- und Kontrollgruppe. Innerhalb einer Versuchsgruppe wurden Signifikanzen für die Temperaturdifferenzen von vor, bis 24 Stunden nach der Impfstoffapplikation errechnet. Für die statistische Auswertung der Serologie wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Applikation einer 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] am 3. Lebenstag

Zum Zeitpunkt der Impfung waren alle Ferkel der Impfgruppe, sowie der Kontrollgruppe klinisch gesund und wurden in den Versuch miteinbezogen. Die Ferkel einer Jungsau der Kontrollgruppe wurden auf Grund von Agalaktie der Sau aus dem Versuch herausgenommen.

4.1.1 Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach oraler Verabreichung einer 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] am 3. Lebenstag

4.1.1.1 Klinische Beobachtungen

4.1.1.1.1 Impfgruppe

Innerhalb des Untersuchungszeitraums konnten keine direkt auf die Impfung zurückzuführenden Überreaktionen oder Todesfälle beobachtet werden. Bei drei Ferkeln der Impfgruppe zeigte sich eine Steigerung der Atemfrequenz, Durchfall und Lethargie.

4.1.1.1.2 Kontrollgruppe

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums keine klinisch auffälligen Symptome.

Tabelle 11: Klinische Symptome innerhalb von 8 Stunden nach 10facher Überdosierung von Salmoporc[®] am 3. Lebenstag

Gruppe	DF	DF in %	AE	AE in %	LE	LE in %
Verum	3	10 %	3	10 %	3	10 %
Kontrolle	0	0 %	0	0 %	0	0 %

Durchfall (DF); Atemfrequenzerhöhung (AE); Lethargie (LE)

4.1.1.2 Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc[®] am 3. Lebenstag

Die Körpertemperatur wurde direkt vor, sowie 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Applikation der 10fachen Überdosierung gemessen.

In Abbildung 1 ist der Verlauf die mittlere Körpertemperatur bis 24 Std. nach der oralen Überdosierung von Salmoporc[®] am 3. Lebenstag dargestellt.

4.1.1.2.1 Impfgruppe

Der höchste Wert der Körpertemperatur konnte in der Impfgruppe 6 Stunden nach der oralen Applikation der Überdosis mit 40,5°C gemessen werden. In Tabelle 12 sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen, sowie die Maxima und Minima der Körpertemperatur zu den jeweiligen Messzeitpunkten innerhalb des Untersuchungszeitraums dargestellt.

Eine signifikante Erhöhung des Mittelwerts der Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung war 2, 4, 6 und 8 Stunden nach der Überdosierung nachweisbar. 24 Stunden nach der Impfung sank der Temperaturwert wieder auf das Ausgangsniveau von vor der Impfung zurück. Abbildung 2 zeigt die Mittelwerte der Temperaturdifferenzen zum Ausgangswert vor der Überdosierung im Verlauf des Beobachtungszeitraums.

4.1.1.2.2 Kontrollgruppe

Der Maximalwert der Körpertemperatur in der Kontrollgruppe lag 4 Stunden nach der oralen Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung bei 40,2°C. Signifikante Veränderungen der Körpertemperatur innerhalb des Untersuchungszeitraums konnten nicht festgestellt werden. Tabelle 13 gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die maximalen und minimalen Körpertemperaturen zu den jeweiligen Messzeitpunkten wieder.

Tabelle 12: Temperaturminima und -maxima in der Impfgruppe innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Impfgruppe	ante Vacc.	39,310	,4342	37,9	40,2
	2 Std. post Vacc	39,660	,4256	38,4	40,4
	4 Std. post Vacc.	39,700	,3769	38,5	40,4
	6 Std. post Vacc.	39,707	,4315	38,1	40,5
	8 Std. post Vacc.	39,593	,2778	39,1	40,1
	24 Std. post Vacc.	39,34	,456	38	40

Tabelle 13: Temperaturminima und -maxima in der Kontrollgruppe innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach oraler Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	ante Vacc.	39,433	,1715	39,1	39,7
	2 Std. post Vacc	39,378	,2691	38,7	39,9
	4 Std. post Vacc.	39,394	,2667	39,0	40,2
	6 Std. post Vacc.	39,372	,2492	39,1	39,8
	8 Std. post Vacc.	39,383	,1948	39,0	39,7
	24 Std. post Vacc.	39,39	,149	39	40

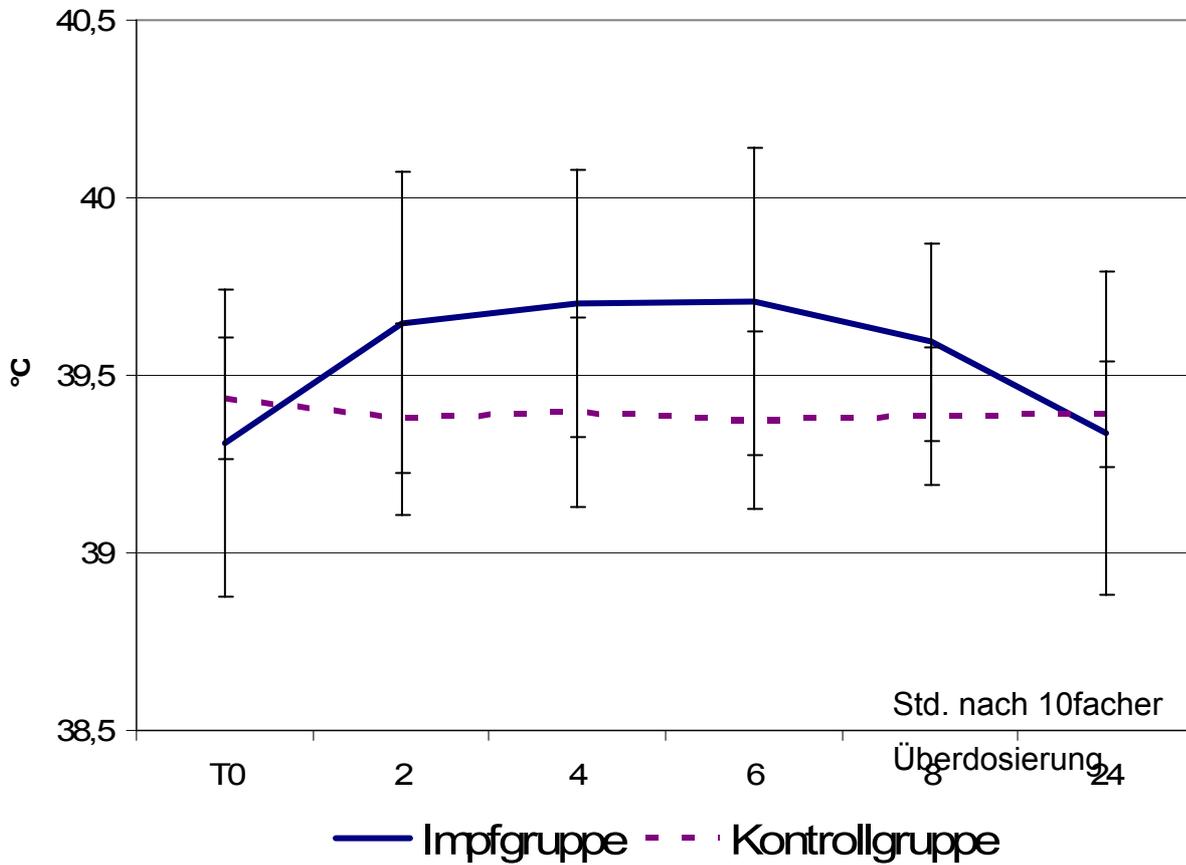


Abbildung 1: Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmopor[®] bzw. oraler Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag. Mittelwerte mit Standardabweichungen von Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich

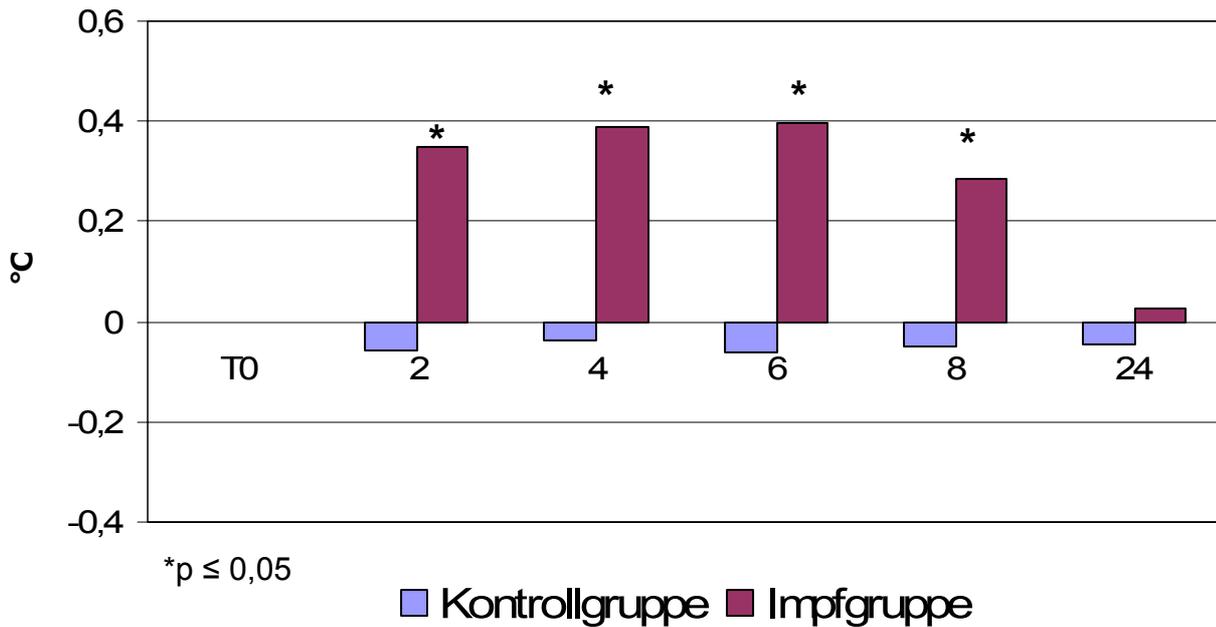


Abbildung 2: Mittelwerte der Differenzen in der Körpertemperatur zum Ausgangswert T0 vor der Impfung im Verlauf von 8 Stunden nach oraler Applikation der 10fachen Überdosis von Salmoporc® bzw. 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag. Mittelwerte von Kontrollgruppe und Impfgruppe im Vergleich

4.1.1.3 Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag, Tiere mit Fieber

4.1.1.3.1 Impfgruppe

Nach der 10fachen oralen Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag, zeigten signifikant mehr Ferkel eine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C. 30% der Ferkel lagen dabei in einem Bereich einer Temperaturerhöhung bis 0,5°C. Eine Körpertemperaturerhöhung zwischen 0,5 -1°C wurde bei 10% der Ferkel festgestellt. Bei den übrigen 60% der Tiere wurde keine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C gemessen.

4.1.1.3.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe lagen 11% der Ferkel im Bereich einer Temperaturerhöhung bis 0,5°C über 39,8°C. 89% von den Ferkeln der Kontrollgruppe zeigten keine Temperaturerhöhung über 39,8°C.

Tabelle 14: Anzahl der Ferkel mit Temperaturerhöhung über 39,8°C nach 10facher Überdosierung von Salmoporc® am 3. Lebenstag

°C ≥ 39,8°C	bis 0,5°C (bis 40,3°C)	0,5 - 1,0°C (bis 40,8°C)	1,0 - 1,5°C (bis 41,3°C)	1,5 – 2,0°C (bis 41,8°C)	Gesamt ≥ 39,8°C
Kontrollgruppe	2	0	0	0	2
%	11 %	0 %	0 %	0 %	11 %
Impfgruppe	9	3	0	0	12
%	30 %	10 %	0 %	0 %	40 %*

*p ≤ 0,05

4.1.1.4 Säugehäufigkeit

4.1.1.4.1 Impfgruppe

Die Ferkel der Impfgruppe gingen im Beobachtungszeitraum von 8 Stunden nach der oralen Verabreichung des 10fachen der normalen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag zwischen 11 und 7 mal zum Säugen. Die genaue Verteilung der Säugehäufigkeit gibt Tabelle 15 wieder.

4.1.1.4.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe gab es keine Unterschiede in der Säugehäufigkeit. 100 % der Ferkel gingen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach der oralen Applikation von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung 10 mal zum Säugen.

Tabelle 15: Verteilung der Säugehäufigkeit von Impf- und Kontrollgruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc[®] bzw. Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

Säugehäufigkeit	11	10	9	8	7
Kontrollgruppe	0	18	0	0	0
%	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %
Impfgruppe	19	0	0	10	0
%	63 %	0 %	0 %	33 %	3 %

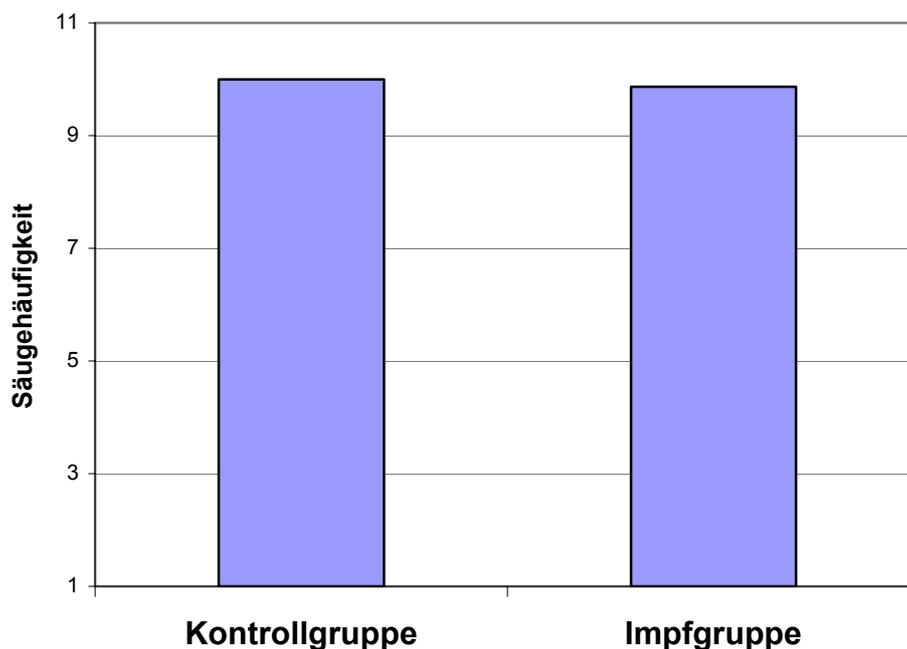


Abbildung 3: Säugehäufigkeit innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach Verabreichung einer 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] bzw. von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

4.2 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oralen Applikation einer 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] am 21. Lebenstag

Im Zeitraum zwischen der 1. Überdosierung am 3. Lebenstag, bis zur zweiten Überdosierung am 21. Lebenstag von Salmoporc[®] sind insgesamt 4 Ferkel aus zwei Würfen der Impfgruppe verstorben.

1. Tod durch stumpfes Trauma (Erdrücken von der Muttersau) am 5. Lebenstag
2. Euthanasie nach Kümmern am 9. Lebenstag. Nachweis von *E. coli* in septikämischer Verbreitung und *Clostridium perfringens* aus dem Dünndarm. Salmonellen konnten nicht nachgewiesen werden.
3. Euthanasie nach Kümmern am 15. Lebenstag. Nachweis von hämolysierenden *E. coli* im Darm, sowie *Staphylococcus hyicus* in septikämischer Verbreitung. Salmonellen konnten nicht nachgewiesen werden.
4. Euthanasie nach Kümmern am 15. Lebenstag. Nachweis von *Staphylococcus aureus* in der Lunge. Salmonellen konnten nicht nachgewiesen werden.

Alle anderen Ferkel der Impfgruppe sowie der Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt der Überdosierung am 21. Lebenstag klinisch gesund und wurden in den Versuch mit einbezogen

4.2.1 Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach oraler Verabreichung einer 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] am 21. Lebenstag

4.2.1.1 Klinische Beobachtungen

4.2.1.1.1 Impfgruppe

Innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Stunden nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] konnte bei den Tiere der Impfgruppe eine stärkere Reaktion auf die Überdosierung beobachtet werden, als nach der Überdosierung am 3. Lebenstag. In Tabelle 16 ist die Häufigkeit der aufgetretenen klinischen Symptome in Form von Lethargie, Atemfrequenzerhöhung sowie leichtem Durchfall dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine gesteigerte Atemfrequenz und Lethargie bei den Ferkeln der Impfgruppe signifikant häufiger beobachtet.

4.2.1.1.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurde bei keinem Ferkel Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens festgestellt.

Tabelle 16: Beobachtete klinische Symptome im Verlauf von 8 Stunden nach 10facher oraler Überdosierung von Salmopor[®] bzw. Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

Gruppe	DF	DF in %	AE	AE in %	LE	LE in %
Impfgruppe	2	7,4 %	12	44,4 %*	9	32,1 %*
Kontrollgruppe	0	0 %	0	0 %	0	0 %

Durchfall (DF); Atemfrequenzerhöhung (AE); Lethargie (LE)

*p ≤ 0,05

4.2.1.2 Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach 10facher oraler Überdosierung von Salmopor[®] am 21. Lebenstag

Die Körpertemperatur wurde direkt vor, sowie 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Applikation der 10fachen Überdosis gemessen. Eine graphische Darstellung des Verlaufs der Mittelwerte der Körpertemperatur im Untersuchungszeitraum ist in Abbildung 4 zu sehen.

4.2.1.2.1 Impfgruppe

Der maximale Wert der Körpertemperatur in der Impfgruppe wurde mit 41,7°C, 6 Stunden nach der Überdosierung gemessen. In Tabelle 17 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen, sowie der höchste und niedrigste Wert der Körpertemperatur zum jeweiligen Messzeitpunkt dargestellt.

Eine signifikante Erhöhung des Mittelwerts der Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert T₀ vor der Impfung konnte 2, 4, 6 und 8 Stunden nach der Verabreichung der Überdosis nachgewiesen werden. 24 Stunden nach der Impfung sank die Temperatur wieder auf das Ausgangsniveau vor der Impfung zurück.

Abbildung 5 zeigt die mittleren Abweichungen der Körpertemperatur im Verlauf des Untersuchungszeitraums zum Ausgangsniveau vor der Impfung von Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich.

4.2.1.2.2 Kontrollgruppe

Der Maximalwert der Körpertemperatur in der Kontrollgruppe lag bei 40,5°C, 8 Stunden nach der Applikation von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung. 2 bzw. 4 Stunden nach der Verabreichung sank der Mittelwert der Körpertemperatur im

Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung signifikant. Tabelle 18 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen und die maximalen sowie minimalen Körpertemperaturwerte zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

Tabelle 17: Temperaturminima und -maxima innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach oraler Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Impfgruppe	ante Vacc.	39,37	,358	39	40
	2 Std. post Vacc	39,76	,435	39	41
	4 Std. post Vacc.	40,18	,7658	38,9	41,6
	6 Std. post Vacc.	40,31	,7915	39,2	41,7
	8 Std. post Vacc.	40,03	,5829	39,1	41,1
	24 Std. post Vacc.	39,47	,3996	38,8	40,3

Tabelle 18: Temperaturminima und -maxima innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach oraler Applikation von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	ante Vacc.	39,53	,270	39	40
	2 Std. post Vacc	39,29	,262	39	40
	4 Std. post Vacc.	39,35	,2684	39,1	40,1
	6 Std. post Vacc.	39,48	,3394	38,7	40,1
	8 Std. post Vacc.	39,62	,3116	39,2	40,5
	24 Std. post Vacc.	39,47	,3318	39,0	40,1

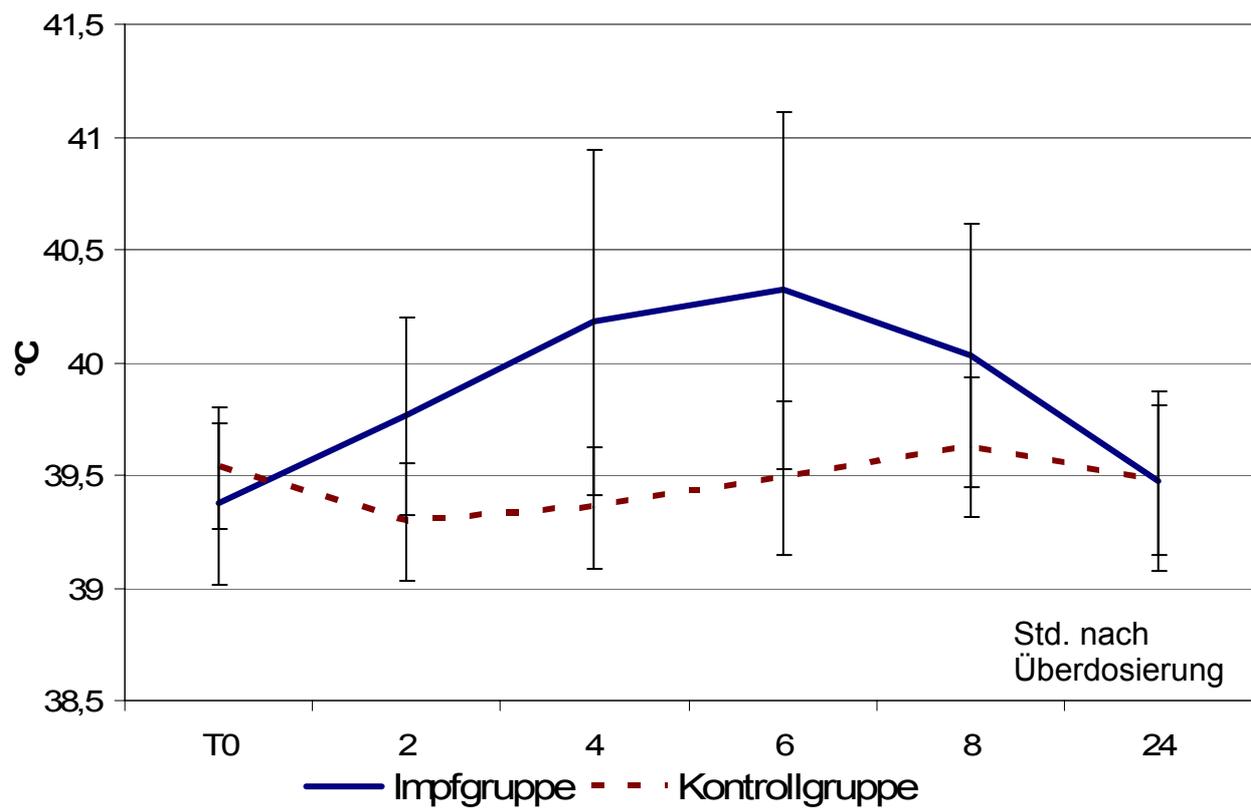


Abbildung 4: Temperaturverlauf innerhalb von 24 Std. nach 10facher Überdosierung mit Salmoporc[®] bzw. Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag.

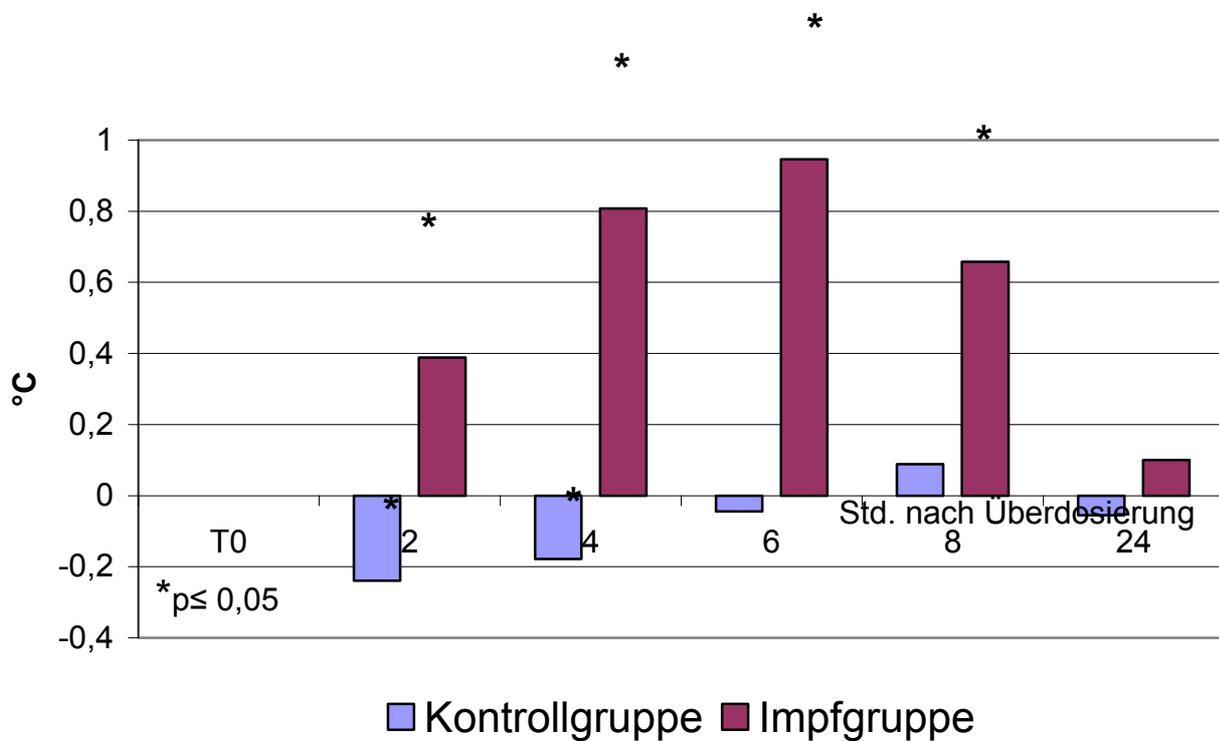


Abbildung 5: Temperaturdifferenzen zum Ausgangswert T0 vor der Impfung nach 10facher Überdosierung mit Salmoporc[®], bzw. Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag. Mittelwerte von Kontrollgruppe und Impfgruppe im Vergleich.

4.2.1.3 Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc[®] am 21. Lebenstag, Tiere mit Fieber

4.2.1.3.1 Impfgruppe

Insgesamt wurde bei 69% der Ferkel der Impfgruppe im Verlauf von 8 Stunden nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] eine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C ermittelt. Die genaue Verteilung der Temperaturerhöhungen ist in Tabelle 19 dargestellt.

4.2.1.3.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe zeigten im Verlauf des gleichen Untersuchungszeitraums 16% der Ferkel eine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C.

Tabelle 19: Anzahl von Ferkel der Kontroll- und Impfgruppe mit Temperaturerhöhung über 39,8°C nach 10facher Überdosierung von Salmoporc® am 21. Lebenstag, Tiere mit Fieber

°C ≥ 39,8	bis 0,5°C (bis 40,3°C)	0,5 - 1,0°C (bis 40,8°C)	1,0 - 1,5°C (bis 41,3°C)	1,5 – 2,0°C (bis 41,8°C)	Gesamt ≥ 39,8°C
Kontrollgruppe	2	1	0	0	3
%	11 %	6 %	0 %	0 %	17 %
Impfgruppe	5	6	3	4	18
%	19 %	23 %	12 %	15 %	69 %*

*p ≤ 0,05

4.2.1.4 Säugehäufigkeit

4.2.1.4.1 Impfgruppe

Nach der 10fachen oralen Überdosierung von Salmoporc® am 21. Lebenstag zeigten sich deutliche Unterschiede in der Säugehäufigkeit bei den Ferkeln der Impfgruppe. 31% der mit Salmoporc® überdosierten Ferkel lagen bei einer Säugehäufigkeit von ≥ 8 x Säugen, 69% bei einer Säugehäufigkeit von ≤ 7. Tabelle 20 gibt die genaue Verteilung der Säugehäufigkeit von Impf- und Kontrollgruppe wieder.

4.2.1.4.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe gingen 56% der Ferkel 8 mal sowie 44% der Ferkel 10 mal zum Säugen.

Tabelle 20: Säugehäufigkeit von Kontrollgruppe und Impfgruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach 10facher oraler Überdosierung von Salmoporc® bzw. Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

Säugehäufigkeit	11	10	9	8	7	6	5	4	3
Kontrollgruppe	0	8	0	10	0	0	0	0	0
%	0%	44%	0%	56%	0%	0%	0%	0%	0%
Impfgruppe	0	1	2	5	5	5	5	1	2
%	0%	4%	8%	19%	19%	19%	19%	4%	8%

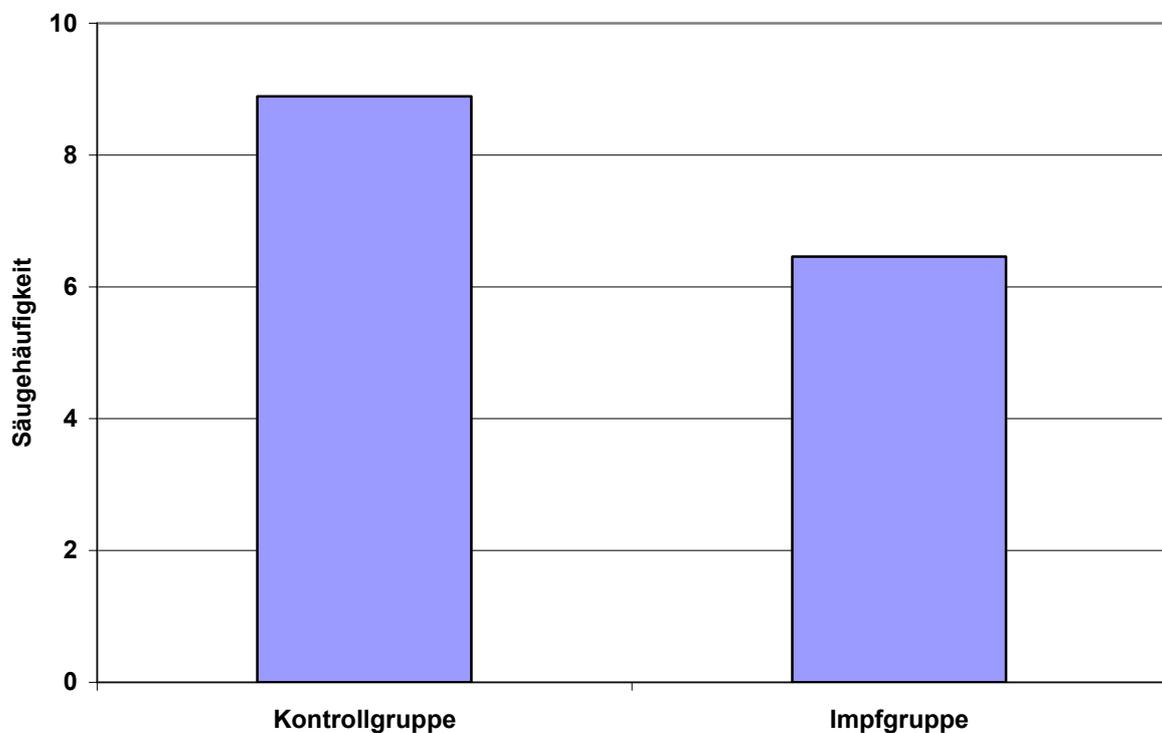


Abbildung 6: Mittlere Säugehäufigkeit innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Stunden nach oraler Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc® bzw. 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

4.2.2 Ergebnisse über den Untersuchungszeitraum von 70 Tagen

4.2.2.1 Gewichtsentwicklung

Zu Beginn der Untersuchungen bestand kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der Geburtsgewichte der Ferkel beider Versuchsgruppen. Wie aus Tabelle 21 ersichtlich bestand 4 Tage nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis des Impfstoffs am 3. Lebenstag ein signifikanter Unterschied im mittleren Körpergewicht zu Gunsten der Ferkel aus der Kontrollgruppe. Diese Signifikanz in der Differenz im Mittel des Körpergewichts blieb bis zum Versuchsende mit einem Alter von 10 Wochen bestehen. In Tabelle 22 sind die täglichen Gewichtszunahmen vom Zeitpunkt der Geburt, bis zum Absetzen in einem Alter von 28 Tagen, sowie nach dem Absetzen bis zum Einstellen in die Mast mit 10 Wochen Alter in der Impf- und Kontrollgruppe dargestellt. Demnach besteht im erstgenannten Zeitraum ein Unterschied von plus 57,4 Gramm / Tag und im zweiten Zeitraum ein Plus von 112,8 Gramm / Tag zu Gunsten der Kontrollgruppe. Abbildung 7 gibt die Entwicklung des Körpergewichts von Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen wieder. Es ist ein deutliches Auseinanderwachsen zwischen Impf- und Kontrollgruppe zu erkennen. Der größte Gewichtsunterschied entwickelte sich nach dem Absetzen.

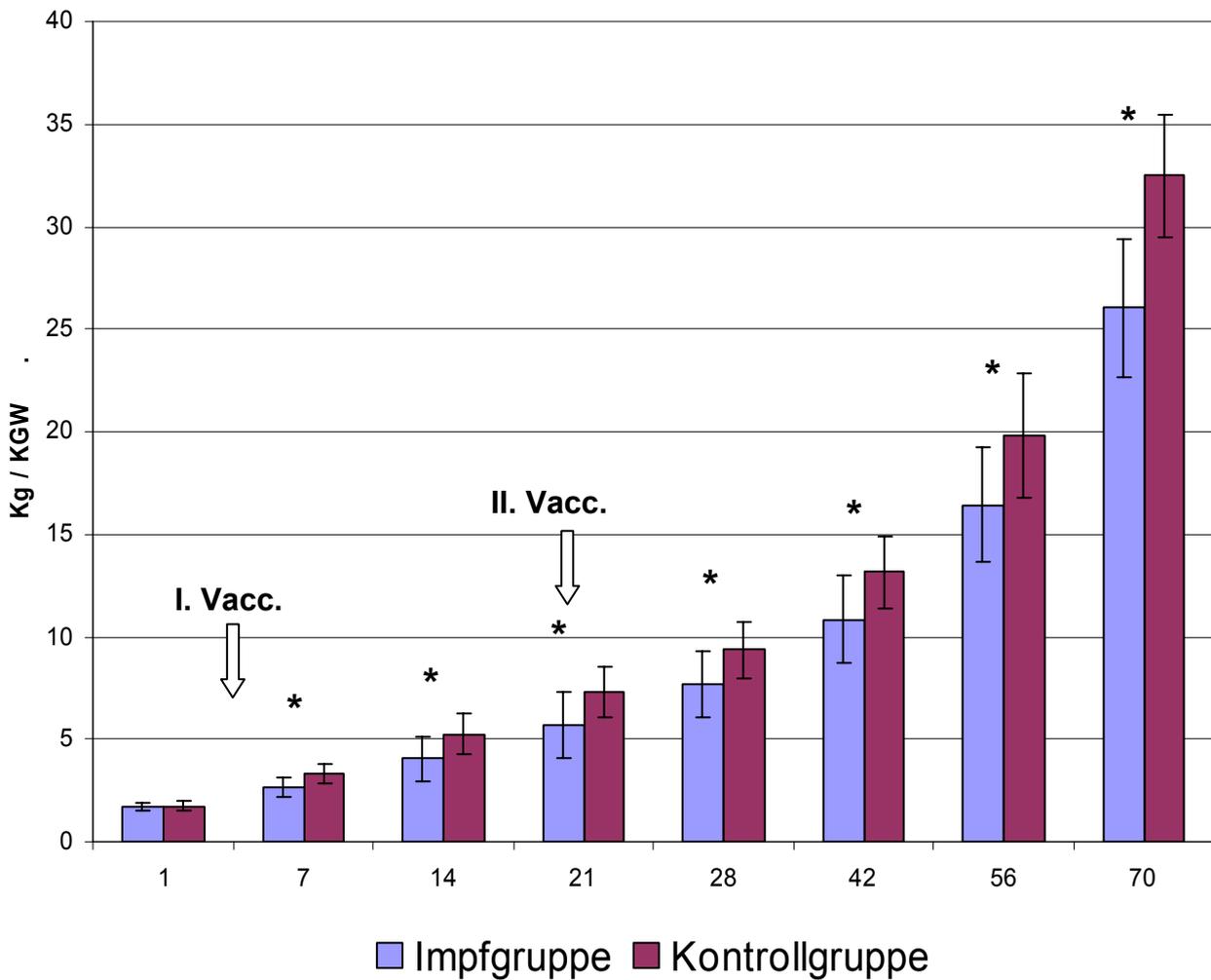
Tabelle 21: Entwicklung des mittleren Körpergewichts mit Standardabweichungen nach 10facher Überdosierung von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag

Alter in Tagen	Mittleres Gewicht Impfgruppe	SD	Mittleres Gewicht Kontrollgruppe	SD	Differenz von Impf- zur Kontrollgruppe
1	1,68	0,195	1,74	0,273	-0,06 kg
7	2,69	0,479	3,3	0,454	-0,61 kg*
14	4,0	1,056	5,24	0,997	-1,24 kg*
21	5,66	1,594	7,30	1,265	-1,64 kg*
28	7,68	1,594	9,35	1,381	-1,67 kg*
42	10,81	2,139	13,14	1,746	-2,33 kg*
56	16,44	2,816	19,81	3,019	-3,37 kg*
70	26,05	3,373	32,46	3,019	-6,41 kg*

*p ≤ 0,05

Tabelle 22: Durchschnittliche Tageszunahmen in Gramm, von Geburt bis zum Absetzen im Alter von 28 Tagen und vom Absetzen bis zum Einstellen in die Mast im Alter von 10 Wochen in die Mast im Alter von 10 Wochen

	1. bis 4. Lebenswoche	4. bis 10. Lebenswoche
Impfgruppe	214,3 Gramm / Tag	437,4 Gramm / Tag
Kontrollgruppe	271,7 Gramm / Tag	550,2 Gramm / Tag
Differenz	-57,4 Gramm / Tag	-112,8 Gramm / Tag



*p ≤ 0,05

Abbildung 7: Entwicklung des mittleren Körpergewichts von Kontrollgruppe und Impfgruppe im Zeitraum von Geburt bis zur zehnten Lebenswoche im Vergleich

4.2.2.2 Kotkonsistenz im Untersuchungszeitraum von 10 Wochen

Die Kotkonsistenz jedes Versuchstiers wurde gemeinsam mit der Erhebung der Körpertemperatur 50 Tage lang täglich bewertet. Abbildung 8 stellt die relative Häufigkeit vom Auftreten ungeformten Kots in der jeweiligen Versuchsgruppe dar. Über den 50. Lebenstag hinaus trat in keiner Versuchsgruppe mehr Durchfall auf.

4.2.2.2.1 Impfgruppe

Innerhalb von 14 Tagen nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] konnte in der Impfgruppe signifikant häufiger Durchfall beobachtet werden. Nach der Applikation der zweiten Überdosis am 21. Lebenstag ließ sich das Durchfallgeschehen nach der Impfstoffapplikation nicht reproduzieren. Bis zum Erreichen der 7. Lebenswoche kam bei unterschiedlichen Ferkeln der Impfgruppe unformter Kot vor. In den letzten drei Wochen des Untersuchungszeitraums wurde kein Durchfall mehr beobachtet. Aus Gründen der übersichtlicheren Darstellung wurde in Abbildung 8 auf die Darstellung der Häufigkeit von Durchfall über den 50. Lebenstag hinaus verzichtet.

4.2.2.2.2 Kontrollgruppe

Nach der oralen Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag trat bei keinem der Kontrolltiere Durchfall auf. Nach der oralen Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag zeigten einzelne Ferkel gelegentlich unformten Kot.

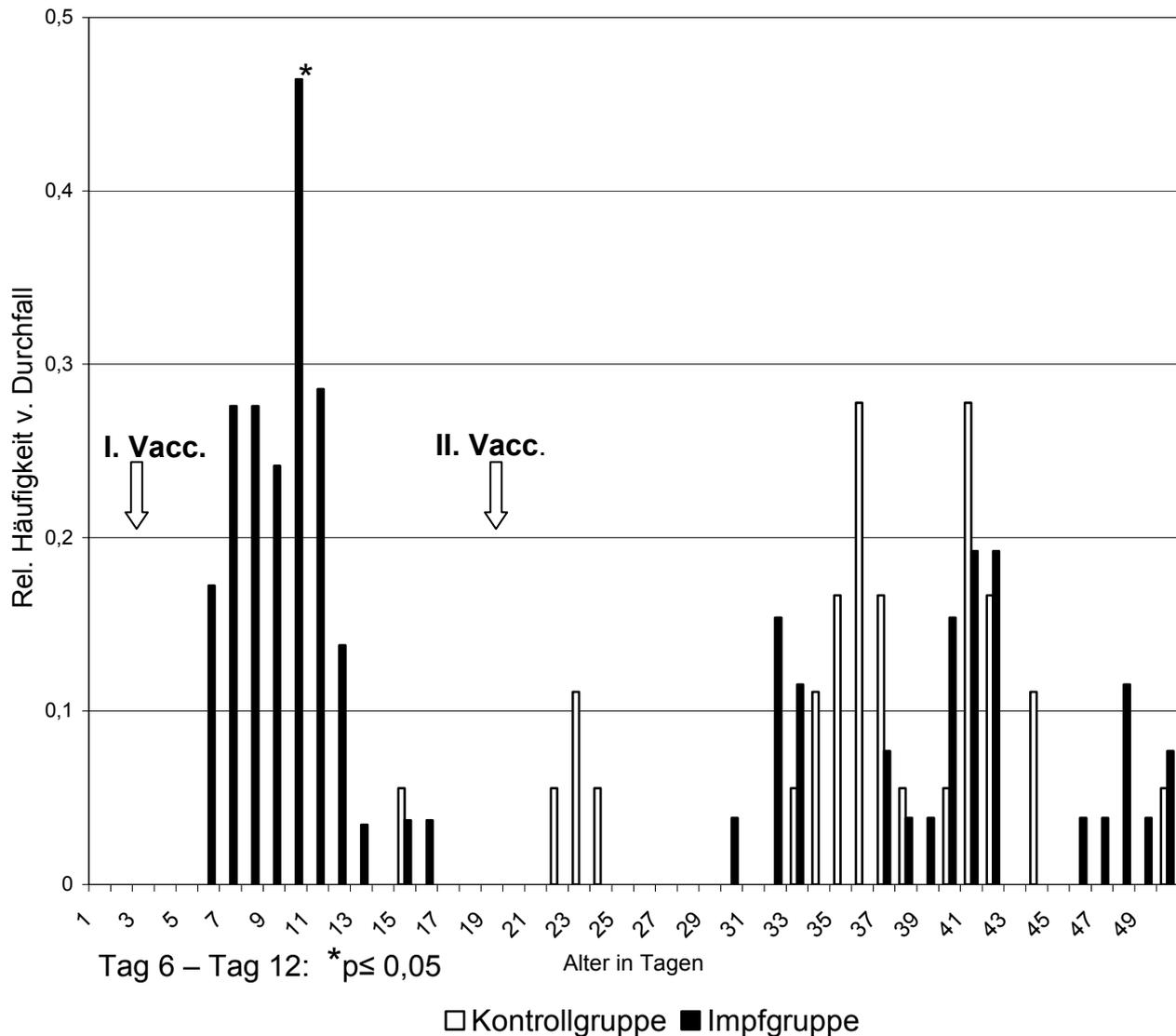
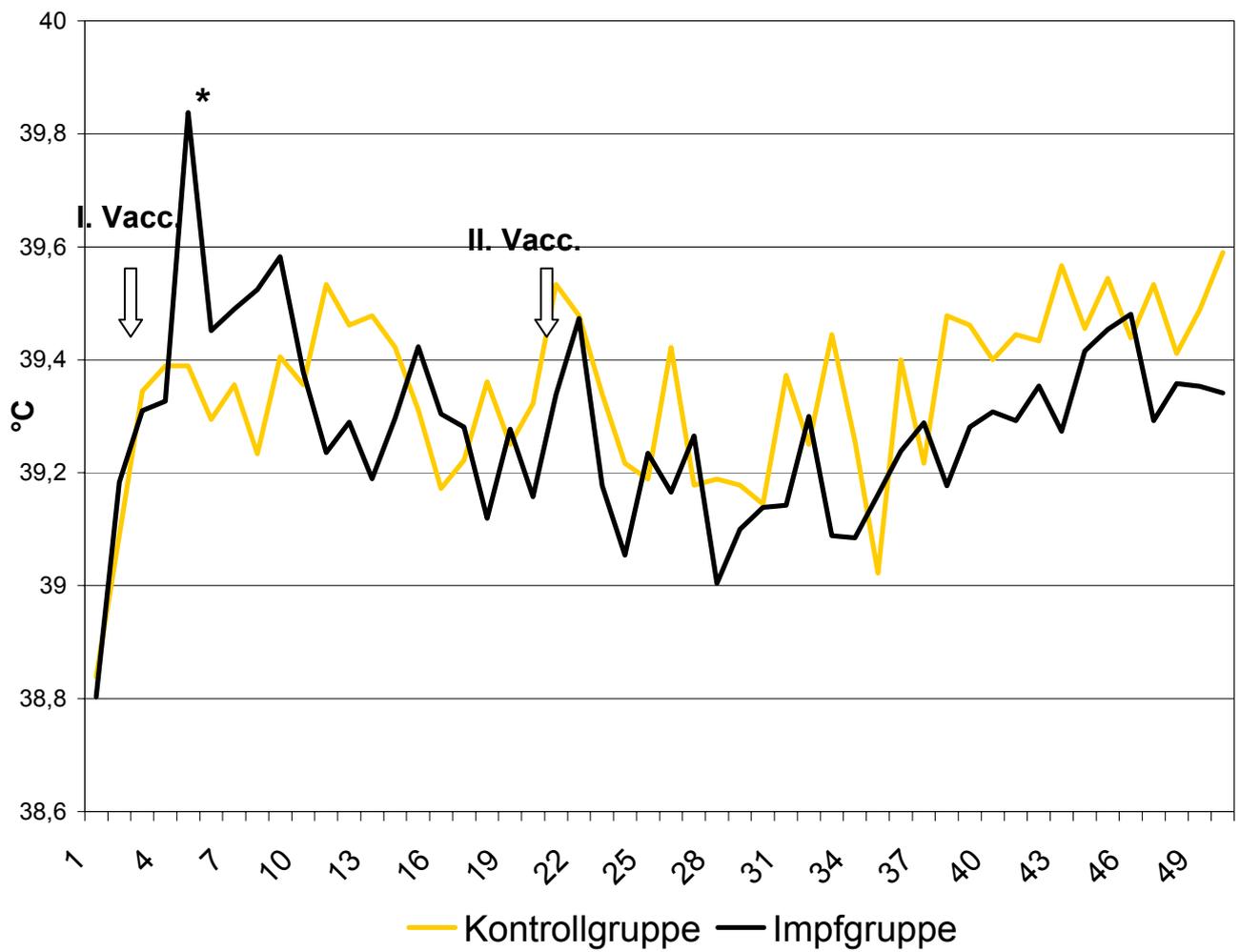


Abbildung 8: Relative Häufigkeit von Tieren mit Durchfall vom Zeitpunkt der Geburt bis zum 50. Lebenstag der Ferkel. Kontrollgruppe und Impfgruppe im Vergleich

4.2.2.3 Verlauf der Körpertemperatur vom Zeitpunkt der Geburt bis zum 50. Lebenstag

Die Körpertemperatur der Ferkel wurde jeweils morgens von Geburt an bis zum 50. Lebenstag gemessen. Wie in Abbildung 9 dargestellt zeigt sich zwei Tage nach der oralen Applikation der 10fachen Überdosis von Salmoporc® in der Impfgruppe eine signifikant höhere mittlere Körpertemperatur im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weitere Unterschiede im Bezug auf den Mittelwert der täglichen Körpertemperatur konnten bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht festgestellt werden.



Tag 6: * $p \leq 0,05$

Abbildung 9: Mittelwerte der täglichen Körpertemperatur von Kontroll- und Impfgruppe von Geburt bis zum 50. Lebenstag im Vergleich.

4.3 Bakteriologische Untersuchungen

4.3.1 Sammelkotproben Ferkel

Die jeweils erste Sammelkotprobe jedes einzelnen Wurfes wurde, um genügend Untersuchungsmaterial zu gewinnen, von der Geburt an bis kurz vor der ersten Behandlung über drei Tage hinweg gesammelt. Alle anderen Sammelkotproben wurden jeweils an einem Tag gewonnen. In Abbildung 10 ist die Anzahl impfstammpositiver Sammelkotproben für jeden Untersuchungszeitpunkt ersichtlich.

4.3.1.1 Impfgruppe

Aus den ersten Sammelkotproben vor der Überdosierung konnten bei keinem Wurf der Impfgruppe Salmonellen bakteriologisch nachgewiesen werden. 4 Tage nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis von Salmoporc® (7. Lebenstag der Ferkel) schieden allen drei Würfen der Impfgruppe den Impfstoff aus. Am 14. Lebenstag der Ferkel wurde bei zwei Würfen der Impfgruppe und am 21., 35., 49., 56., 63., und 70., Lebenstag je eine von drei Sammelkotproben positiv auf den Impfstamm getestet. Im gesamten Zeitraum wurde ausschließlich der Impfstamm nachgewiesen. Weitere Beprobungen über den Versuchszeitraum hinaus verliefen anschließend negativ. Der letzte impfstammpositive Befund stammte also aus der 7. Woche nach der zweiten Impfung.

4.3.1.2 Kontrollgruppe

Die bakteriologische Untersuchung der Sammelkotproben von den Ferkeln aus der Kontrollgruppe vor der ersten Verabreichung von 10 ml physiologischer NaCl-Lösung verlief wie in der Impfgruppe negativ. Aus den weiteren Sammelkotproben konnten zu keinem Zeitpunkt Salmonellen isoliert werden.

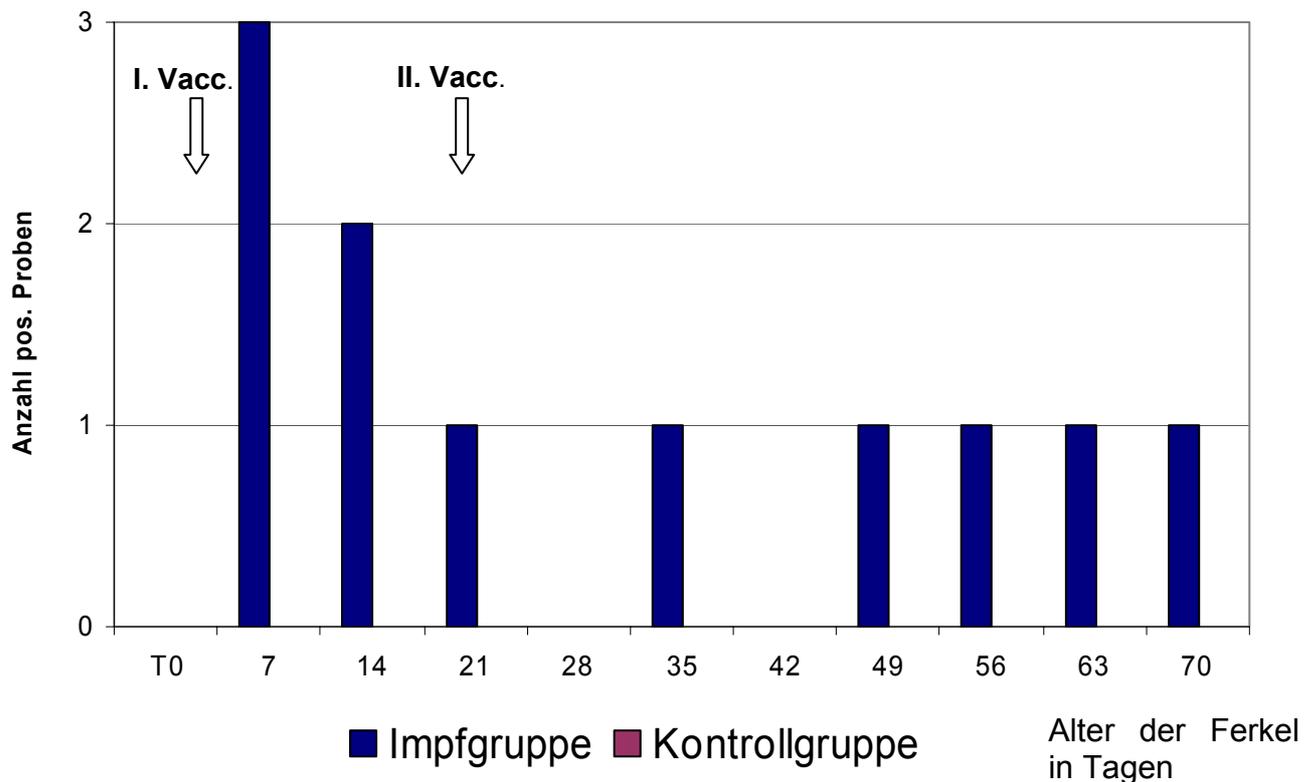


Abbildung 10: Anzahl Impfstammpositiver Sammelkotproben von den Würfen aus der Impfgruppe zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Die Sammelkotproben der Ferkel der Kontrollgruppe waren zu keinem der Untersuchungszeitpunkte positiv

4.3.1.3 Ergebnis der differentialdiagnostischen Untersuchung der Kottupferproben

In der Durchfallphase vom 3. bis 12. Tag nach der oralen Applikation der 10fachen Überdosis von Salmoporc[®] sind 11 Ferkel mit Durchfall doppelt mit Kottupfern beprobt worden. Ein Tupfer wurde in eigenen Untersuchungen auf Salmonellen untersucht, ein zweiter Tupfer zur differentialdiagnostischen Abklärung an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität nach Gießen versandt. Von diesen 11 Tupferproben konnten aus 8 Proben *Clostridium perfringens* vom Typ A nachgewiesen werden. Die eigenen Untersuchungen auf Salmonellen verliefen in fünf Fällen positiv, wobei aus allen 5 Proben nur der Impfstamm nachgewiesen wurde. Hämolisierende *E. coli* konnten in 3 Fällen nachgewiesen werden. Bei drei Ferkeln ohne Durchfall aus der Kontrollgruppe wurde ebenso verfahren. Bei keinem dieser Ferkel wurden Salmonellen nachgewiesen. *Clostridium perfringens* vom Typ A wurde jedoch bei allen drei Proben isoliert.

4.4 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Applikation einer einfachen Dosis von Salmopor[®] am 3. Lebenstag

Zum Zeitpunkt der Impfung waren die Ferkel der Impfgruppe sowie die Ferkel der Kontrollgruppe klinisch gesund. Es wurden alle neugeborenen Ferkel in den Versuch miteinbezogen.

4.4.1 Kontinuierliche Beobachtung innerhalb von 8 Std. nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmopor[®] am 3. Lebenstag

4.4.1.1 Klinische Beobachtungen

4.4.1.1.1 Impfgruppe

Innerhalb des Untersuchungszeitraums konnten keine direkt auf die Impfung zurückzuführenden Überreaktionen oder Todesfälle beobachtet werden. Bei jeweils 3 Ferkeln der Impfgruppe zeigte sich eine Steigerung der Atemfrequenz, Lethargie, sowie milder Durchfall.

4.4.1.1.2 Kontrollgruppe

Die Ferkel der Kontrollgruppe blieben während des gesamten Beobachtungszeitraums klinisch unauffällig.

Tabelle 23: Klinische Beobachtungen innerhalb von 8 Stunden nach oraler Verabreichung einer einfachen Dosis von Salmopor[®] bzw 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

Gruppe	DF	DF in %	AE	AE in %	LE	LE in %
Impfgruppe	3	9,1 %	3	9,1 %	3	9,1 %
Kontrollgruppe	0	0 %	0	0 %	0	0 %

Durchfall (DF); Atemfrequenzerhöhung (AE); Lethargie (LE)

4.4.1.2 Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmopor[®]

Die Körpertemperatur wurde direkt vor, sowie 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Applikation der einfach dosierten Impfstoffapplikation gemessen. Der Verlauf der mittleren Körpertemperatur über den Untersuchungszeitraum hinweg ist in Abbildung 11 dargestellt.

4.4.1.2.1 Impfgruppe

Der höchste Wert der Körpertemperatur wurde in der Impfgruppe sowohl 4 als auch 6 Stunden nach der Impfstoffapplikation mit 40,8°C gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie die jeweils höchsten und niedrigsten Körpertemperaturen zu den jeweiligen Messzeitpunkten lassen sich aus Tabelle 24 entnehmen.

In Abbildung 12 sind die mittleren Erhöhungen der Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung graphisch dargestellt. 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Vakzination war jeweils eine signifikante Erhöhung der mittleren Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert T_0 nachweisbar.

4.4.1.2.2 Kontrollgruppe

Der Maximalwert der Körpertemperatur in der Kontrollgruppe lag bei 40,1°C, 6 Stunden nach der Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung. Zwei Stunden nach der Verabreichung sank der Mittelwert der Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung signifikant ab, wohingegen nach 4 und 6 Stunden eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes der Körpertemperatur zum Ausgangswert vor der Impfung in der Kontrollgruppe beobachtet werden konnte.

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Temperaturminima und -maxima innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® am 3. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Impfgruppe	ante Vacc.	38,8	,655	36,8	39,8
	2 Std. post Vacc.	38,9	,756	36,4	40,2
	4 Std. post Vacc.	39,3	,579	38,1	40,8
	6 Std. post Vacc.	39,3	,349	38,3	40,0
	8 Std. post Vacc.	39,4	,627	37,6	40,8
	24 Std. post Vacc.	39,2	,567	37,0	39,9

Tabelle 25: Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Temperaturminima und -maxima innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach Gabe von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	ante Vacc.	39,2	,402	37,8	40,0
	2 Std. post Vacc.	38,9	,657	36,3	39,8
	4 Std. post Vacc.	39,0	,550	37,1	39,7
	6 Std. post Vacc.	39,4	,384	37,9	40,1
	8 Std. post Vacc.	39,4	,308	38,2	39,8
	24 Std. post Vacc.	39,4	,507	38,6	39,9

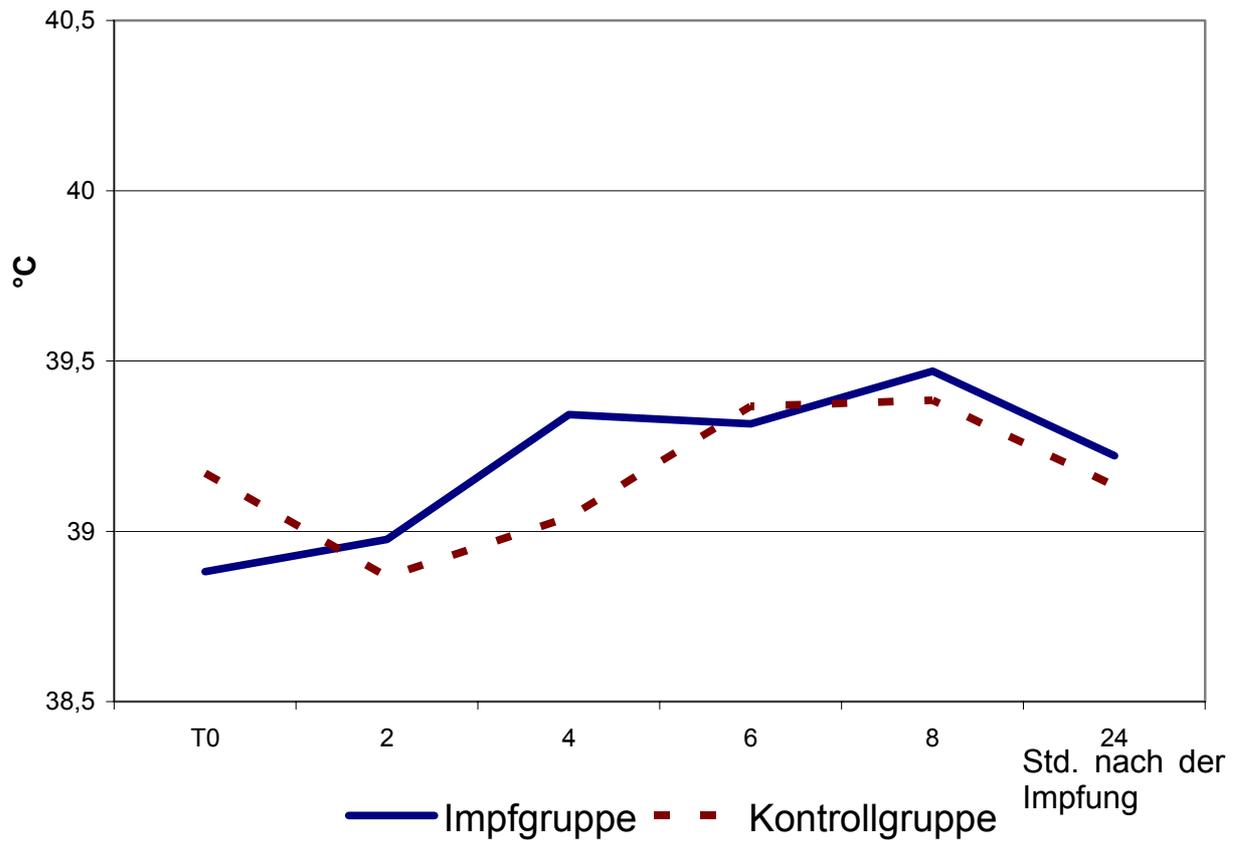


Abbildung 11: Verlauf der mittleren Körpertemperatur von vor bis 24 Stunden nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag

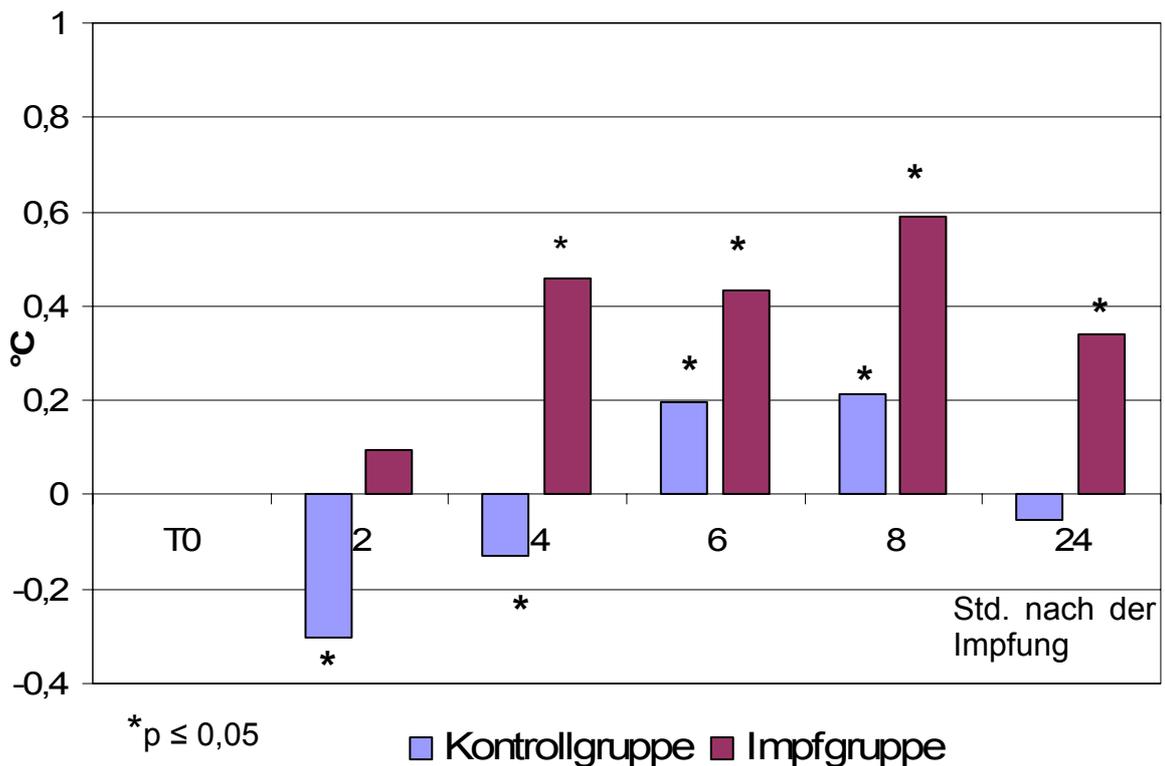


Abbildung 12: Mittlere Temperaturdifferenzen zum Ausgangswert T0 vor der Impfung nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag

4.4.1.3 Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® am 3. Lebenstag, Tiere mit Fieber

4.4.1.3.1 Impfgruppe

In Tabelle 26 ist die Anzahl von Ferkeln mit, sowie die Höhe der Körpertemperaturerhöhung nach der oralen Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag beschrieben. Insgesamt ließen sich 27,3% der Tiere in der Impfgruppe Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C beobachten. 15,2% der Versuchstiere lagen im Bereich einer Körpertemperaturerhöhung bis 0,5 °C. Eine Temperaturerhöhung zwischen 0,5 – 1°C über 39,8°C wurde bei 12,1% der Tiere gemessen. Die übrigen Ferkel der Impfgruppe zeigten keine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C.

4.4.1.3.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe zeigten insgesamt 18,5% der Ferkel eine Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C. Bei 14,8% der Ferkel der Kontrollgruppe lag eine Temperaturerhöhung bis 0,5 °C, bei 3,7% eine Temperaturerhöhung zwischen 0,5 – 1°C vor.

Tabelle 26: Anzahl von Ferkeln mit einer Temperaturerhöhung über 39,8°C nach oraler Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® bzw. 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag, Tiere mit Fieber

°C ≥ 39,8°C	bis 0,5°C (bis 40,3°C)	0,5 - 1,0°C (bis 40,8°C)	1,0 - 1,5°C (bis 41,3°C)	1,5 – 2,0°C (bis 41,8°C)	Gesamt ≥ 39,8°C
Kontrollgruppe	4	1	0	0	5
%	14,8 %	3,7 %	0 %	0 %	18,5 %
Impfgruppe	5	4	0	0	9
%	15,2 %	12,1 %	0 %	0 %	27,3%

4.4.1.4 Säugehäufigkeit

Tabelle 27 zeigt die Säugehäufigkeit von Impf- und Kontrollgruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Std. nach der oralen Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag.

4.4.1.4.1 Impfgruppe

Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach oraler Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. Lebenstag gingen 69,7% der Ferkel 8 mal, 27,3% der Tiere 7 mal und 3% der Ferkel 4 mal zum Säugen.

4.4.1.4.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe gingen 44,9% der Ferkel 9 mal und 55,6% der Ferkel 8 mal innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach der Applikation von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag zum Säugen.

Tabelle 27: Säugehäufigkeit von Impf- und Kontrollgruppe innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Std. nach einfacher Dosierung von Salmoporc® bzw. Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

Säugehäufigkeit	11	10	9	8	7	4
Kontrollgruppe	0	0	12	15	0	0
%	0 %	0 %	44,4 %	55,6 %	0 %	0 %
Impfgruppe	0	0	0	23	9	1
%	0 %	0 %	0 %	69,7 %	27,3 %	3 %

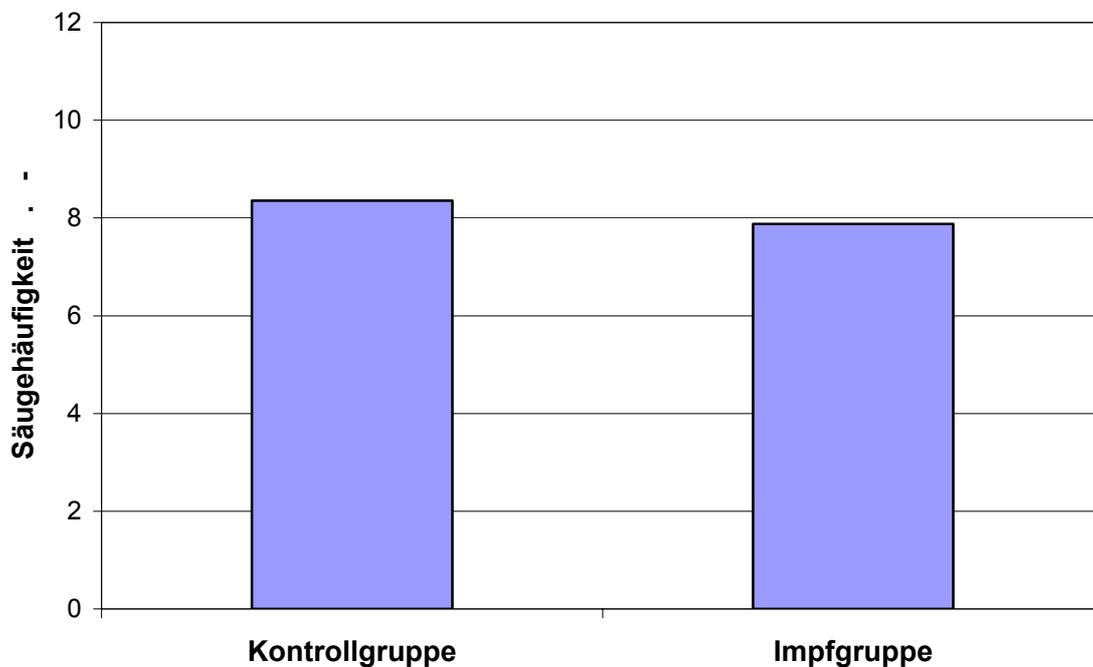


Abbildung 11: Mittelwert der Säugehäufigkeit innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach einfacher Dosierung von Salmoporc® bzw. Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. Lebenstag

4.5 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmoporc[®] am 21. Lebenstag

Zum Zeitpunkt der Impfung waren alle Ferkel der Impfgruppe sowie die Ferkel der Kontrollgruppe klinisch gesund und wurden in den Versuch miteinbezogen.

4.5.1 Kontinuierliche Beobachtung innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Std. nach oraler Applikation einer einfachen Dosis von Salmoporc[®]

4.5.1.1 Klinische Beobachtungen

4.5.1.1.1 Impfgruppe

Innerhalb des Beobachtungszeitraums zeigte ein Ferkel milden Durchfall. Weitere klinische Symptome konnten nicht festgestellt werden.

4.5.1.1.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe trat bei einem Ferkel Durchfall sowie Lethargie auf.

Tabelle 28: Klinische Symptome innerhalb von 8 Stunden nach 10facher Überdosierung am 21. Lebenstag

Gruppe	DF	DF in %	AE	AE in %	LE	LE in %
Impfgruppe	1	3,7 %	0	0 %	0	0 %
Kontrollgruppe	1	4,8 %	0	0 %	1	4,8 %

Durchfall (**DF**); Atemfrequenzerhöhung (**AE**); Lethargie (**LE**)

4.5.1.2 Temperaturverlauf von vor bis 24 Std. nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc[®] am 21. Lebenstag

Die Körpertemperatur wurde direkt vor, sowie 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Applikation der einfachen Dosis von Salmoporc[®] bzw. Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung gemessen. Der Verlauf der mittleren Körpertemperatur innerhalb des Untersuchungszeitraums ist aus Abbildung 12 ersichtlich.

4.5.1.2.1 Impfgruppe

Die Mittlere Körpertemperatur zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten ist gemeinsam mit den maximalen und minimalen Werten der Körpertemperatur aus Tabelle 18 zu ersehen.

Der höchste Wert der Körpertemperatur in der Impfgruppe wurde in der Impfgruppe mit 40,1°C, 8 Stunden nach der Impfstoffapplikation gemessen. Eine signifikante Erhöhung des Mittelwerts der Körpertemperatur im Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung konnte 6 sowie 8 Stunden nach der Impfung nachgewiesen werden.

4.5.1.2.2 Kontrollgruppe

Der Maximalwert der Körpertemperatur am 21. Lebenstag wurde direkt vor der oralen Applikation von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung mit 40,3°C gemessen.

Tabelle 29: Mittelwerte mit Standardabweichungen, sowie Minima und Maxima der Körpertemperatur innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Stunden nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmopor[®] am 21. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Impfgruppe	ante Vacc.	39.21	.293	38.2	39.6
	2 Std. post Vacc	39.29	.215	38.6	39.6
	4 Std. post Vacc.	39.31	.274	38.9	39.8
	6 Std. post Vacc.	39.37	.221	38.9	39.8
	8 Std. post Vacc.	39.47	.220	39.1	40.1
	24 Std. post Vacc.	39.30	.233	38.8	39.8

Tabelle 30: Mittelwerte mit Standardabweichungen, sowie Minimal- und Maximalwerte der Körpertemperatur innerhalb des Untersuchungszeitraums von 8 Stunden nach oraler Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

Gruppe	Zeitpunkt	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum
Kontrollgruppe	ante Vacc.	39.31	.438	38.8	40.3
	2 Std. post Vacc	39.33	.292	38.7	40.0
	4 Std. post Vacc.	39.39	.215	39.1	39.9
	6 Std. post Vacc.	39.34	.204	39.0	39.9
	8 Std. post Vacc.	39.33	.290	39.0	40.0
	24 Std. post Vacc.	39.21	.251	38.8	39.8

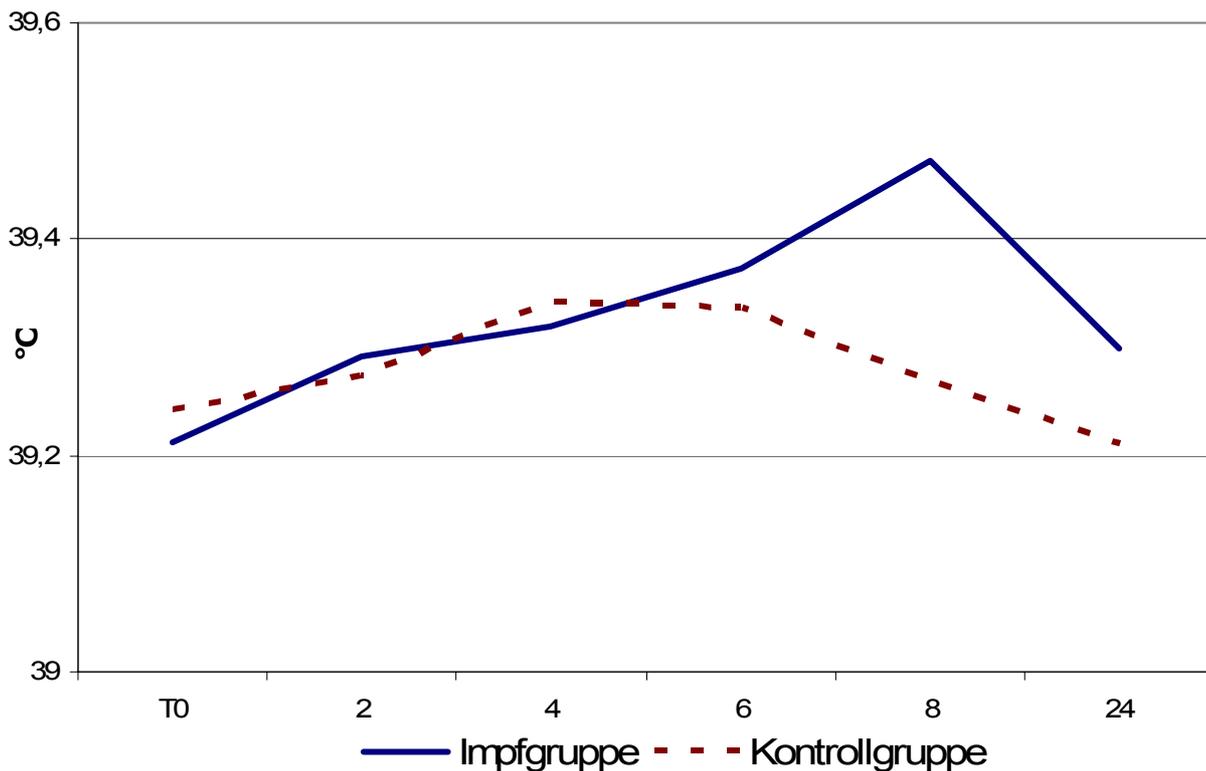


Abbildung 12: Verlauf der mittleren Körpertemperatur von vor bis 24 Stunden nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmoporc[®] bzw. 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

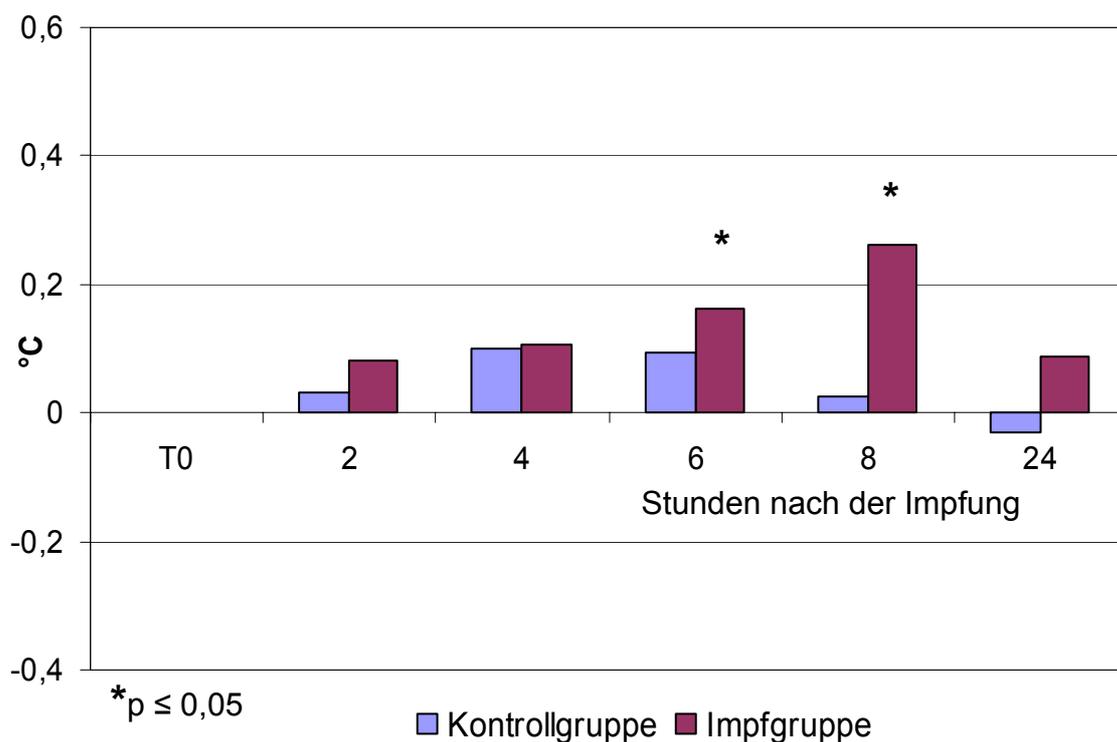


Abbildung 13: Mittelwert der Temperaturdifferenzen zum Ausgangswert der Körpertemperatur vor der Impfung nach einfach dosierter oraler Applikation von Salmoporc® bzw. 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

4.5.1.3 Temperaturerhöhungen über 39,8°C nach einfach dosierter oraler Impfung von Salmoporc® am 21. Lebenstag

4.5.1.3.1 Impfgruppe

Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach der einfach dosierten Impfung mit Salmoporc® am 21. Lebenstag konnte bei 7,6 % der Ferkel eine Erhöhung der Körpertemperatur bis 0,5 °C über 39,8 °C gemessen werden. Alle anderen Ferkel zeigten keine Temperaturerhöhungen über 39,8 °C.

4.5.1.3.2 Kontrollgruppe

Die Messung der Körpertemperatur ergab bei 4,8 % der Ferkel der Kontrollgruppe eine Erhöhung bis 0,5 °C über 39,8 °C. Bei den restlichen Ferkeln der Kontrollgruppe gab es keine nennenswerten Veränderungen der Körpertemperatur.

Tabelle 31: Anzahl von Ferkeln mit einer Erhöhung der Körpertemperatur über 39,8°C, nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® bzw. oraler Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

°C ≥ 39,8	bis 0,5°C (bis 40,3°C)	0,5 - 1,0°C (bis 40,8°C)	1,0 - 1,5°C (bis 41,3°C)	1,5 - 2,0°C (bis 41,8°C)	Gesamt ≥ 39,8°C
Kontrollgruppe	1	0	0	0	1
%	4,8 %	0 %	0 %	0 %	4,8 %
Impfgruppe	2	0	0	0	2
%	7,6 %	0 %	0 %	0 %	7,6 %

4.5.2 Ergebnisse über der Versuchszeitraum von 70 Tagen

4.5.2.1 Säugehäufigkeit

4.5.2.1.1 Impfgruppe

Nach der oralen Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag gingen alle Ferkel der Impfgruppe 8 mal innerhalb des Beobachtungszeitraums von 8 Stunden nach der Impfung zum Säugen.

4.5.2.1.2 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe gingen alle Ferkel innerhalb Beobachtungszeitraums 7 mal zum Säugen.

Tabelle 32: Säugehäufigkeit innerhalb von 8 Stunden nach einfach dosierter Impfstoffapplikation bzw. oraler Applikation von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung

Säugehäufigkeit	11	10	9	8	7
Kontrollgruppe	0	0	0	0	21
%	0%	0%	0%	0 %	100 %
Impfgruppe	0	0	0	26	0
%	0%	0%	0%	100 %	0 %

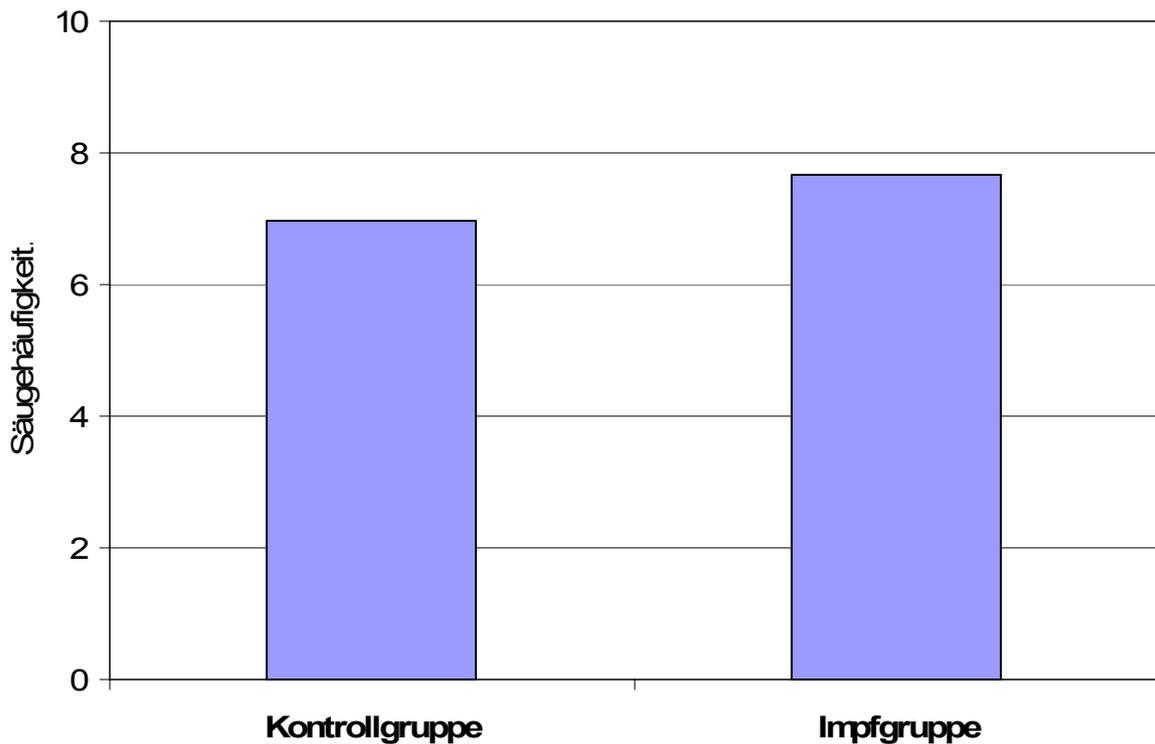


Abbildung 14: Mittelwerte der Säugehäufigkeit innerhalb von 8 Stunden nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc[®] bzw. Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 21. Lebenstag

4.5.2.2 Gewichtsentwicklung

In Abbildung 15 ist das mittlere Körpergewicht im Laufe der Untersuchungen dargestellt. Zu Versuchsbeginn bestand bezüglich des mittleren Körpergewichts der Ferkel beider Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stellte sich ein signifikanter Unterschied im mittleren Körpergewicht zum Zeitpunkt des Absetzens am 28. Lebenstag zu Gunsten der Impfgruppe heraus. Die Ferkel der Impfgruppe blieben im Durchschnitt zwar schwerer, eine Signifikanz bezüglich des mittleren Körpergewichts wurde zu den späteren Wiegezeitpunkten jedoch nicht mehr ermittelt.

Tabelle 33: Mittleres Körpergewicht in kg mit Standardabweichungen von Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich

Alter in Tagen	Mittleres Gewicht Impfgruppe	SD	Mittleres Gewicht Kontrollgruppe	SD	Differenz von Impf- zur Kontrollgruppe
1	1,51	0,273	1,38	0,528	+0,13 kg
7	2,79	0,583	2,44	0,900	+0,35 kg
14	3,99	0,785	3,93	1,086	+0,04 kg
21	5,77	0,976	5,49	1,272	+0,18 kg
28	7,63	1,134	6,47	1,221	+1,26 kg*
42	12,04	1,699	11,47	1,559	+0,57 kg
56	19,38	2,759	18,63	2,071	+0,75 kg
70	29,44	4,310	27,60	2,929	+1,84 kg

*P ≤ 0,05

Tabelle 34: Tägliche Gewichtszunahmen in Gramm von Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich

	1. bis 4. Lebenswoche	4. bis 10. Lebenswoche
Impfgruppe	218,3 Gramm / Tag	519,3 Gramm / Tag
Kontrollgruppe	181,8 Gramm / Tag	496,6 Gramm / Tag
Differenz	+36,5 Gramm / Tag	+22,7 Gramm / Tag

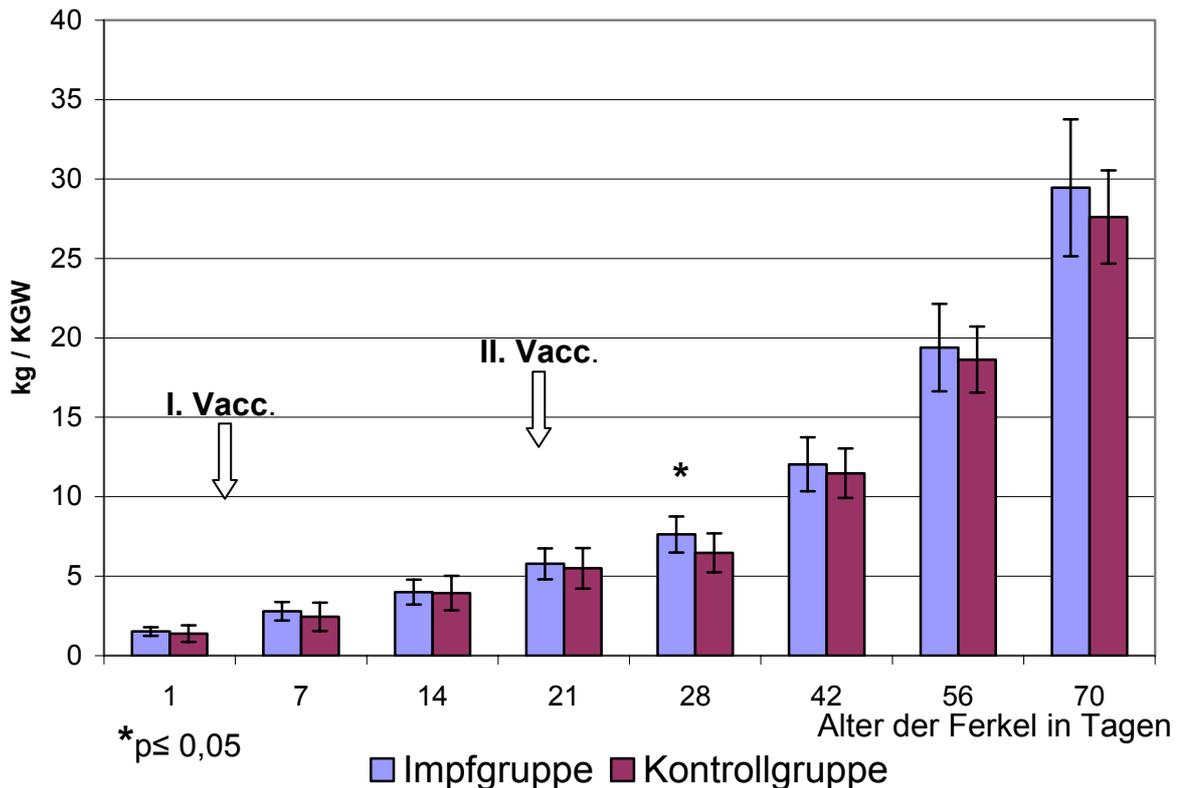


Abbildung 15: Mittelwerte des Körpergewichts vom Zeitpunkt der Geburt bis zum 70. Lebenstag der Ferkel nach oraler Verabreichung der einfachen Dosis von Salmopor[®] am 3. und am 21. Lebenstag

4.5.2.3 Einfluss auf die Kotkonsistenz innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 Wochen

Die Kotkonsistenz jedes Versuchstiers wurde gemeinsam mit der Messung der Körpertemperatur 50 Tage lang täglich bewertet. Die Abbildung 16 gibt die relative Häufigkeit von Ferkeln mit Durchfall für die jeweilige Versuchsgruppe im Beobachtungszeitraum wieder. Da nach dem 50. Lebenstag bei den Ferkeln beider Versuchsgruppen kein Durchfall mehr auf. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die graphische Darstellung über den 50. Lebenstag hinaus verzichtet.

4.5.2.3.1 Impfgruppe

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, war nach der oralen Verabreichung der einfachen Dosis von Salmopor[®] am 3. Lebenstag, innerhalb eines Zeitraums von 14 Tagen nach der Impfung eine signifikant höhere Häufigkeit im Auftreten von Ferkeln mit Durchfall zu beobachten. Nach der zweiten Impfung am 21. Lebenstag wurde im

Zeitraum von 14 Tagen nach der Impfung ebenfalls eine signifikante Häufung von Ferkeln mit Durchfall im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt. Insgesamt verliefen die Durchfallperioden aber sehr leicht und es waren meist unterschiedliche Ferkel eines Wurfes betroffen.

4.5.2.3.2 Kontrollgruppe

In dem Zeitraum von 14 Tagen nach der Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. am 21. Lebenstag, zeigten auch die Ferkel der Kontrollgruppe gelegentlich Durchfall. Wie bereits oben erwähnt handelte es sich um einen milden Verlauf, bei dem meist unterschiedliche Ferkel der Kontrollgruppe betroffen waren.

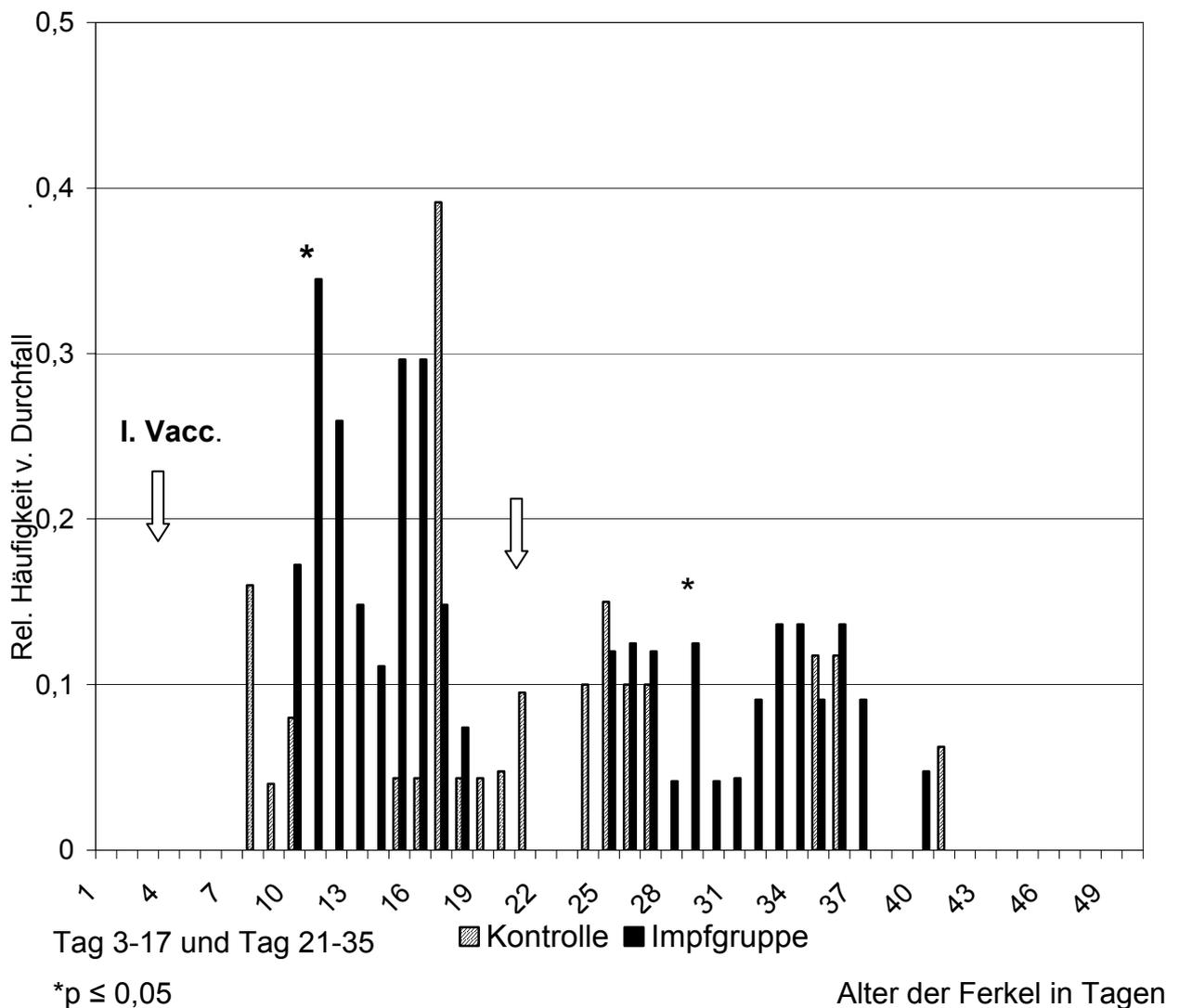


Abbildung 16: Relative Häufigkeit von Durchfall bei den Ferkeln der Impf- und Kontrollgruppe

4.5.2.4 Verlauf der mittleren Körpertemperatur von der Geburt bis zum 50. Lebenstag

Die Körpertemperatur der Ferkel wurde jeweils morgens, von Geburt an bis zum Ende des Versuchszeitraums kontrolliert. In Abbildung 17 sind die mittleren Körpertemperaturen im Verlauf von der Geburt bis zum 50. Lebenstag dargestellt. Signifikante Unterschiede waren im Bezug auf die Impfung nicht ersichtlich.

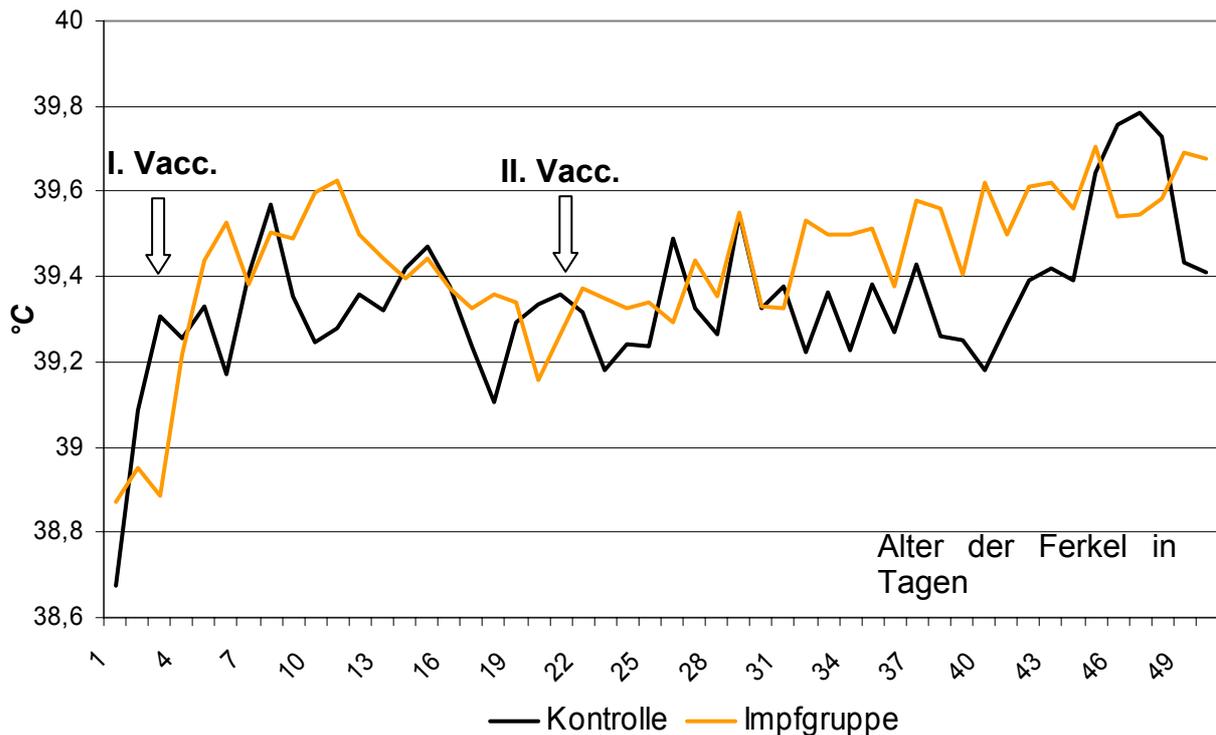


Abbildung 17: Mittelwerte der Körpertemperaturen von Geburt bis zum 50. Lebenstag der Ferkel nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmopor[®] bzw. oraler Gabe von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. und 21. Lebenstag

4.5.3 Bakteriologische Untersuchungen

4.5.3.1 Sammelkotproben von den Ferkeln

Um genügend Untersuchungsmaterial zu erhalten wurde für die erste Sammelkotprobe der Kot jedes Wurfes 3 Tage lang bis direkt vor der Impfung am 3. Lebenstag gesammelt. Die bakteriologische Untersuchung der Sammelkotproben direkt vor der Impfstoffapplikation ergab bei beiden Versuchsgruppen ein negatives Ergebnis.

4.5.3.1.1 Impfgruppe

Am 7. und 14. Lebenstag der Ferkel (4. und 11. Tag nach einfach dosierter oraler Impfstoffapplikation) konnte aus den Sammelkotproben von zwei Würfen der Impfgruppe der Impfstamm nachgewiesen werden. Am 21. Lebenstag, vor der zweiten Impfung wurden alle drei Sammelkotproben positiv auf den Impfstamm getestet. 7 Tage nach der zweiten Impfung konnten zwei von drei Sammelkotproben positiv auf den Impfstamm getestet werden. Die weiteren wöchentlichen Untersuchungen der Sammelkotproben bis zum 70. Lebenstag (49 Tage nach der zweiten Impfstoffapplikation) verliefen negativ.

4.5.3.1.2 Kontrollgruppe

Die bakteriologischen Untersuchungen der Sammelkotproben der Kontrollgruppe verliefen über den gesamten Untersuchungszeitraum negativ.

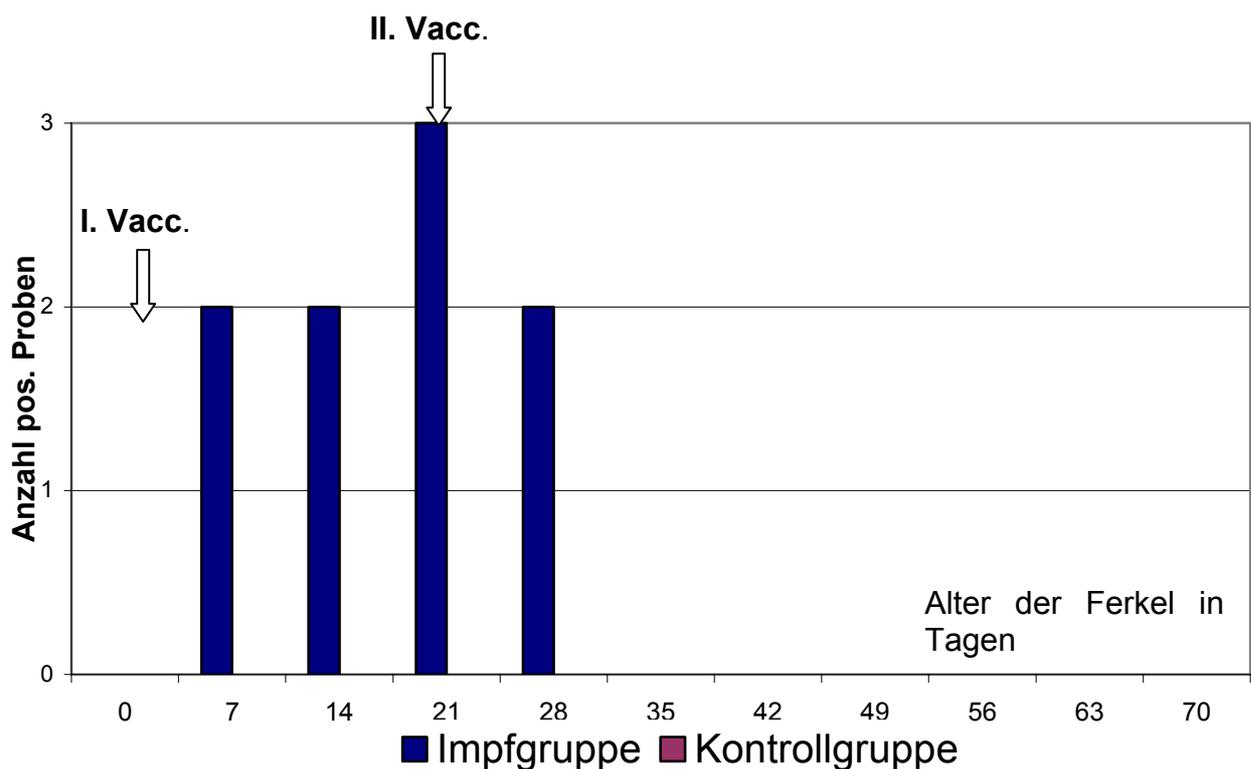


Abbildung 18: Anzahl positiver Sammelkotproben im Untersuchungszeitraum von 10 Wochen nach einfach dosierter Impfung am 3. und 21. Lebenstag

4.5.3.2 Kotproben der Sauen

Von den Sauen wurden am 14., 21. und 28. Lebenstag der Ferkel Einzelkotproben bakteriologisch auf Salmonellen untersucht. Zu keinem dieser Zeitpunkte konnte in dem Kot der Sauen Salmonellen nachgewiesen werden.

4.5.3.3 Differentialdiagnostische Untersuchung

Differentialdiagnostisch konnte aus je 5 Tupferproben von Ferkeln mit Durchfall der Kontroll- und Impfgruppe *Clostridium perfringens* vom Typ A isoliert werden. Salmonellen wurden in keiner der Kottupferproben nachgewiesen.

4.5.3.4 Bakteriologische Untersuchung der Organproben

Tabelle 35 zeigt wie oft und zu welchem Zeitpunkt die beprobten Organe positiv auf den Impfstamm getestet wurden und aus welchem Organ der Impfstamm am häufigsten isoliert werden konnte. Die Beprobung der Organe wurde aus Rücksicht auf die verbleibenden Tierzahlen am 49. Tag nach der zweiten Impfung einmal ausgesetzt um eine möglichst lange Beprobungsdauer zu ermöglichen.

4.5.3.4.1 Impfgruppe

Innerhalb des Untersuchungszeitraums von 3 Tagen nach der ersten oralen Impfung am 3. Lebenstag, bis zum 70. Tag nach der zweiten einfach dosierten oralen Impfung mit Salmoporc[®] am 21. Lebenstag kam es zu einer zeitlich begrenzten Besiedlung der inneren Organe durch den Impfstamm. Mit Ausnahme der Nieren konnte aus jedem beprobten Organ zumindest einmal der Impfstamm isoliert werden. Der häufigste Nachweis gelang aus Proben der Ileozäkallymphknoten (8 positive Proben), gefolgt von Dünndarmproben (7 positive Proben), Blinddarminhalt (5 positive Proben), Dickdarmproben (3 positive Proben), Lunge (2 positive Proben) sowie Leber, Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur mit je einer positiven Probe. Der letzte positive Impfstammnachweis gelang am 42. Tag nach der zweiten Impfung in der zehnten Lebenswoche der Ferkel. Feldstämme konnten zu keinem Zeitpunkt aus den Organproben isoliert werden.

4.5.3.4.2 Kontrollgruppe

Aus den Organproben von Tieren der Kontrollgruppe konnten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen Salmonellen isoliert werden.

Tabelle 35: Gesamtanzahl Impfstamm-positiver Organproben im Verlauf von 3 Tagen nach der ersten einfach dosierten oralen Impfung am 3. Lebenstag, bis 70 Tage nach der zweiten einfach dosierten oralen Impfung am 21. Lebenstag mit Salmoporc[®], sowie Anzahl Impfstamm-positiver Befunde pro Organ. Die Organe von Tieren aus der Kontrollgruppe waren zu keinem Beprobungszeitpunkt Salmonellen-positiv

Probe	3	7	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	Ges.
	p. I.	p. I.	p. II.	p. II.	p. II.	p. II.								
DÜD	2	1	0	0	1	0	1	1	1	n.d.	0	0	0	7
DID	1	1	0	0	0	0	0	0	1	n.d.	0	0	0	3
BDI	2	0	1	2	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	5
Lnn.	2	2	2	0	1	1	0	0	0	n.d.	0	0	0	8
Lunge	2	0	0	0	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	2
Leber	1	0	0	0	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	1
SMSK.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	1
HMSK	1	0	0	0	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	1
Niere	0	0	0	0	0	0	0	0	0	n.d.	0	0	0	0
Gesamt	12	4	3	2	1	1	1	0	2	n.d.	0	0	0	28

3 p.I. - 7p.I.: 3. und 7. Tag nach erster Impfung am 3. Lebenstag;

3 - 70 p. II.: 3. – 70. Tag nach zweiter Impfung am 21. Lebenstag.

DÜD: Dünndarm;

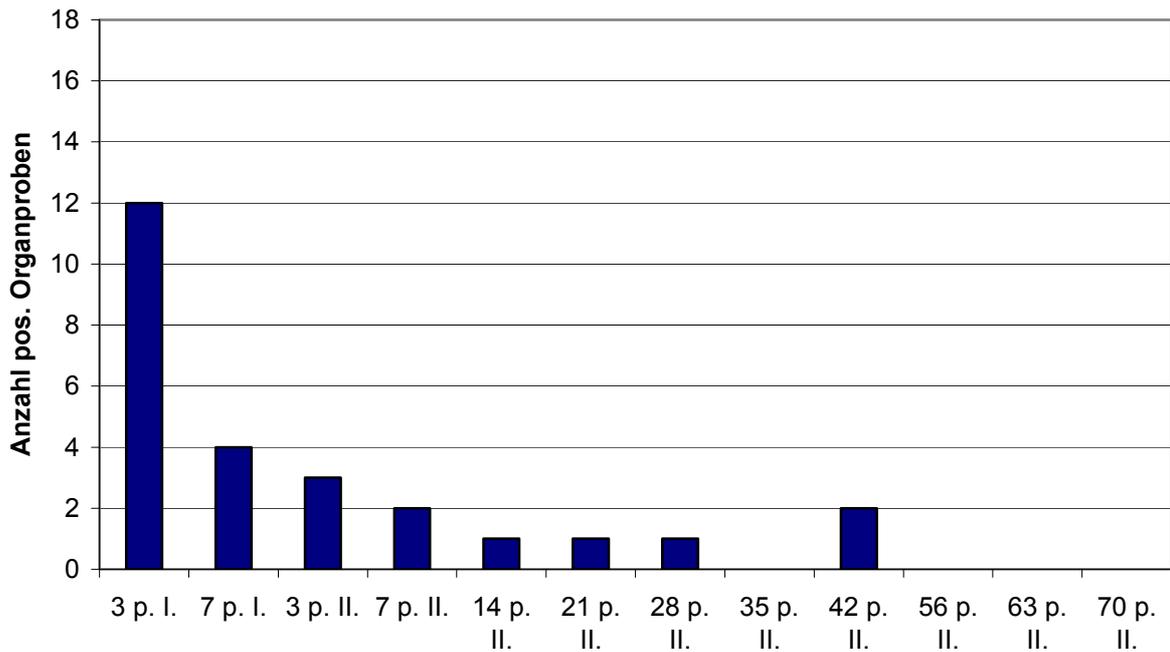
DID: Dickdarm;

BDI: Blinddarminhalt;

Lnn.: Ileozäkallymphknoten;

SMKS: Skelettmuskulatur,

HMSK: Herzmuskulatur;



3 – 7.p. I.: 3. – 7. Tag nach der ersten Impfung am 3. Lebenstag
3 p.II. – 70. p.II.: 3. und 7. Tag nach der zweiten Impfung am 21.. Lebenstag

Abbildung 19: Gesamtzahl impfstammpositiver Organproben zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten

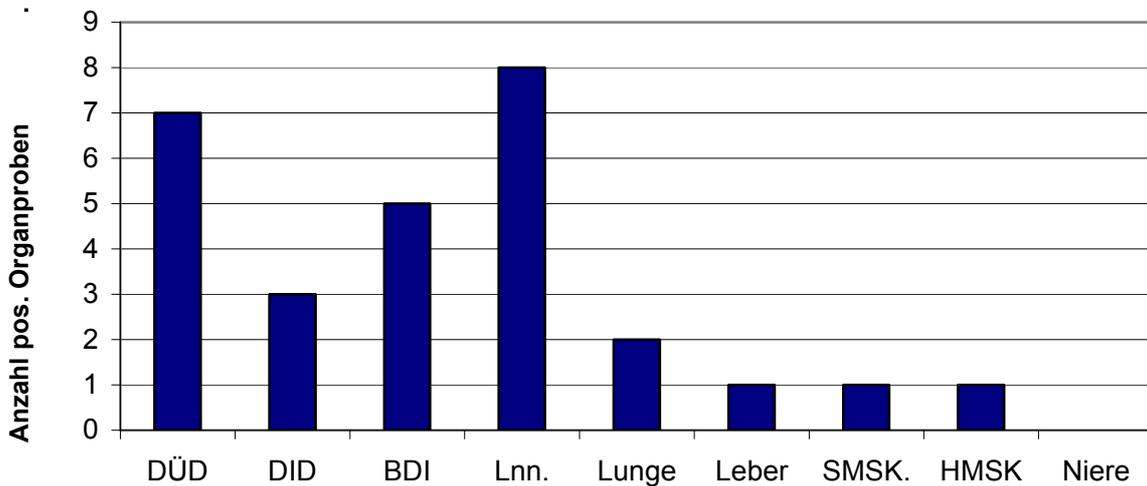


Abbildung 20: Gesamtzahl impfstammpositiver Befunde für die jeweilig beprobten Organe innerhalb des Untersuchungszeitraums bis zum 70. Tag nach der einfach dosierten oralen Impfung

4.5.4 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

In Abbildung 21 sind die mittleren OD%-Werte der Versuchsgruppen im Verlauf des Untersuchungszeitraums dargestellt.

4.5.4.1 Impfgruppe

Am 3. Lebenstag der Ferkel, direkt vor der ersten Impfung, lag der Mittelwert des Antikörpertiters im Serum bei den Ferkeln in der Impfgruppe mit 20,6 OD% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 14,2 %, signifikant höher. Ein Ferkel hatte mit einem Wert von 43,6 OD% den positiv-Cut-Off des BMELV überschritten.

Direkt vor der zweiten Impfung am 21. Lebenstag, d.h. 17 Tage nach der ersten Impfung war der Antikörpertiter im Mittel trotz der oralen Impfung am 3. Lebenstag stark gesunken. In der Impfgruppe lag der Antikörpergehalt im Serum zu diesem Zeitpunkt nur noch bei 3,4 OD%. Der Maximale OD%-Wert eines Einzeltiers lag zu diesem Zeitpunkt nur bei 7,8 OD%.

Wie aus Tabelle 36 ersichtlich stieg der mittlere Antikörpergehalt im Serum der Ferkel aus der Impfgruppe eine Woche nach der zweiten Impfung (28. Lebenstag) deutlich an. Im Mittel erreichte er einen Wert von 18,7 OD%, wobei die Werte zwischen den Ferkeln innerhalb der Impfgruppe stark variierten (Minimalwert: 0,8 OD %, Maximalwert 84,8 OD%).

Ein signifikanter Unterschied zur mittleren Antikörperkonzentration im Serum der Ferkel der Kontrollgruppe bestand vom 42. Lebenstag an, d.h. 3 Wochen nach der zweiten Impfung. In Abbildung 21 ist der bis zum Versuchsende am 70. Lebenstag der Ferkel deutlich zunehmende Unterschied im Vergleich der Mittelwerte beider Versuchsgruppen gut zu erkennen. Tabelle 36 zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie die minimalen und maximalen OD%-Werte in der Impfgruppe an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten

4.5.4.2 Kontrollgruppe

Innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 7 Wochen stieg der Mittelwert des Antikörpertiters von den Ferkeln aus der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt über 20 OD%. Der Antikörpertiter war zu Beginn der Untersuchungen am 3. Lebenstag, sowie am 42., 56. und 70. Lebenstag der Ferkel signifikant niedriger als in der Impfgruppe. Insgesamt verlief die Entwicklung des mittleren Antikörpergehaltes im

Serum der Ferkel der Kontrollgruppe einheitlich. Nach dem 42. Lebenstag zeigte sich aber auch in der Kontrollgruppe ein Anstieg des OD%- Wertes. Wobei der höchste Wert eines Einzeltiers über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg am 70. Lebenstag mit 29,3 OD% gemessen wurde. In Tabelle 36 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie die minimalen und maximalen OD%-Werte der Ferkel der Kontrollgruppe an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten dargestellt.

Tabelle 36: Minimal- und Maximalwerte des Antikörpertiters der Impfgruppe in OD% nach oraler Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc[®] am 3. und am 21. Lebenstag

Zeitpunkt	Mittelwert OD%	SD	minimaler OD%-Wert	maximaler OD%-Wert
3. LT.: Tag der Impfung	20.66	8.785	3.5	43.6
21. LT. : 18. Tag nach der I. Vacc	3.46	2.493	-.1	7.8
28. LT.: 7. Tag nach der II. Vacc.	18.69	23.448	.8	84.8
42. LT.: 21. Tag nach der II. Vacc.	15.96	12.433	2.0	42.2
56. LT.: 35. Tag nach der II. Vacc.	36.35	24.148	10.4	105.0
70. LT.: 49. Tag nach der II. Vacc.	48.62	24.885	22.5	114.3

Tabelle 37: Minimal- und Maximalwerte des Antikörpertiters der Kontrollgruppe in OD% nach oraler Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung

Zeitpunkt	Mittelwert OD%	SD	minimaler OD%-Wert	maximaler OD%-Wert
3. LT.: Tag der Impfung	14.26	8.186	3.2	32.4
21. LT. : 18. Tag nach der i, Vacc	3.84	2.402	.4	7.6
28. LT.: 7. Tag nach der II. Vacc.	6.80	4.562	.8	15.1
42. LT.: 21. Tag nach der II. Vacc.	4.20	2.349	-.2	8.3
56. LT.: 35. Tag nach der II. Vacc.	12.53	4.525	5.3	18.3
70. LT.: 49. Tag nach der II. Vacc.	17.40	7.228	3.2	29.3

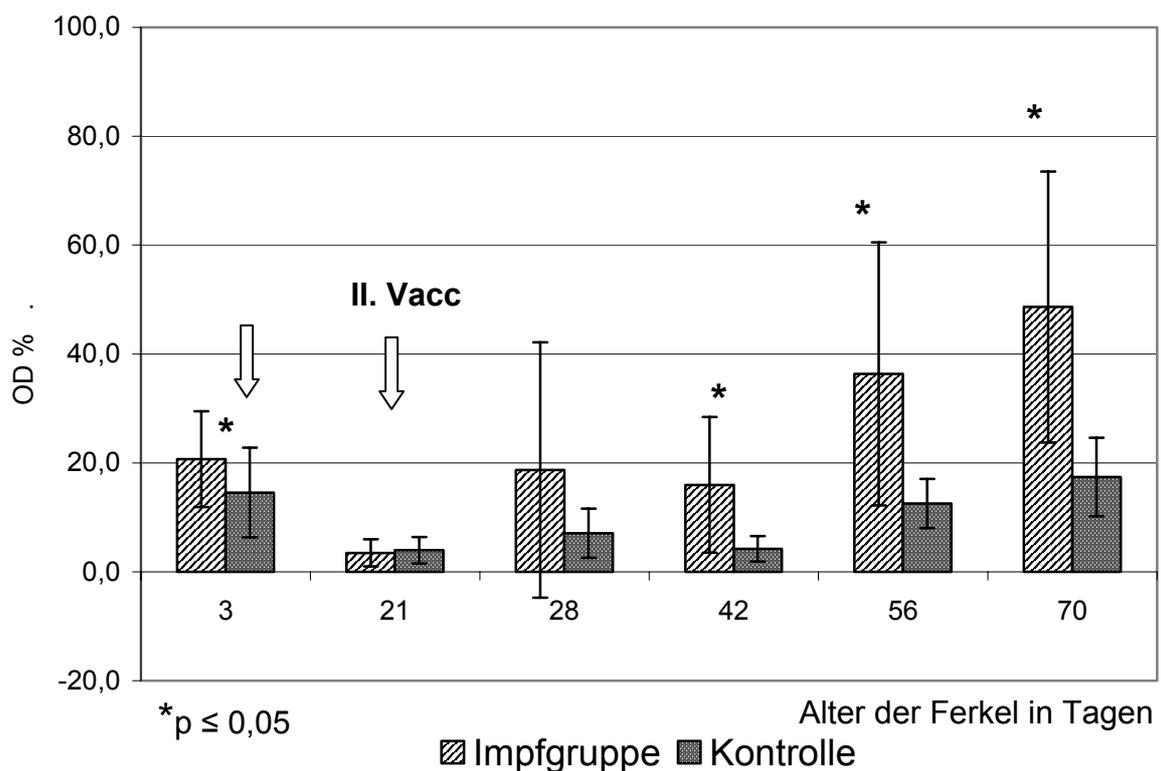


Abbildung 21: Vergleich des mittleren Antikörpergehalts im Serum der Ferkel von Impf- und Kontrollgruppe in OD% nach einfach dosierter oraler Impfung mit Salmoporc® bzw. oraler Verabreichung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung am 3. sowie am 21. Lebenstag

4.5.5 Vergleich der Entwicklung der Antikörpertiter einzelner Würfe

4.5.5.1 Impfgruppe

Obwohl alle drei Würfe gleich behandelt wurden, kam es in der Entwicklung des Antikörpertiters innerhalb der Impfgruppen zu Unterschieden. Vom Zeitraum nach der ersten oralen Impfung am 3. Lebenstag, bis zum 21. Lebenstag verlief die Entwicklung noch gleich. Wie Abbildung 22 deutlich macht, sank bei allen drei Würfen der mittlere Gehalt an Salmonella-Antikörper im Serum der Ferkel aus der Impfgruppe auf sehr niedrige Werte. Den Tabellen 38 bis 40 sind die mittleren OD%-Werte mit Standardabweichungen zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten zu entnehmen.

Eine Woche nach der zweiten Impfung war ein deutlicher Anstieg des mittleren Antikörpergehalts im Serum, vor allem bei den Ferkeln des Wurfes 6052 zu sehen. Die Würfe 6343 und 6041 zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Anzeichen einer Serokonversion.

Drei Wochen nach der zweiten Impfung konnte auch eine Serokonversion bei den Würfen 6343 und 6041 festgestellt werden. Von diesem Zeitpunkt an verlief die Entwicklung des Antikörpergehaltes in etwa gleich, wobei sich die Höhe der Antikörpertiter weiterhin auf unterschiedlichem Niveau befand.

4.5.5.2 Kontrollgruppe

Wie aus Tabellen 41 und 42 ersichtlich, verlief die Entwicklung des mittleren Antikörpergehalts im Serum der Ferkel aus der Kontrollgruppe in beiden Würfen gleich. Wie in der Impfgruppe ist der Antikörpertiter innerhalb des Zeitraums vom 3. bis zum 21. Lebenstag deutlich abgesunken.

Bis zum 42. Lebenstag bleibt der mittlere Antikörpergehalt im Serum beider Würfe der Kontrollgruppe sehr niedrig. Zu einem Anstieg des Antikörpertiters kommt es nach dem Umstallen am 42. Lebenstag. Wobei die Mittelwerte beider Würfe unter 20 OD% bleiben.

Tabelle 38: Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörpertiter in OD% des Wurfs 6052 der Impfgruppe

6052	3. Lebenstag	21. Lebenstag	28. Lebenstag	42. Lebenstag	56. Lebenstag	70. Lebenstag
OD%- Wert	16,9	4,3	40,6	26,2	56,0	67,8
SW	9,7	2,1	27,7	13,1	36,0	36,9

Tabelle 39: Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörpertiter in OD% des Wurfs 6343 der Impfgruppe

6343	3. Lebenstag	21. Lebenstag	28. Lebenstag	42. Lebenstag	56. Lebenstag	70. Lebenstag
OD%- Wert	25,1	3,6	4,6	11,9	29,3	47,3
SW	4,5	2,2	2,7	8,9	15,0	13,1

Tabelle 40: Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörpertiter in OD% des Wurfs 6041 der Impfgruppe

6041	3. Lebenstag	21. Lebenstag	28. Lebenstag	42. Lebenstag	56. Lebenstag	70. Lebenstag
OD%- Wert	19,3	1,7	9,4	11,0	30,5	31,5
SW	11,3	2,9	5,6	11,7	18,9	12,5

Tabelle 41: Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörpertiter in OD% des Wurfs 6341 der Kontrollgruppe

6341	3. Lebenstag	21. Lebenstag	28. Lebenstag	42. Lebenstag	56. Lebenstag	70. Lebenstag
OD%- Wert	18,0	4,1	9,5	4,5	13,9	17,1
SW	9,5	1,9	3,8	2,1	3,9	1,5

Tabelle 42: Mittelwerte und Standardabweichungen der Antikörpertiter in OD% des Wurfs 6340 der Kontrollgruppe

6340	3. Lebenstag	21. Lebenstag	28. Lebenstag	42. Lebenstag	56. Lebenstag	70. Lebenstag
OD%- Wert	8,6	3,8	4,7	3,9	11,1	17,7
SW	4,7	3,0	4,0	2,7	5,1	10,9

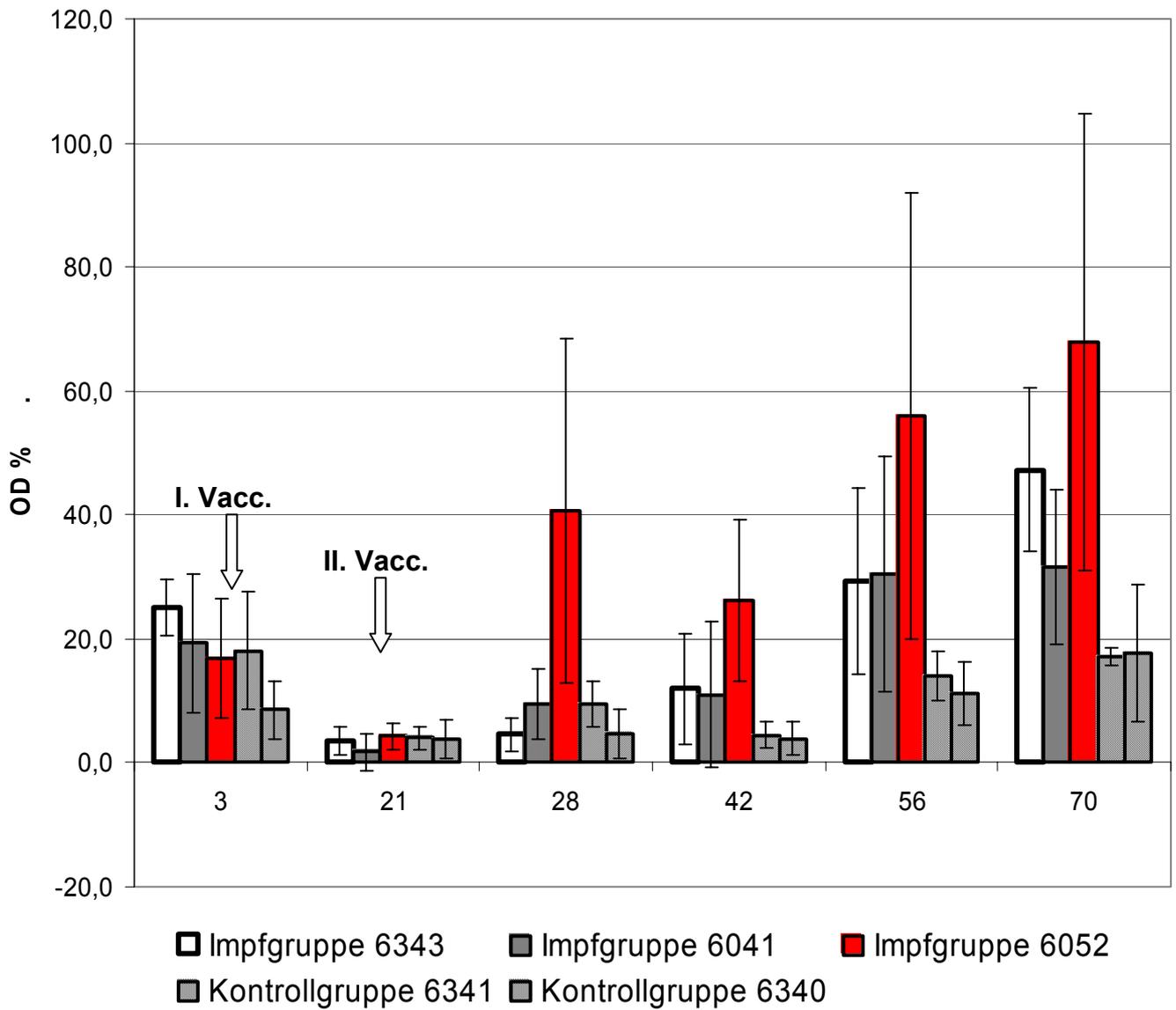


Abbildung 22: Mittelwerte der Antikörpertiter in OD% der einzelnen Würfe der Impf- und Kontrollgruppe im Vergleich

4.5.6 Antikörperentwicklung einzelner Ferkel der Impf- und Kontrollgruppe

Auch innerhalb der einzelnen Würfe zeigten die Ferkel unterschiede in der serologischen Reaktion auf die Impfung. Einheitlich zeigte sich bei allen Ferkeln der Impfgruppe nur ein Absinken des OD%-Werts in der Zeit von der ersten Impfung am 3. Lebenstag bis zum Zeitpunkt der zweiten Impfung am 21. Lebenstag.

Nach der Revakzination am 21. Lebenstag konnte bei zwei Ferkeln des Wurfes 6052 ein deutlicher Anstieg des Antikörpertiters beobachtet werden. Im Wurf 6041 zeigten die Ferkel eine steigende Tendenz und in Wurf 6343 keine Anzeichen für eine Serokonversion.

Ab dem 42. Lebenstag konnte bei den Ferkeln aller drei Würfe der Impfgruppe eine einheitliche Entwicklung des Antikörpertiters, wenn auch auf unterschiedlich hohem Niveau, beobachtet werden.

In der Kontrollgruppe konnte im selben Zeitraum ein sehr einheitlicher Verlauf der Antikörperentwicklung beobachtet werden. Tendenziell stieg bei allen Ferkeln der Kontrollgruppe der Antikörper ab dem 42. Lebenstag leicht an. Der maximale OD%-Wert eines Einzeltieres aus der Kontrollgruppe lag bei 29,3 OD% am 70. Lebenstag. Zur Erstellung der Abbildungen 25-29 wurden nur die Ferkel miteinbezogen, die von Versuchsbeginn bis zum 70. Lebenstag zu verfolgen waren und nicht zur Organbeprobung herangezogen wurden.

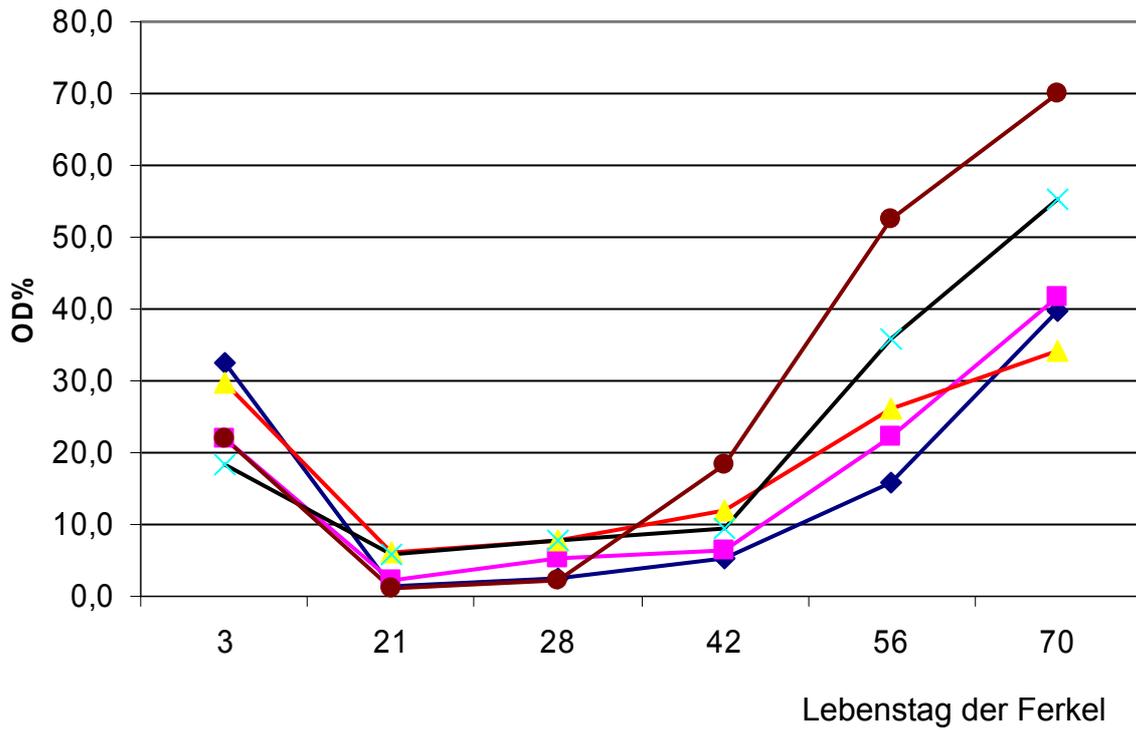


Abbildung 25: Antikörperkonzentration im Serum einzelner Ferkel der Impfgruppe in OD% vom 3. bis 70. Lebenstag: Wurf 6343

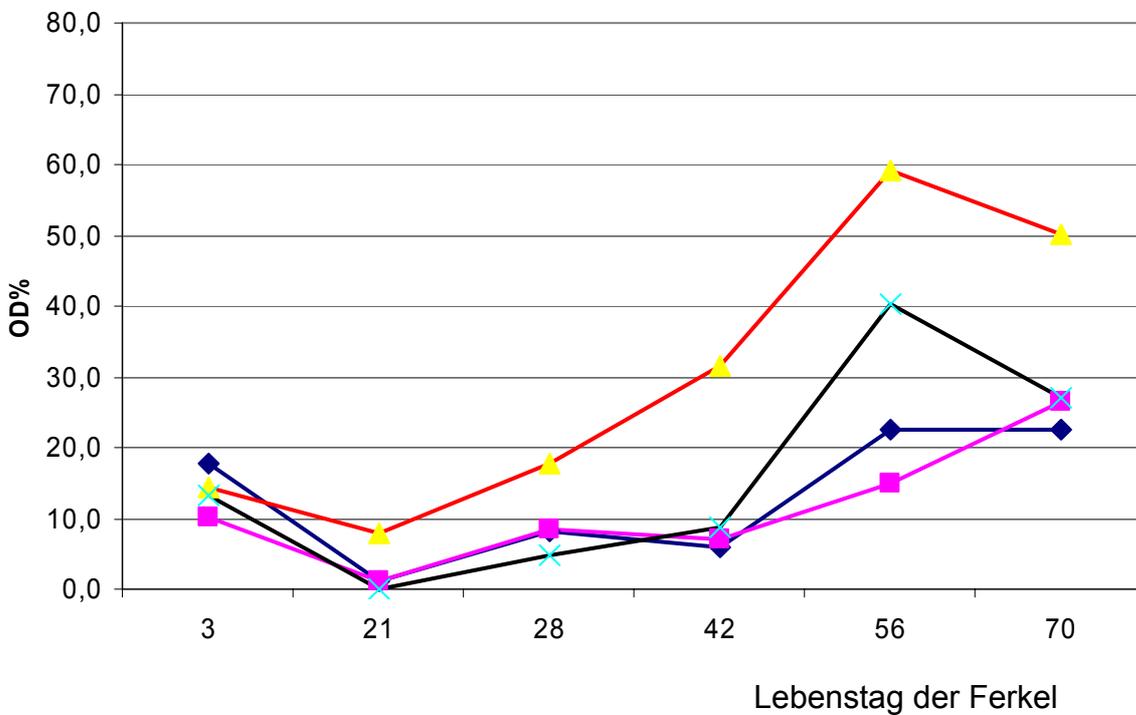


Abbildung 26: Antikörperkonzentration im Serum einzelner Ferkel der Impfgruppe in OD% vom 3. bis 70. Lebenstag: Wurf 6041

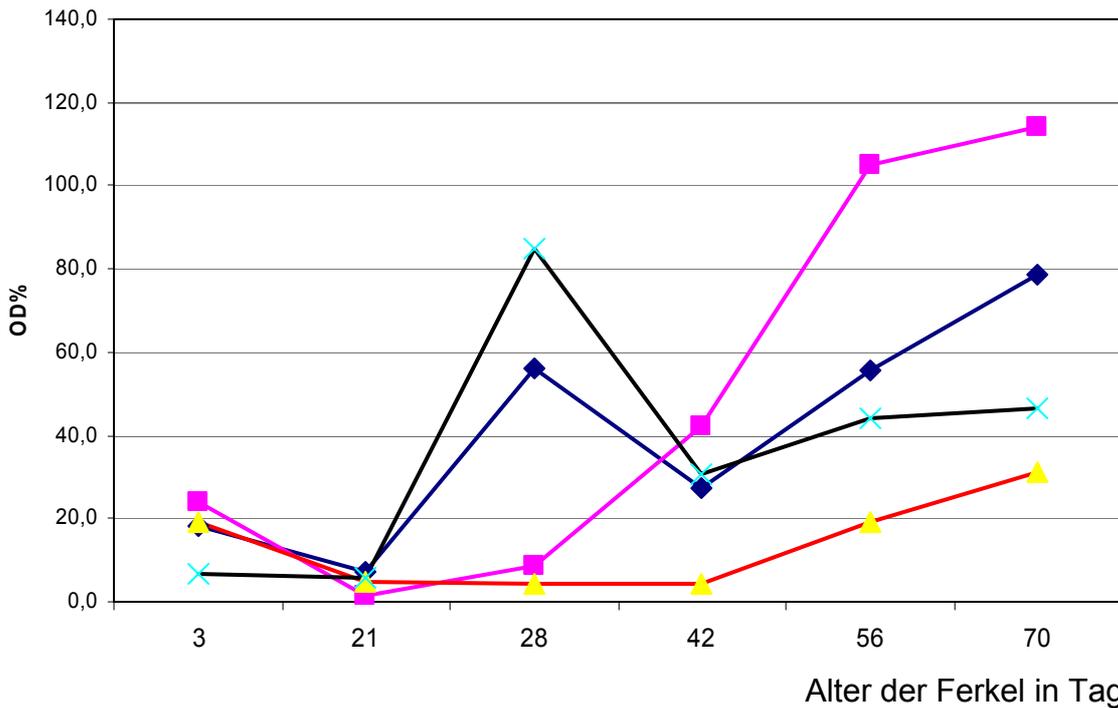


Abbildung 27: Antikörperkonzentration im Serum einzelner Ferkel der Impfgruppe in OD% vom 3. bis 70. Lebenstag: Wurf 6052

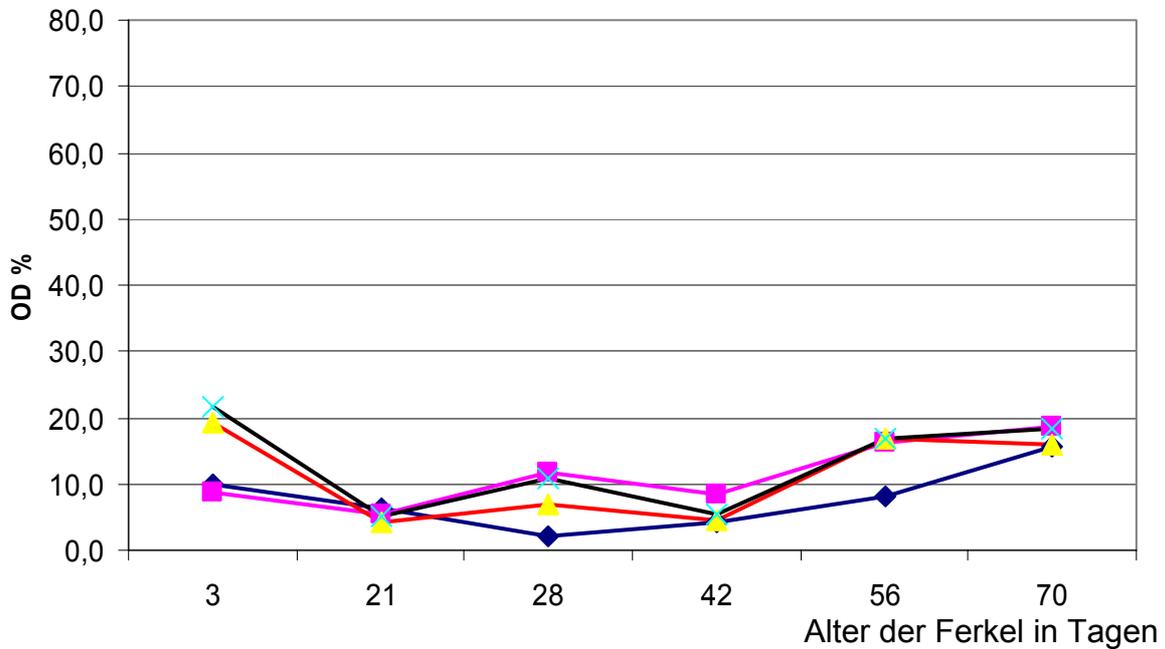


Abbildung 28: Antikörperkonzentration im Serum einzelner Ferkel der Kontrollgruppe in OD%: Wurf 6341

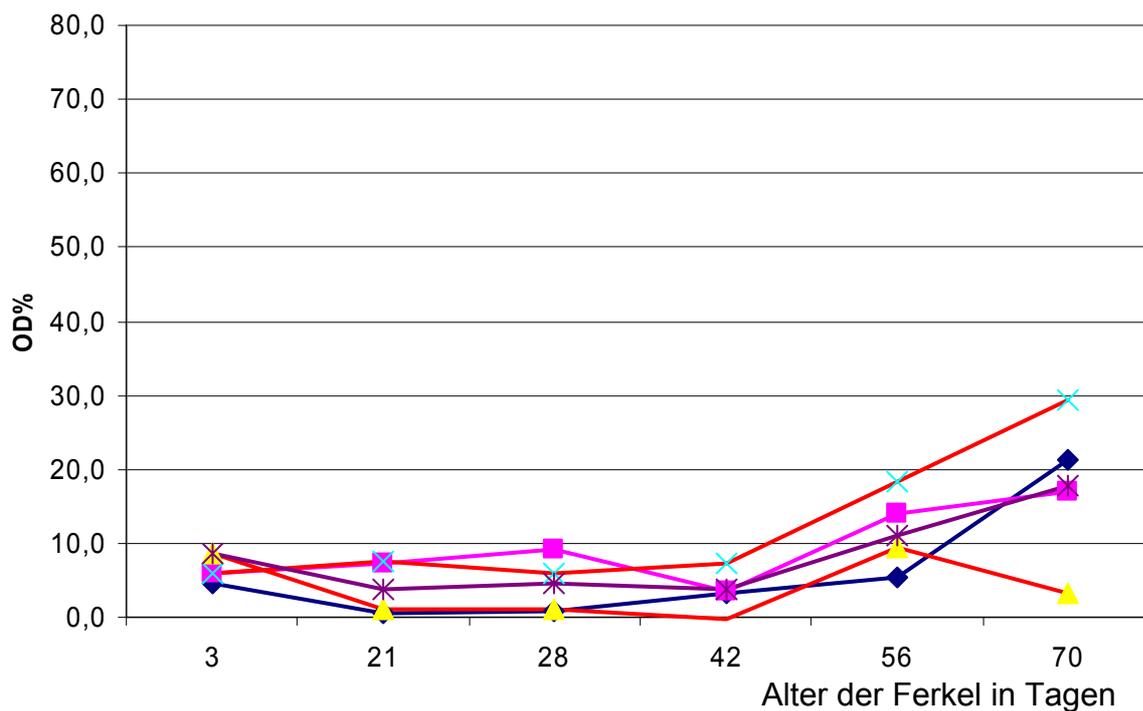


Abbildung 29: Antikörperkonzentration im Serum einzelner Ferkel der Kontrollgruppe in OD% :6340

4.6 Ergebnis der serologischen Untersuchung der Muttersauen von Impf- und Kontrollgruppe

Wie man aus Abbildung 28 entnehmen kann, ergab die serologische Untersuchung zwischen dem Zeitpunkt der Geburt der Ferkel und zum Zeitpunkt des Absetzens bei bei 2 Jungsaunen der Kontrollgruppe sowie bei einer Jungsau der Impfgruppe einen Anstieg des Anti-Salmonella-Antikörpergehaltes im Serum. Jeweils eine Jungsau von der Kontroll- und Impfgruppe zeigte einen sinkenden und eine Jungsau von der Impfgruppe keine Veränderungen im Antikörperspiegel.

Tabelle 43: Antikörpertiter der einzelnen Sauen der Impf und Kontrollgruppe in OD %

Muttersau	vor I. Vacc.	Absetzen
Kontrolle Wurf 6340	25,6	29,9
Kontrolle Wurf 6073	33,3	46,7
Kontrolle Wurf 6341	36,6	20,9
Impfgruppe Wurf 6343	28,9	40,2
Impfgruppe Wurf 6052	32,1	25,1
Impfgruppe Wurf 6041	26,5	26,7

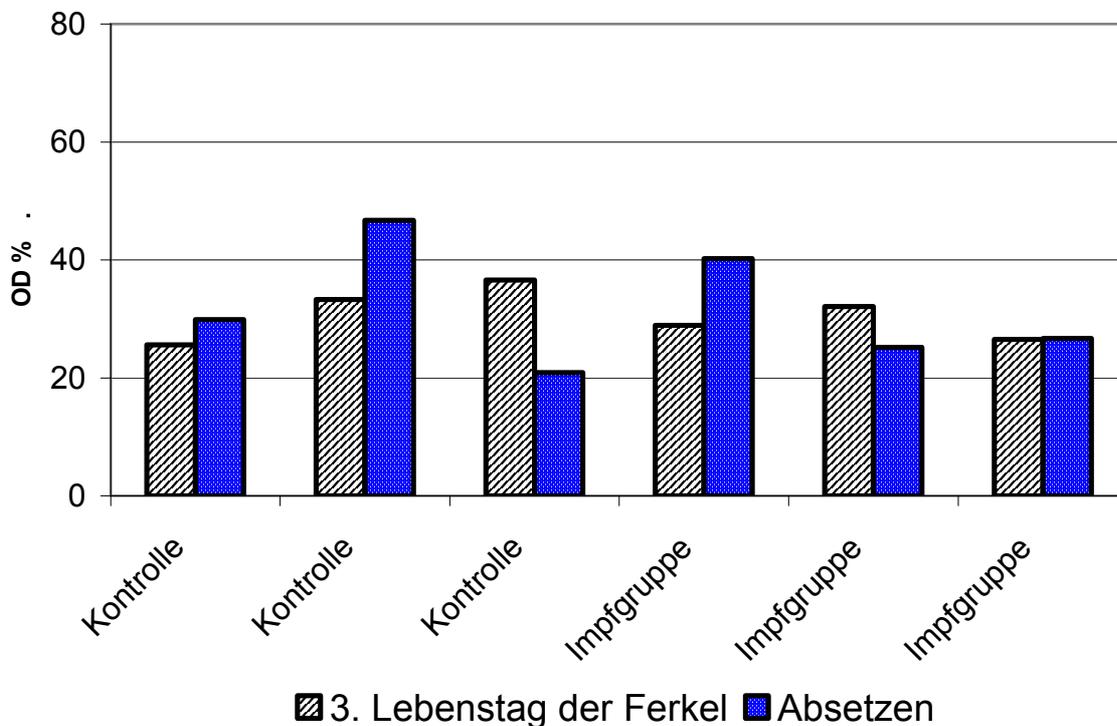


Abbildung 30: Antikörpertiter in OD% von den drei Sauen der Kontrollgruppe, sowie von drei Sauen der Impfgruppe. Antikörpertiter vom Zeitpunkt der Geburt und dem Absetzen der Ferkel 28 Tage später. Die Sauen wurden nicht geimpft

5 Diskussion

5.1 Ergebnisse der klinischen Beobachtungen

5.1.1 Einfluss der oralen Verabreichung einer 10fachen Dosis von Salmoporc[®] am 3. und 21. Lebenstag auf die Körpertemperatur, Säugehäufigkeit und Gesundheit der Ferkel

Zwei Stunden nach der 10fach überdosierten oralen Impfung mit Salmoporc[®] am 3. und am 21. Lebenstag ist eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur zum Ausgangswert bei den Ferkeln der Impfgruppe bis 8 Stunden nach der Impfung zu beobachten. Klinisch traten bei jeweils 3 Ferkeln aus der Impfgruppe milder Durchfall, eine leichte Atemfrequenzerhöhung und Lethargie auf.

Nach der 10fach überdosierten oralen Impfung von Salmoporc[®] am 21. Lebenstag stellte sich bei signifikant mehr Ferkeln aus der Impfgruppe eine Körpertemperatur über 39,8°C ein. Einhergehend mit der erhöhten Körpertemperatur zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten von klinischen Symptomen in Form von Atemfrequenzerhöhung (44 % der Ferkel der Impfgruppe), sowie Lethargie (32 % der Ferkel der Impfgruppe). Ein milder Durchfall wurde bei zwei Ferkeln der Impfgruppe festgestellt. Auch im Bezug auf die Säugehäufigkeit zeigten sich in der Impfgruppe nach der Überdosierung am 21. Lebenstag Unregelmäßigkeiten.

Aufgrund der großen Menge an Endotoxinen, die über die Impfung mit der Bakterienzellwand in den Organismus der Ferkel gelangte, waren die Beobachtungen erklärbar. Die Hauptschadwirkung wird dem in der Bakterienzellwand von gramnegativen vorkommenden Lipopolysaccharid (LPS) zugeschrieben (Selbitz, 1995). In den ersten Stunden einer lokalen Infektion mit Bakterien kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg, sowie zur Aufnahme der Mikroorganismen durch Phagozyten. Phagozyten können die aufgenommenen Bakterien zersetzen. Durch den Kontakt mit dem LPS der Bakterienzellwand von gramnegativen Bakterien werden sie zur Sekretion von Cytokinen angeregt. Hierzu gehören Interleukin 1 (IL1), IL 6, IL 8 sowie der Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Diese Cytokine werden auch als endogene Pyrogene bezeichnet, da sie als körpereigene Substanzen zu einer Erhöhung der Körpertemperatur führen (Rietschel et al., 1993; Janeway, 1994). Sowohl Roth und de Souza (2001), als auch Rummel et al. (2005) haben in unterschiedlichen

Untersuchungen über die Pathogenese von Fieber sowohl nach intravenöser, als auch nach subkutaner Injektion von LPS bei Meerschweinchen eine biphasisch verlaufende Temperaturkurve, mit Temperaturerhöhungen bis zu 2 °C beobachtet. Ihre Ergebnisse decken sich im Bezug auf die Temperaturerhöhungen weitestgehend mit denen der eigenen Untersuchungen. Barrow et al. (2001) untersuchten die Virulenz von den zwei attenuierten *S. Typhimurium*- und *S. Enteritidis*-Impfstämmen für 5 Tage alte gnotobiotische Ferkel. Nach der oralen Verabreichung von 10⁶ koloniebildenden Einheiten der attenuierten Stämme konnte bei ca. der Hälfte der Ferkel milder Durchfall und Temperaturerhöhungen bis 40,3 °C beobachtet werden. Auch bei anderen Impfstoffen wurde als Reaktion auf die Vakzination von Fieber und damit einhergehender Mattigkeit berichtet. So konnten Kristensen et. al., (2004) nach parenteraler Injektion von Vakzinen gegen Mykoplasmen, *Actinobacillus pleuropneumoniae* oder toxinbildende *Pasteurella multocida* bei Sauen, innerhalb von 12 Stunden nach der ersten Injektion, als auch nach der Revakzination Fieber mit einhergehender Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens beobachten.

Die Wirkung von LPS auf den Verdauungstrakt wird in Versuchen an Ratten mit einer verminderten Resorption von Wasser und Glucose im Dünndarm, sowie einer deutlich erhöhten Transportgeschwindigkeit des Chymus durch den Intestinaltrakt beschrieben (Cullen et al., 1999a; Cullen et al., 1999b; Liang et al., 2005), was den auftretenden Durchfall direkt nach der Impfung erklären könnte.

Die Prüfung der Unschädlichkeit einer Überdosis ist für jeden Tierimpfstoff gefordert. Während bei Inaktivatvakzinen diese Überprüfung anhand einer doppelten Dosis erfolgen kann, ist für Lebendimpfstoffe eine Überprüfung der Unschädlichkeit mit einer 10fachen Überdosis vorgeschrieben. Diese Prüfung ist für Virusimpfstoffe meist unproblematisch. Bei der Verabreichung einer 10fachen Überdosis auf der Basis von bakteriellen, gramnegativen Impfstämmen, wie Salmonellen, kann es aber laut Selbitz (2001) zu Schwierigkeiten kommen, da auch avirulente Impfstämme weiterhin in ihren Zellwänden Endotoxine beinhalten, die eine entsprechende Wirkung entfalten können.

5.1.2 Einfluss der oralen Verabreichung einer einfachen Dosis von Salmoporc® am 3. und 21. Lebenstag auf die Körpertemperatur, Säugehäufigkeit und Gesundheit der Ferkel.

Nach der einfach dosierten oralen Impfung am 3. Lebenstag wurden in beiden Versuchsgruppen eine nahezu gleich verlaufende mittlere Körpertemperatur beobachtet (Max.: 39,4°C in der Kontrollgruppe, Max.: 39,5°C in der Impfgruppe). Wobei die maximale Körpertemperatur in der Impfgruppe mit 40,8°C und in der Kontrollgruppe mit 40,1 °C. gemessen wurde

Die beobachteten klinischen Symptome wie Atemfrequenzerhöhung, milder Durchfall und Mattigkeit traten bei je 3 Ferkeln (9 %) der Impfgruppe auf und waren insgesamt schwächer ausgeprägt, als nach der 10fachen Überdosierung des Impfstoffs. Eine gewisse Wirkung der über den Impfstamm in den Organismus der Ferkel gelangten Endotoxine lässt sich in den signifikanten Erhöhungen der mittleren Körpertemperatur zum Ausgangswert 4, 6, 8 und 24 Stunden nach der Impfung erkennen. Insgesamt verlief die Zeit direkt nach der Impfung am 3. Lebenstag problemlos.

Nach der oralen Impfung mit der einfachen Dosis von Salmoporc® am 21. Lebenstag traten praktisch keine relevanten klinischen Symptome auf.

5.2 Einfluss des Impfstoffs auf die Kotkonsistenz und Gewichtsentwicklung im Untersuchungszeitraum von 70 Tagen

5.2.1 Einfluss auf die Kotkonsistenz

Barrow et al. (2001) beobachteten nach der oralen Applikation einer attenuierten *S. Typhimurium* Mutante an 5 Tage alte gnotobiotischen Ferkeln eine Phase mit mildem gelben Durchfall und zeitweiligen Temperaturerhöhungen. Ein Ferkel musste 5 Tage nach der Applikation aus Gründen des Tierschutzes getötet werden, während die anderen Ferkel trotz des Durchfalls eine unverminderte Futteraufnahme und ein gutes Allgemeinbefinden zeigten. In den eigenen Untersuchungen konnte nach der 10fachen Überdosierung der Ferkel mit Salmoporc® am 3. Lebenstag, in einem Zeitraum von 14 Tagen nach der oralen Applikation eine signifikante Häufung von Ferkeln mit Durchfall in der Impfgruppe beobachtet werden. Das Allgemeinbefinden der Ferkel schien trotz des Durchfalls nicht beeinträchtigt.

Die gleiche Beobachtung konnte auch nach der Applikation der einfachen Dosis des Impfstoffs gemacht werden. Durch die Untersuchung von Kottupferproben konnte in beiden Fällen *Clostridium perfringens* vom Typ A festgestellt werden. Da aber auch in den Kontrollgruppen Clostridien vom Typ A bei Ferkeln ohne Durchfall isoliert wurden, ist eine ursächliche Beteiligung des Impfstammes an dem Durchfallgeschehen nicht ausgeschlossen. Neben einer direkt vom Impfstamm ausgehenden Restvirulenz könnte ein möglicher Grund für die Durchfallperiode eine Veränderung der mikrobiellen Darmflora durch die massenhafte Besiedlung des Darms mit dem Impfstamm sein. Clostridien sind ubiquitär verbreitet und kommen auch in gesunden Ferkeln ohne Anzeichen einer Erkrankung vor (Songer u. Uzal, 2005). Taylor (1999) vermutet, dass eine durch Clostridien vom Typ A verursachte klinische Erkrankung mit der Besiedlung des Darms durch andere darmpathogene Erreger assoziiert ist. Grinblat et al. (2004) beobachteten Fälle in der Humanmedizin, wo das Auftreten von Diarrhoe, verursacht durch *Clostridium difficile*, mit dem Vorhandensein von Salmonellen oder Shigellen assoziiert war. Eine mit antimikrobieller Behandlung bei Pferden in Zusammenhang stehende Veränderung der Darmflora mit Folge einer Typhlocolitis, verursacht durch β 2-toxinbildende Clostridien beschreiben Herholz et al. (1999). In der Humanmedizin ist eine durch *Clostridium difficile* induzierten Kolitis in Folge einer Veränderung der Darmflora nach einer Antibiotikatherapie seit langem bekannt (Acheson u. Luccioli, 2004). Die Möglichkeit einer gesteigerten Empfänglichkeit für andere Infektionen durch die Verabreichung von Lebendimpfstoffen diskutieren Wu et al. (1994). Sie machten die Beobachtung, dass durch die Vakzination mit einem attenuierten *Salmonella Typhimurium*-Impfstamm die Empfindlichkeit von Mäusen gegenüber einer *Herpes simplex* Virusinfektion stieg.

5.2.2 Einfluss auf die Gewichtsentwicklung

In Folge der 10fach überdosierten oralen Applikation von Salmoporc[®] stellte sich bei den Ferkeln der Impfgruppe, bereits 4 Tage nach Verabreichung der Überdosis am 3. Lebenstag, ein signifikant geringeres mittleres Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ein (2,7 kg mittleres Gewicht der Impfgruppe, 3,3 kg mittleres Gewicht der Kontrollgruppe). Diese Signifikanz im Unterschied des mittleren Körpergewichts blieb bis zum Versuchsende in der 10. Lebenswoche der Ferkel bestehen. Auf Grund der deutlichen Ergebnisse bezüglich des Gewichts liegt die Vermutung nahe, dass es

entweder durch die große Menge an Lebendimpfstoff direkt, oder durch die begünstigten Verhältnisse in der Darmflora zu einer massiven Vermehrung der Clostridien und durch diese zu Beeinträchtigungen der resorptiven Fähigkeiten des Darms gekommen ist. Nach einer experimentellen Infektion mit *S. Choleraesuis* bei neugeborenen Ferkeln fand Wilkock (1978) eine deutliche Zottenatrophie im Jejunum, nach einer Infektion mit *S. Typhimurium* konnten zwar entzündliche Veränderungen am Jejunum festgestellt werden, Zottenatrophie wurde jedoch nicht beobachtet. Schwartz beschreibt jedoch eine Zottenatrophie in Folge einer Infektion mit *Clostridium perfringens* vom Typ A (Schwartz, 1999) Da der Lebendimpfstoff seine invasiven Eigenschaften weiterhin besitzt, könnte die Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung dosisabhängig sein. Sicherlich spielt die Durchfallphase vom 3. bis 12. Tag nach der ersten Überdosierung ebenfalls eine Rolle im Bezug auf die weitere Entwicklung der Ferkel. Es muss jedoch erwähnt werden, dass eine zweimalige Überdosierung bei der Unschädlichkeitsprüfung nicht vorgesehen und die Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung nach nur einmaliger Überdosierung nicht bewertbar sind.

Bei der einfach dosierten oralen Impfung stellt sich ein signifikanter Unterschied im mittleren Gewicht zum Zeitpunkt des Absetzens mit 4 Wochen zu Gunsten der mit Salmoporc[®] geimpften Ferkel ein. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen verliert sich diese Signifikanz wieder, die Ferkel der Impfgruppe bleiben aber im Mittel schwerer.

5.3 Bakteriologische Untersuchungen

5.3.1 Untersuchung der Organproben

Auf Grund ihrer Fähigkeit in Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren, gelangen Salmonellen über den lymphatischen Weg in den Organismus des Wirts, wo sie in unterschiedlichen Organen persistieren können (Libby, 2004).

In Untersuchungen über das Auftreten von Salmonellen in verschiedenen Organproben und dem Schlachtkörper von Schweinen am Schlachthof konnten Viera-Pinto et al. (2005) die höchste Nachweisrate von Salmonellen in den Lnn. ileocolici, sowie im Dünndarm feststellen. Der nächst häufigste Nachweis gelang aus den Mesenteriallymphknoten und aus den Tonsillen. Nach experimenteller oraler Infektion mit *S. Typhimurium* konnten Coté et al. (2004) außerhalb des

Verdauungsapparates, außer aus Proben von Leber und Milz auch aus Proben der Lunge, der Nieren und der Skelettmuskulatur Salmonellen isolieren.

Bei 5 Tage alten gnotobiotischen Ferkel gelang es Foster et al. (2003) 48 Stunden nach einer experimentellen Infektion von Schweinen mit *S. Typhimurium*, Salmonellen aus Blut, Nieren, Leber, Magen, Duodenum und Ileum sowie aus dem Zäkum und den Ileozäkallymphknoten zu isolieren, wobei die höchsten Nachweisraten aus Organproben des Verdauungstraktes erzielt werden konnten. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit Untersuchungen von Roesler et al. (2004) sowie Gray und Fedorka-Cray (2001) nach experimenteller Infektion von Schweinen mit *S. Typhimurium* bzw. *S. Choleraesuis*. Während Gray et al. (1996) *S. Choleraesuis* aus Proben von Organen experimentell infizierter noch nach 15 Wochen nachweisen konnten, gelang es Wood et al. (1992) nach einer experimentellen Infektion von Schweinen mit *S. Typhimurium* den Erreger sogar noch 7 Monate nach der Infektion in unterschiedlichen Mengen aus den Wänden von Ileum, Kolon und Zäkum nachzuweisen.

In den eigenen Untersuchungen konnte der Impfstamm nach oraler Applikation in absteigender Häufigkeit aus den Ileozäkallymphknoten (8 positive Proben), gefolgt von Proben des Dünndarms (7 positive Proben), dem Blinddarminhalt (5 positive Proben), Proben des Kolons (3 positive Proben) und aus der Lunge (2 positive Proben) isoliert werden. Drei Tage nach der ersten Impfung am 3. Lebenstag wurden auch Proben der Leber, der Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur positiv beprobt. Die Besiedlung der Organe war jedoch zeitlich begrenzt. Der letzte positive Nachweis gelang 3 Wochen nach der zweiten Impfung aus jeweils einer Probe des Dünndarms sowie des Dickdarms und war damit deutlich kürzer als nach einer experimentellen- oder Feldinfektion (Wood et al., 1992; Gray et al., 1996). In Untersuchungen von große Austing (2005) konnte jedoch noch am Tag der Schlachtung von auf dem Flatdeck oral mit Salmoporc[®] geimpften Ferkeln der Impfstamm aus den Tonsillen isoliert werden.

Die zeitlich begrenzte Besiedlung des Organismus der geimpften Tiere ist eine wichtige Voraussetzung um eine Stimulation der zellulären Immunmechanismen zu bewirken. Ohne diesen Effekt ist ein effektiver Impfschutz gegen fakultativ intrazelluläre Bakterien wie Salmonellen nicht zu erreichen (Selbitz, 1995; Selbitz, 2001; Haesebrouk et al., 2004; Murtough, 2004).

Des Weiteren ist die zeitliche Begrenzung der Überlebensfähigkeit ein wichtiges Merkmal der Attenuierung. Kontaminationen von Schlachtkörpern oder Geräten während des Schlachtprozesses, oder sogar die Kontamination von Nahrungsmitteln durch den eventuell persistierenden Impfstamm sind auf jeden Fall zu vermeiden.

5.3.2 Ausscheidung des Impfstamms

Laut Selbitz (2001) muss bei der oralen Verabreichung eines Impfstoffes immer davon ausgegangen werden, dass es zur Ausscheidung des Impfstamms mit dem Kot kommt. In einem Versuch mit parenteral mit Salmoporc[®] geimpften Sauen sowie deren oral geimpften Ferkeln, konnte der Impfstamm auch aus dem Kot der Sauen isoliert werden. Ortmann et al. (2004) erklären diese Beobachtung durch die Ausscheidung des Impfstammes mit dem Kot der Ferkel und oraler Aufnahme durch die Sauen. Große Austing (2005) beobachtete ebenfalls die Ausscheidung des Impfstammes von Salmoporc[®] nach oraler Impfung zu Beginn der Aufzuchtphase. Schweine die eine akute Salmonellose überstanden haben, bzw. die latente Träger von Salmonellen sind, können diese bis zu 5 Wochen nach der Infektion mit dem Kot ausscheiden (Schwartz, 1999; Waldmann u. Wendt, 2004).

Für zwei Tage alte mit *S. Choleraesuis* infizierte Saugferkel konnten Anderson et al. (2000) die Ausscheidung des Erregers bis zum 85. Tag nach der Infektion nachweisen. Nach einem Infektionsversuch mit *S. Typhimurium* haben Wood et al. (1992) noch 7 Monaten nach der Infektion den Erreger in unterschiedlichen Mengen aus dem Kot isoliert.

In der vorliegenden Untersuchung war die Ausscheidung des Impfstamms nach oraler Verabreichung zeitlich begrenzt und deutlich kürzer als nach einer natürlichen, oder in Infektionsversuchen mit Feldstämmen stattgefundenen Infektion. Nach der oralen Verabreichung der 10fachen Überdosis (dieses entspricht ca. 5×10^9 koloniebildenden Einheiten) am 21. Lebenstag, gelang der letzte bakteriologische Nachweis des Impfstamms in der Impfgruppe am 70. Lebenstag der Ferkel d.h., 7 Wochen nach der letzten Gabe des Impfstoffes. Nach einfacher Dosierung (ca. 5×10^8 koloniebildende Einheiten) von Salmoporc[®] gelang der letzte Nachweis vom Impfstamm im Kot der geimpften Ferkel 7 Tage nach der zweiten Impfung im Alter von 3 Wochen. Gray et al. (1996) konnten zeigen, dass die Dauer der Ausscheidung von Salmonellen von der Infektionsdosis abhängig ist. Während Schweine, die mit 10^9 koloniebildenden Einheiten mit *S. Choleraesuis*

infiziert wurden den Erreger bis zur 15. Woche p.l. ausschieden, war die Ausscheidungsdauer bei Schweinen mit 10^6 oder 10^3 koloniebildenden Einheiten infiziert wurden, mit 9 Wochen deutlich kürzer.

5.4 Serologische Untersuchungen

5.4.1 Serologische Untersuchung der Ferkel

Nach einer experimentellen Infektion von Ferkeln in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen mit *S. Typhimurium* konnten Steinbach et al. (2003) deutlich ansteigende Antikörpertiter im Serum der infizierten Ferkel 7 Tage nach der Infektion feststellen. Nach einer Woche zeigten 22,5% und nach zwei Wochen bereits 52,9% aller infizierten Ferkel Antikörpertiter die im Sinne des Salmonellen-Kontroll-Programms mit ≥ 40 OD% als positiv zu bewerten waren. Nielsen et al. (1995) beobachteten nach experimenteller Infektion mit *S. Typhimurium*, dass bis auf ein Ferkel alle infizierten Tiere einen steigenden Antikörpertiter aufwiesen. Die maximale anti-LPS Antwort wurde drei Wochen nach der Infektion beobachtet, als 86% der infizierten Ferkel serokonvertiert hatten. Die höchste Rate an serokonvertierten Ferkeln konnte jedoch erst am Tag 30 und Tag 37 nach der Infektion mit 92% serokonvertierten Ferkeln ermittelt werden. Die Zeit, welche die Ferkel zur Serokonversion benötigten geben Nielsen et al. (1995) mit einer Zeitspanne zwischen 6 und 37 Tagen an.

In den eigenen Untersuchungen wurde nach der oralen Verabreichung des Impfstamms am 3. Lebenstag, die erste Kontrolle des Antikörpertiters am 21. Lebenstag kurz vor der zweiten Immunisierung durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass weder Ferkel der Impfgruppe (max. OD%-Wert: 7,8), noch Ferkel der Kontrollgruppe (max. OD%-Wert 7,6) Anzeichen einer Serokonversion zeigten. Eine Erklärung hierfür könnten die relativ hohen Antikörpertiter bei den Ferkeln vor der ersten oralen Immunisierung sein, die wahrscheinlich über das Kolostrum der Sauen auf die Ferkel übertragen wurden.

Es ist jedoch fraglich, ob maternalen Antikörper die Ausbildung eigener Antikörper bei den Ferkeln verhindern. Da am 3. sowie 7. Tag nach der ersten Impfung sowohl aus den Ileozäkallymphknoten als auch aus Dünndarm- und Dickdarmproben der Impfstamm isoliert werden konnte, muss der Impfstamm zumindest über die Darmschranke gelangt sein. Dieses würde eine Konfrontation des Impfstamms mit

den zellulären Abwehrmechanismen bedeuten. Methner und Steinbach (1997) diskutieren bei Untersuchungen über die Wirksamkeit maternaler Antikörper gegen eine orale Testinfektion bei Küken die Möglichkeit, dass ein Immunisierungsversuch bei Eintagsküken durch maternale Antikörper scheitern könnte und empfehlen die Immunisierung in der 2. und 4. Lebenswoche.

Wilcock (1978) diskutiert eine nur schwache Protektivität maternaler Antikörper bei Ferkeln gegenüber Salmonellen, da es ihm gelungen war, bei mit Kolostrum versorgten Ferkeln durch orale Verabreichung von *S. Typhimurium* oder *S. Choleraesuis* eine klinische Salmonellose auszulösen.

Des Weiteren stellt sich die Frage nach der Immunkompetenz 3 Tage alter Ferkel. Baljier (2002) sieht den Erfolg einer Immunisierung von Seiten des Impflings abhängig von seiner Impffähigkeit, die durch den aktuellen Gesundheitsstatus, sowie die Immunkompetenz gekennzeichnet ist. Unter normalen Umständen folgt nach der Auseinandersetzung von Salmonellen oder anderen Pathogenen mit der zellulären Immunabwehr nach ca. 5-7 Tagen die Bildung spezifischer Antikörper (Steinbach et al., 2003; Nielsen et al. 1995; Ohlinger, 1995). Für Küken konnten Methner und Steinbach (1997) eine deutliche eigene Synthese von Antikörpern erst ab dem 21. Lebenstag feststellen.

In Untersuchungen mit 3 enterotoxischen *E. coli* Stämmen konnte Tzipori (1982) eine altersabhängige Reaktion auf die 3 Stämme feststellen. Die Ausprägung der klinischen Erscheinung, sowie die Anzahl von Todesfällen nach der Infektion nahmen bei Ferkeln mit einem Alter von einem Tag bis sieben Tagen signifikant ab.

Nach der oralen Impfung am 21. Lebenstag konnte wie bei Nielsen et al. (1995) und Steinbach et al. (2003c) eine Woche nach der Impfung ein deutlicher Anstieg des mittleren Antikörpertiters beobachtet werden. Der höchste mittlere Antikörpertiter konnte in den eigenen Untersuchungen 49 Tage nach der zweiten Impfung festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt hatten auch die meisten Einzeltiere serokonvertiert. Ähnlich wie in den Untersuchungen von Nielsen et al. (1995) brauchten die Ferkel zwischen 7 und 35 Tage für die Serokonversion. Die Entwicklung des Antikörpertiters bei den Ferkeln der Kontrollgruppe verhielt sich bis zum 21. Lebenstag wie in der Impfgruppe. Ab dem 42. Lebenstag der Ferkel ist der Mittelwert des Antikörpertiters der Ferkel aus der Impfgruppe signifikant höher als bei den Kontrolltieren. Auf Grund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen

werden, dass der steigende Antikörpertiter bei den Ferkeln der Impfgruppe auf die orale Verabreichung des Impfstoffs am 21. Lebenstag zurückzuführen ist.

5.4.2 Serologische Untersuchung der Muttersauen

Zu Beginn der Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass die angekauften Jungsaugen als salmonellenunbelastet anzusehen sind. Die Jungsaugen stammten aus einem geschlossenen Vermehrerbetrieb, bei dem es im Rahmen des QS-Salmonellenüberwachungsprogramms nie zu Beanstandungen gekommen war. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf dem Bestand ca. 4 Wochen vor dem Einstellen in den Versuchstall lagen zwischen 11,3 und maximal 25,8 OD%. Die serologischen Untersuchungen zum Zeitpunkt der Geburt und nach dem Absetzen ergaben wesentlich höhere OD%-Werte. Zum Geburtszeitpunkt lagen die OD%-Werte bei den Sauen der Kontrollgruppe bei 25,6 / 36,6 und 33,3 OD%. In der Impfgruppe lagen die OD%-Werte mit 28,9 / 32,1 und 26,5 OD%. Nach dem Absetzen der Ferkel kam es bei jeweils einer Sau der Impf- und Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg des OD%-Werts, so dass diese Sauen mit 46,7 OD% bei einer Jungsau der Kontrollgruppe und 40,2 OD% bei einer Jungsau der Impfgruppe im Sinne des QS-Überwachungsprogramms als positiv zu bewerten waren. Obwohl die bakteriologischen Untersuchungen von Kotproben der Sauen auf Salmonellen nie ein positives Ergebnis ergaben, liegt die Vermutung nahe, dass die Jungsaugen entweder noch auf dem Herkunftsbetrieb, oder im Versuchstall Kontakt zu Salmonellen hatte. Diese Beobachtung würde auch die relativ hohen Antikörpertiter bei den Ferkeln am 3. Lebenstag erklären. Da Sauen der Impf- und Kontrollgruppe im selben Stall nebeneinander gehalten wurden, ist die Übertragung des Impfstamms von geimpften Ferkeln auf ungeimpfte Sauen trotz der Bemühungen einer strengen Trennung von Materialien die mit den geimpften Ferkeln in Berührung kamen, denkbar, aber eher unwahrscheinlich. Gegen eine Kontamination der Sauen spricht auch die Tatsache, dass es bei den Ferkeln der Kontrollgruppe weder in Organproben noch in Kotproben zu positiven bakteriologischen Befunden bezüglich des Impfstamms gekommen ist.

6 Schlussfolgerungen

6.1 Verträglichkeit einer 10fachen Dosis

Die orale Verabreichung einer 10fachen Dosis des Impfstoffs am 3. Lebenstag ist für die Ferkel mit einer vorübergehenden Erhöhung der Körpertemperatur über den Impfzeitraum und milden klinischen Symptomen wie Fieber, Atemfrequenzerhöhung und Abgeschlagenheit verbunden aber weitestgehend verträglich. Die überdosierte Anwendung führt zu einer erhöhten Gefahr von Durchfall in einem Zeitraum von 14 Tagen nach der Applikation. Bei einer wiederholten Überdosierung ist jedoch mit einem vermehrten Auftreten von klinischen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Atemfrequenzerhöhung zu rechnen. Eine geringere Gewichtszunahme ist als Folge einer wiederholten Überdosierung nicht auszuschließen.

6.2 Verträglichkeit einer einfachen Dosis am 3. und 21.Lebenstag

Die orale Verabreichung der vom Hersteller empfohlenen Dosis führt in Einzelfällen zu einer zeitlich begrenzten Körpertemperaturerhöhung sowie Atemfrequenzerhöhung, Abgeschlagenheit oder Fieber bei den geimpften Tieren. Die Impfungen werden von den Ferkeln zu beiden Impfzeitpunkten insgesamt gut vertragen.

6.3 Organbesiedlung und Persistenz des Impfstamms

Die Besiedlung der beprobten Organe findet statt, ist aber zeitlich begrenzt, womit die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Stimulation der zellulären Immunmechanismen erfüllt sind. Eine Kontamination von Schlachtkörpern und Organen von geimpften Mastschweinen durch den Impfstamm, die zu falschpositiven bakteriologischen Salmonellenbefunden auf dem Schlachthof führen könnten kann zumindest für die beprobten Organe mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

6.4 Dauer der Impfstammausscheidung

Die Dauer der Impfstammausscheidung ist dosisabhängig zeitlich begrenzt. Nach Verabreichung der vom Hersteller empfohlenen Impfdosis am 3. und 21. Lebenstag ist ein Verschleppen des Impfstamms durch 10 Wochen alte Ferkel in einen Mastbestand nicht zu befürchten. Somit sind durch den Impfstamm verursachte serologische Reaktionen bei nicht geimpften Mastschweinen nicht sehr wahrscheinlich. Bei einer versehentlichen Überdosierung kann der Impfstamm durch die längere Ausscheidungsphase mit in die Mast gelangen.

6.5 Immunologische Reaktionen

Eine messbare Immunantwort in Form spezifischer Antikörper gegen das LPS von Salmonellen kann nach einer oralen Impfung am 3. Lebenstag nicht erreicht werden. Eine Beeinträchtigung in der Wirksamkeit des Impfstoffes für diesen frühen Impfzeitpunkt durch maternale Antikörper ist nicht auszuschließen. Da nach der oralen Impfung am 21. Lebenstag langsam ansteigende Antikörpertiter zu beobachten sind, wäre eine Immunisierung der Muttersauen sowie anschließende Immunisierung ihrer Ferkel am 21. Lebenstag in Erwägung zu ziehen. Wie belastbar und von welcher Dauer die nach einer Impfung am 3. und 21. Lebenstag entstehende Immunität tatsächlich ist, muss mit einer größeren Tierzahl unter Feldbedingungen erprobt werden.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung sollte der *Salmonella Typhimurium*-Lebendimpfstoff Salmoporc[®] auf seine Verträglichkeit nach oraler Applikation für Ferkel mit einem Erstimmunisierungsalter von 3 Tagen, sowie einer Revakzination am 21. Lebenstag untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden salmonellenfreie Ferkel an ihrem 3. sowie 21. Lebenstag mit der 10fachen der normalen, sowie in einem weiteren Versuch mit der Vom Hersteller empfohlenen Dosis oral geimpft. Als Negativkontrolle dienten in beiden Versuchen Ferkel, die eine äquivalente Menge steriler, physiologischer Kochsalzlösung oral verabreicht bekamen. Bis 8 Stunden nach der Impfung wurde bei allen Ferkeln kontinuierlich die Kotkonsistenz, Körpertemperatur, Säugehäufigkeit und das Allgemeinbefinden bewertet. Des weiteren erfolgten bis zum Ende des Versuchszeitraums in der 10. Lebenswoche der Ferkel neben der täglichen Kontrolle der Körpertemperatur und Kotkonsistenz eine wöchentliche Gewichtskontrolle, sowie bakteriologische Untersuchungen über die Dauer der Impfstammausscheidung. Zusätzlich zu den oben erwähnten Parametern wurde die Verteilung und Peristenz des Impfstamms in verschiedenen Geweben der Ferkel nach zweimaliger Applikation der einfachen Dosis am 3. und 21. Lebenstag. Die Immunantwort nach der einfach dosierten Impfung wurde mittels serologischer Untersuchung auf Salmonella-Antikörper überprüft. Die 10fache normale Dosis des Impfstoffs führte zu beiden Impfzeitpunkten bei den geimpften Ferkeln zu einem signifikanten Ansteigen der Körpertemperatur. Die Anzahl der Ferkel mit einer Körpertemperatur über 39,8°C war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größer. Nach der Überdosierung am 3. Lebenstag traten bei je drei Ferkeln der Impfgruppe Lethargie, Atemfrequenzerhöhung und milder Durchfall auf. Eine signifikante Häufung im Auftreten von Ferkeln mit Atemfrequenzerhöhung und Lethargie sowie eine geringere Säugehäufigkeit bei den Ferkeln der Impfgruppe war nach der erneuten Überdosierung am 21. Lebenstag zu beobachten. Die 10fach überdosierten Ferkel wiesen bereits 4 Tage nach der ersten Überdosierung ein signifikant geringeres Gewicht auf. Dieser Status blieb bis zum Versuchsende in der zehnten Lebenswoche der Ferkel erhalten. Nach der einfach dosierten Impfung waren die Ferkel der Impfgruppe am Tag des Absetzens signifikant schwerer. Ein signifikant häufigeres Auftreten von Durchfall konnte sowohl nach Verabreichung der einfachen als auch der zehnfachen Dosis des Impfstoffs innerhalb von 14 Tagen

nach der ersten Impfung, sowie im Zeitraum von 14 Tagen nach der zweiten Impfung bei einfacher Dosierung beobachtet werden. Nach Verabreichung der 10fachen Dosis des Impfstoffs gelang der letzte kulturelle Nachweis des Impfstamms im Kot der geimpften Ferkel am 49. Tag nach der zweiten Impfstoffapplikation (70. Lebenstag der Ferkel). Nach der Applikation der einfachen Dosis wurde der Impfstamm letztmalig 7 Tage nach der zweiten Impfung (28. Lebenstag der Ferkel) im Kot nachgewiesen. Die Besiedlung der untersuchten Gewebe durch den Impfstamm nach der einfach dosierten Impfung war zeitlich begrenzt. Der letzte Nachweis des Impfstamms gelang 6 Wochen nach der zweiten Impfung aus Proben des Dünndarms und Dickdarms. Der Impfstamm wurde in absteigender Häufigkeit aus Proben der Ileozäkallymphknoten, des Dünndarms, Blinddarminhalts, Dickdarms, der Lunge sowie aus Proben der Leber und Skelett- sowie Herzmuskulatur nachgewiesen. Aus Proben der Nieren konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt der Impfstamm isoliert werden. Feldstämme wurden weder aus Kot- noch aus den Organproben von Impf- oder Kontrollgruppe isoliert. Die Kontrolltiere blieben bakteriologisch in beiden Versuchen bis zum Ende des Versuchszeitraums Impf- und Feldstamm negativ. Eine Serokonversion wurde ab dem 7. Tag nach der zweiten Impfung beobachtet. Die mittlere Antikörperkonzentration der geimpften Ferkel war ab der 3. Woche nach der zweiten Immunisierung signifikant höher als die der Kontrolltiere. Die maximale mittlere Antikörperkonzentration im Serum der Ferkel wurde 49 Tage nach der zweiten Impfung gemessen.

8 Summary

Safety of *Salmonella Typhimurium*-live vaccine Salmoporc[®] in oral application in 3 day old piglets with consideration of elimination, persistence and immunogenicity of the vaccine strain

The aim of the present study was to examine the *Salmonella Typhimurium* live vaccine Salmoporc[®] for its safety for 3 days old piglets applied by the oral route. Therefore *Salmonella* negative piglets were vaccinated orally twice with a 10fold overdose of the vaccine when the piglets were 3 and day 21 days old.

In a second assay investigations about the immunological response to this early vaccination were made and spread and persistence of the vaccine strain in different tissues were investigated. The piglets in this group were vaccinated with a single dose of the vaccine also at day 3 and 21.

In both cases negative control piglets within the same age were given an equivalent amount of sterile physiological saline solution orally. In both investigations, the faeces consistence, body temperature, suckling frequency and general health were evaluated in a period of time comprising 8 hours after vaccination. Control of body weight and bacteriological examinations concerning the shedding of the vaccine strain, were done weekly. Furthermore, serological surveys concerning the immunological response to this early vaccination were made.

As a result of the 10fold overdosed vaccination at day 3 and 21, an increase of the mean body temperature was seen lasting 8 hours after vaccination. The number of piglets showing a body temperature higher than 39, 8°C was significant higher for the overdosed pigs at both time points. No significance concerning clinical signs and suckling frequency were observed between vaccinated piglets and the control group after the first overdose.

In a consequence of the 10fold overdosed vaccination at day 21, a significant increase in respiration frequency and lethargic behaviour as well a decreasing frequency of suckling was seen within the piglets of the vaccination group. From the fourth day after the overdosed vaccination until the end of the tenth living week of the vaccinated piglets, a significant lower mean body weight was measured in comparison to the control group. After the single dosed vaccination on day 3 and 21 the piglets of the vaccinated group had a significant higher mean body

weight at the time of weaning at the age of 4 weeks. A significant increase in the occurrence of diarrhoea could be observed in both assays in time course of 14 days after the first vaccination, as well as in time course of 14 days after the second vaccination with one fold dose of vaccine. After the ten fold overdosed vaccination, the vaccination strain was detected in the faeces at latest at day 49 after the second vaccine application. In case of the one fold vaccinated piglets, the vaccine strain was detected in faeces at least until day 7 after the second vaccination. The colonization of the internal tissues with the vaccine strain was timely restricted until six weeks after the second immunization, as a sample of the ileum and the colon have been found to be positive. The vaccine strain was isolated in decreasing amounts from samples of the ileocecal lymph nodes, the ileum, caecum content, colon, lung as well as in samples of the liver and skeletal- and heart muscle. Samples from the kidney were not found to be positive for the vaccine strain at any time. Salmonella field strains could be detected neither in the control nor in the vaccinated group in any time during this study. A serological response in answer to the single dosed vaccination on day 3 and 21 could be seen from day 7 after the second vaccination. A significant higher mean antibody concentration in the serum of the piglets of the vaccinated group could be detected from the third week after the second vaccination until the end of the study after ten weeks. The maximum of the mean antibody concentration was measured 49 days after the second vaccination.

9 Literatur:

Acheson, D. W. K., S. Luciola (2004):

Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses.
Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 18, 387-404

**Allen, C. A., P. J. Fedorka-Cray, A. Vasquez-Torres, M. Suyemoto, C. Altier,
L. R. Ryder, F. C. Fang, S. J. Libby (2001):**

In vitro and in vivo assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 virulence.
Infect. Immun. 69, 4673-4677

Althouse, C., S. Patterson, P. Fedorka-Cray, R. E. Isaacson (2003):

Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo.
Infect. Immun. 71, 6446-6452

Anderson, R. C., K. J. Genovese, R. B. Harvey, L. H. Stanker, J. R. DeLoach, D. J. Nisbet (2000):

Assessment of the long-term shedding pattern of *Salmonella* serovar *Choleraesuis* following experimental infection of neonatal piglets.
J. Vet. Diagn. Invest. 12, 257-260

Audia, J. P., C. C. Webb, J. W. Foster (2001):

Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria.
Int. J. Med. Microbiol. 291, 97-106

Baljer, G. (2002):

Passive und aktive Immunisierung: Voraussetzungen für ihre erfolgreiche Anwendung in der Veterinär- und Humanmedizin.
In: Zur Sicherheit von Tierarzneimitteln
Schriftenreihe der Akademie für Tiergesundheit 8, 188-200
Enke Verlag, Stuttgart

Barrow, P. A., K. Page, M. A. Lovell (2001):

The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis.
Vaccine 19, 3432-3436

Bauer, J., S. Hörmannsdorfer (1995):

Salmonellosen bei Nutztieren.
Fleischwirtsch. 75, 958-960

Baumler, A. J., R. M. Tsois, F. Heffron (1996):

The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella Typhimurium* to murine peyer's patches.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 279-283

Bisping, W., G. Amtsberg (1988):

Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere.
Paul Parey Verlag, Berlin Hamburg, 171-182

Blaha, T. (1993):

Die Ausbreitungsdynamik von Salmonellen in Tierbeständen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 100, 278-280

Blaha, T. (2001):

Die Bekämpfung von Salmonellen starten. Ein wichtiger Beitrag zum Verbraucherschutz.
Fleischwirtsch. 10, 15-18

Blanc-Potard, A. B., E. A. Groisman (1997):

The *Salmonella* *se/C* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival.
EMBO J. 16, 5376-5385

Böhm, R. (1993):

Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 100, 275-278

Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, S. Falkow (1998):

Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island type III secretion system and its role in intracellular survival.
Mol. Microbiol. 30, 175-188

Clark, M. A., B. H. Hirst, M. A. Jepson (1998):

Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M-cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella Typhimurium*.
Infect. Immun. 66, 724-731

Coe, N. E., R. L. Wood (1992):

The effect of exposure to a Δ *cya*/ Δ *crp* mutant of *Salmonella Typhimurium* on the subsequent colonization of swine by the wild-type parent strain.
Vet. Microbiol. 31, 207-220

Coté, S., A. Letellier, L. Lessard, S. Quessy (2004) :

Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infections in pigs.
Can. J. Vet. Res. 68, 241-248

Cullen, J. J., D. Mercer, M. Hinkhouse, K. S. Ephgrave, J. L. Conklin (1999a):

Effects of endotoxin on regulation of intestinal smooth muscle nitric oxide synthase and intestinal transit.
Surgery 125, 339-344

Cullen, J. J., R. C. Doty, S. K. Ephgrave, M. M. Hinkhouse, K. Broadhurst (1999b):

Changes in intestinal transit and absorption during endotoxemia are dose dependent.
J. Surg. Res. 81, 81-86

Davies, R. H., M. Breslin (2002):

Persistence of Salmonella Enteritidis Phage Type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm.

Environ. Microbiol. 5, 79-84

De Medici, D., L. Croci, E. Delibato, S. Di Pasquale, E. Filetici und L. Toti (2003):

Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry.

Appl. Environ. Microbiol. 69, 3456-3461

Deiwick, J., T. Nikolaus, J. E. Shea, C. Gleeson, D. W. Holden, M. Hensel (1998):

Mutations in Salmonella pathogenicity island 2 SPI2 genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents.

J. Bacteriol. 180, 4775-4780

Donne, E., F. Pasmans, F. Boyen, F. Van Immerseel, C. Adriaensen, JP. Hernalsteens, R. Ducatelle, F. Haesebrouck (2005):

Survival of *Salmonella* serovar *Typhimurium* inside porcine monocytes is associated with complement binding and suppression of the production of reactive oxygen species.

Vet Microbiol. 107, 205-214

Dorn, C., A. Schroeter, R. Helmuth (2002):

Bericht über die im Jahr 1999 an das Deutsche Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabor für Salmonellen eingesandten Salmonella-Isolate.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 115, 252-258

Erol, I., J. Kleer, G. Hildebrandt, A. Yurtyeri (1999):

Kopplung von immunomagnetischer Separation und Polymerase-Kettenreaktion zum Schnellnachweis von Salmonellen in Hackfleisch und Geflügelinnereien.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 100-103

Finlay, B. B., S. Ruschkowski, S. Dedhar. (1991):

Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells.

J. Cell. Biol. 99, 283-296

Foster, N., M. A. Lovell, K. L. Marston, S. D. Hulme, A. J. Frost, P. Bland, P. A. Barrow (2003):

Rapid Protection of Gnotobiotic Pigs against Experimental Salmonellosis following induction of polymorphonuclear leukocytes by avirulent *Salmonella Enterica*.

Infect. Immun. 71, 2182-2191

Francis, C. L., M. N. Starnbach, S. Falkow (1992):

Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella Typhimurium* grown under low-oxygen conditions.

Mol. Microbiol. 62, 3077-3087

Fravalo, P., J. P. Chanet, M. Mas, E. Huchet, S. Queguiner, G. Salvat (2001):

Feasibility of fluorescent detection of pathogens on pork carcasses.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 393-396

Funk J. R., I. T. Harris, P.R. Davies (2005):

Comparison of fecal culture and Danish Mix-Elisa for determination of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* prevalence in growing swine.

Vet. Microbiol. 107, 115-126

Galan, J. E. (1996):

Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells.

Mol. Microbiol. 20, 263-271

Galan, J. E. (2001):

Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work.

Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17, 53-86

Galan, J. E., R. Curtiss (1990):

Expression of *Salmonella Typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling.

Infect. Immun. 58, 1879-1885.

Garcia-Del Portillo, F, B. B. Finlay (1994):

Salmonella Invasion of Nonphagocytic Cells Induces Formation of Makropinosomes in Host Cell

Infect. Immun. 62, 4641-4645

Gray, J. T., T. J. Stabel, P. J. Fedorka-Cray (1996):

Effect of dose on the immune response and persistence of *Salmonella Choleraesuis* infection in swine.

Am. J. Vet. Res. 57, 313-319

Gray J.T., P. J. Fedorka-Cray (2001):

Long-term survival and infectivity of Salmonella Choleraesuis.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 370-374

Grinblat, J., A. Weiss, B. Grosman, D. Dicker, Y. Beloosesky (2004):

Diarrhea in elderly patients due to *Clostridium difficile* associated with *Salmonella* and *Shigella* infection.

Arch. Gerontol. Geriatr. 39, 277-282

Groisman, E. A., H. Ochman (1997):

How Salmonella became a pathogen.

Trends Microbiol. 5, 343-349

Große Austing, M., T. Blaha (2004):

Identifying risk factors for the occurrence of zoonotic Salmonella in pig herds and the pig's environment.

Proc.:18th Congress International Pig Veterinary Society, Hamburg, 858

Große Austing, M. (2005):

Untersuchungen zum Auftreten von Salmonelleninfektionen in Schweinebeständen

Vet. Med. Diss. Hannover

Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, A. Decostere (2004):

Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?
Vet. Microbiol. 100, 255-268

Helmuth, R. (1993):

Molekularbiologische Grundlagen der Virulenz von Salmonellen und daraus resultierende neuere Nachweisverfahren.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 100, 252-255

Helmuth, R., A. Schroeter, C. Dorn (2002):

Zum Vorkommen von Salmonellen beim Schwein.
Abstract.: 21. Jenaer Symposium: Zoonosen des Schweins, 4

Hensel, A., U. Roesler (2003):

Bestandsspezifische Vakzinen – Strategien zur Salmonellenbekämpfung in Schweinezuchtbetrieben.
Abstract.: 44. Fortbildung über Schweinekrankheiten, TiHo. Hannover

Herholz, C., R. Miserez, J. Nicolet, J. Fey, M. Popoff, M. Gibert, H. Gerber, R. Straub (1999):

Prevalence of β -Toxigenic *Clostridium perfringens* in Horses with Intestinal Disorders.
J. Clin. Microbiol. 37, 358-361

Hernandez, L. D., M. Pypaert, A. Richard, J. E. Galan (2003):

A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy.
J. Cell. Biol. 163, 1123-1131

Janeway, C. (1994):

Die adaptive Immunantwort
In: C. A. Janeway, P. Travers (Hrsg.):
Immunologie, 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
Oxford, 241-281

Jones B. D., H. F. Paterson, A. Hall, S. Falkow (1993):

Salmonella Typhimurium induces membrane ruffling by a growth factor receptor independent mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 10390-10394

Jørgensen, L. (2005):

Erfahrungen in Dänemark zur Salmonellen-Prävalenz bei Schweinen in Abhängigkeit von Futter und Fütterung.
Abstract.: Zur Bedeutung von Futter und Fütterung bei Salmonellen-Infektionen in Schweinebeständen, Fortbildungsveranstaltung 09. Sept. TiHo, Hannover

Jørgensen, L., H. D. Kjaersgard, H. Wachmann, B. B. Jensen, K. E. Bach-Knudsen (2001):

Effect of pelleting and use of lactic acid in feed on *Salmonella* prevalence and productivity in weaners.

Proc.: 4th Int. Symp. on Epidemiology and Control of *Salmonella* and other Foodborne Pathogens in Pork, Leipzig, 109-111

Köhler, B. (1993):

Beispiele für die Anreicherung von *Salmonellen* in der Umwelt.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 100, 264-274

Kramer, T. T., M. B. Roof, R. R., (1992):

Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella Choleraesuis* for vaccination of swine.

Am. J. Vet. Res. 53, 444-448

Kramer, T. T. (1995):

Swine Salmonellosis: What is new about it?

Agri-Practice 16, 13-16

Kristensen, C., M. Andreasen, A. K. Ersbøll, J. P. Nielsen (2004):

Antibodyresponse in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*, toxigenic *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Can. J. Vet. Res. 68, 66-70

Lee, H. A., G. M. Wyatt, S. Bramham, M. R. A. Morgan (1990):

Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella Typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection.

Appl. Environ. Microbiol. 56, 1541-1546

Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, J. W. Foster (1995):

The stationary-phase sigma S RpoS is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella Typhimurium*.

Mol. Microbiol. 17, 155-167

Liang, H. C., H. J. Liu, S. H. Chen, C. C. Chen, L. S. Chou, L. H. Tsai (2005):

Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E2.

World J. Gastroenterol. 11, 357-361

Lumsden, J. S., B. N. Wilkie, R. C. Clarke (1991):

Resistance to faecal shedding in pigs and chickens vaccinated with an aromatic dependent mutant of *Salmonella Typhimurium*.

Am. J. Vet. Res. 52, 1784-1787

Maestroni, P., N. Menager (2003):

Development of acquired immunity to *Salmonella*.

J. Med. Microbiol. 52, 453-459

Methner, U., G. Steinbach (1997):

Wirksamkeit maternaler Salmonellaantikörper gegen eine orale Testinfektion von Küken mit *Salmonella* Enteritidis.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 391-396

Meyer, H., G. Steinbach, U. Methner (1993):

Bekämpfung von Salmonella-Infektionen in Tierbeständen – Grundlage der Reduzierung des Salmonelleneintrags in Lebensmitteln.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 100, 292-295

Mills, D. M., V. Bajaj, C. A. Lee (1995):

A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella Typhimurium* invasion genes is absent from corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome.

Mol. Microbiol. 15, 749-759

Murrey, R. A., C. A. Lee (2000):

Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that salmonella pathogenicity island 1 has alternative functions during infection.

Infect. Immun. 68, 5050-5055

Neutra, M. R., A. Frey, J.-P. Kraehenbuhl (1996):

Epithelial M Cells: Gateway for mucosal infection and immunisation.

Cell. 86, 345-348

Murtough, P. (2004):

Schweineimmunologie und Infektionsimmunität.

Nutztierpraxis Aktuell 9, 36-39

Nielsen B., D. Baggesen, F. Bager, J. Haugegaard, P. Lind (1995):

The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations.

Vet. Microbiol. 47, 205-218

Nollet, N., D. Maes, L. Duchateau, V. Hautekiet, K. Houf, J. Hoof, L. De Zuttera, A. De Kruif, R. Geers (2005):

Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the result of serological screening in slaughter pigs.

Vet. Res. 36, 545-555

Ohlinger, (1995):

Passive und aktive Immunisierung.

In: Schutzimpfung bei Tieren -Gegenwart und Zukunft-
Schriftenreihe der Akademie für Tiergesundheit 5, 20-29

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

Oliveira, C. J. B., L. F. O. S Carvalho, T. B Garcia (2004):

Experimental aerogenic transmission of *Salmonella Agona* in weaned pigs.

Proc.: 18th Congress International Pig Veterinary Society, Hamburg, 653

Ortmann R., W. Leyk, S. Jungnitz, K.-H. Waldmann, H.-J. Selbitz (2004):
Immunisierungsversuche mit einer Salmonella Typhimurium-Lebendvakzine zur Bekämpfung von Salmonella-Infektionen bei Zuchtsauen.
Prakt. Tierarzt 85, 273-280

Øverland, M. (2005):

Fütterungsmaßnahmen gegen das Vorkommen von Salmonellen im Verdauungstrakt von Schweinen.

Abstract.: Zur Bedeutung von Futter und Fütterung bei Salmonellen-Infektionen in Schweinebeständen, Fortbildungsveranstaltung 09. Sept. TiHo Hannover

Pan, T. M, Liu, Y. J. (2002):

Identification of *Salmonella Enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction.

J. Microbiol. Immunol. Infect. 35, 147-151

Proux, K., C. Houdayer, F. Humbert, R. Cariolet, V. Rose, E. Eveno, F. Madec (2000):

Development of a complete ELISA using Salmonella lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs.

Vet. Res. 31, 481-490

Proux, K., R. Cariolet, P. Fravallo, C. Houdayer, A. Keranflech, F. Madec (2001):

Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella Typhimurium*.

Vet. Res. 32, 591-600

Rabsch, W., H. Tschäpe, A. J. Bäumlner (2001):

Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems

Microbes Infect. 3, 237-247

Reed, W. M., H. J. Olander, H. L. Thaker (1986):

Studies on the pathogenesis of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Choleraesuis* var. *kunzendorf* infection in weanling pigs.

Am. J. Vet. Res. 47, 75-83

Rietschel , E. T., L. Brade, F. U. Schade, U. Seydel, U. Zähringer, U. Mamat, G. Schmidt, A.-J.- Ulmer, H. Loppnow, H.-D. Flad, F. di Padova, M. H. Schreier, H. Brade (1993):

Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung.

Immun. Infekt. 21, 26-35

Rijpens, N., L. Herman, F. Vereecken, G. Jannes, J. De Smedt, L. De Zutter, (1999):

Rapid detection of stressed Salmonella spp. In dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR.

Int. J. Food. Microbiol. 46, 37- 40

Roesler U., A. v. Altrock, P. Heller, S. Bremerich, T. Arnold, J. Lehmann, K.-H. Waldmann, U. Truyen, A. Hensel (2005):

Effects of Flourequinolone of Salmonella Typhimurium DT104 in an Integrated Pig Breeding Herd.

J. Vet. Med. 52, 69-74

Roesler, U., P. Heller, A. v. Altrock, T. Arnold, J. Lehmann, K. H. Waldmann, U. Truyen, A. Hensel (2004):

Reduction of Salmonella by vaccination of sows using Herd-specific inactivated vaccines but not by antibiotic treatment.

Proc.: 18th Congress International Pig Veterinary Society, Hamburg, 666

Rolle, M., A. Mayer (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten.

7. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 462-478

Roth J., G. E. P. de Souza (2001):

Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation.

Braz. J. Biol. Res. 34, 301-314

Rummel C., S. W. Barth, T. Voss, S. Korte, R. Gerstberger, T. Hübschle, J. Roth, (2005):

Localized vs. systemic inflammation in guinea pigs: a role for prostaglandins at distinct points of the fever induction pathways?

Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289, 340-347

Scholz, H. C., T. Arnold, H. Marg, U. Rösler, A. Hensel (2001):

Improvement of an *invA*-based PCR for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in organs of pigs.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 401-403

Schwaning, M. (2002):

Die Zulassung von Impfstoffen. Regelungen und Prozesse auf europäischer Ebene. Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz, 45, 338-343

Schwartz, K. J. (1999):

Salmonellosis.

In: Straw, P, W. Mengeling, S. D`Allaire, D. Taylor (Hrsg):

Diseases of Swine, 8th Edition, Iowa State University Press, 535-551

Selbitz , H.-J., H.-J. Sinell, A. Sziegoleit (1995):

Das Salmonellen-Problem

Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 18-51

Selbitz, H.- J. (2001):

Grundsätzliche Sicherheitsanforderungen beim Einsatz von Lebendimpfstoffen bei Lebensmittelliefernden Tieren.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 428-432

Selbitz, H.-J., T. Lindner, S. Springer (2003):

Immunprophylaxe von Salmonella-Infektionen beim Schwein.
Prakt. Tierarzt 84, 124-130

Sibley, J., B. Yue, F. Huang, J. Harding, J. Kingdon, M. Chirino-Trejo, G. D. Appleyard (2003):

Comparison of bacterial enrichment-broth culture, enzyme linked immunosorbent assay, and broth culture-polymerase chain reaction techniques for identifying asymptomatic infections with *Salmonella* in swine.
Can. J. Vet. Res. 63, 219-224.

Skerje, E., O. Olsvik (1991):

Immunomagnetic separation of Salmonella from foods.
Int. J. Food Microbiol. 14, 11-18

Smith, R. L., M. T. Kaczmarec, L.M. Kucharski, M.E. Maguire (1998):

Magnesium transport in *Salmonella Typhimurium*: regulation of *mgtA* and *mgtCB* during invasion of epithelial and macrophage cells.
Microbiol. 144, 1835-1843

Songer, J. G., F. A. Uzal (2005):

Clostridial enteric infections in pigs.
J. Vet. Diagn. Invest. 17, 528-536

Sörensen, L. L., L. Alban, B. Nielsen, J. Dahl (2003):

The correlation between Salmonella serology and isolation of Salmonella in Danish pigs at slaughter.
Vet. Microbiol. 101, 131-141

Springer, S., J. Lehmann, T. Lindner, J. Thielebein, G. Alber, H.-J. Selbitz (2000):

Ein neuer *Salmonella-Enteritidis*-Lebendimpfstoff für Hühner – experimenteller Nachweis der Sicherheit und Wirksamkeit.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113, 246-252

Springer, S., T. Lindner, G. Steinbach, H.-J. Selbitz (2001):

Investigation of a genetically-stabile live *Salmonella Typhimurium* vaccine for use in swine.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 114, 342-345

Steinbach, G., M. Hartung (1999):

Versuch einer Schätzung des Anteils menschlicher Salmonelleninfektionen, die auf vom Schwein stammende Lebensmittel zurückzuführen sind.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 296-300

Steinbach, G., U. Kröll (1999):

Salmonellainfektionen in Schweinebeständen – Zu ihrer Epidemiologie und Bedeutung für Erkrankungen des Menschen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 106, 269-308

Steinbach, G., C. Staak, P. Bahn (2000):

Überlegungen zur Standardisierung des ELISA zur Bestimmung der Salmonellaantikörper in Seren und Fleischsäften des Schweins.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113, 331-334

Steinbach, G., U. Methner, S. Springer, T. Lindner, H.-J. Selbitz (2003):

The humeral immune response of swine after experimental infection with *Salmonella Typhimurium*.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 124-129

Steinbach, G., U. Kröll, H. Meyer, U. Methner (2003):

Die Brauchbarkeit serologischer Untersuchungen bei der Analyse des Salmonellengeschehens in Schweinebeständen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 281-287

Stone, G. G., R. D. Oberst, M. P. Hays, S. McVey, M. M. Chengappa (1994):

Detection of Salmonella Serovars from Clinical Samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR Procedure.
J. Clin. Microbiol. 32, 1742-1749

Takeuchi, A. (1967):

Electron microscop studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella Typhimurium*.
Am. J. Pathol. 50, 1009-136

Taylor, D. J. (1999):

Clostridial Infektions
In: Straw, B. E., S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor (Hrsg.)
Diseases of Swine, 8th Edition, Iowa State University Press, 395-412

Tizard, I. R. (2004):

Acquired Immunity to Bacteria and Related Organisms
Veterinary Immunology. An Introduction, 7th Edition, Saunders, 272-280

Tsolis, R. M., L. G. Adams, T. A. Ficht, A. J. Baumler (1999):

Contribution of *Salmonella Typhimurium* virulence factors to diarrhoeal disease in calves.
Infect. Immun. 67, 4879-4885

Turk, J. R., W. H. Fales, C. Maddox, M. Miller, L. Pace, J. Fischer, J. Kreeger, G. Johnson, S. Turnquist, J. A. Ramos (1992):

Pneumonia associated with *Salmonella Choleraesuis* infection in swine: 99 cases (1987-1990).
J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 1615-1616

Tzipori, S., D. Chandler, M. Smith, T. Makin, C. Halpin (1982):

Experimental colibacillosis in gnotobiotic piglets exposed to 3 enterotoxigenic serotypes.
Aust. Vet. J. 59, 93-95

Uchiya, K. I., T. Nikai, (2004):

Salmonella enterica serovar *Typhimurium* Infection Induces Cyclooxygenase 2 Expression in Macrophages: Involvement of Salmonella Pathogenicity Island 2.
Infect. Immun. 72, 6860-6869

Uchiya, K. I., M. A. Barbieri, K. Funato, A. H. Shah, P. D. Stahl, E. A. Groisman (1999):

A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking.
EMBO J. 18, 3924-3933

Valdivia, R. H., S. Falkow (1997):

Probing bacterial gene expression within host cells.
Trends Microbiol. 5, 360-363

Vasquez-Torres, A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, F. C. Fang (200):

Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase.
Science 2875458, 1655-1658

Viera-Pinto M., P. Temudo, C. Martins (2005):

Occurrence of Salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption.
J. Vet. Med. 52, 476-481

Waldmann, K. H., M. Wendt (2004):

Lehrbuch der Schweinekrankheiten.
4. Auflage, Berlin, Parey Verlag

Wick, M. J. (2003):

The role of dendritic cells in the immune response to Salmonella.
Immunol. Lett. 85, 99-102.

Wilcock, B. P. (1978):

Experimental Klebsiella and Salmonella Infection in Neonatal Swine.
Can. J. Comp. Med. 43, 200-206

Wong, K. K., M. McCelland, L. C. Stillwell, E. C. Sisk, S. J. Thurston, J. D. Saffer (1998):

Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2.
Infect. Immun. 66, 3365-3371

Wong, L. F. , J. Dahl, P.J. van der Wolf, A. Wingstrand, L. Leontides, A. von Altrock, (2003):

Recovery of *Salmonella enterica* from seropositive finishing pig herds.
Vet. Microbiol. 97, 201-214

Wong, L. F., J. Dahl, A. Wingstrand, P. J. van der Wolf, A. v. Altrock, B. M. Thorberg (2004):

A European longitudinal study in *Salmonella* seronegative and seropositive-classified finishing pig herds.

Epidemiol. Infect. 132, 903-914

Wood, R. L., A. Pospischil, R. Rose (1989):

Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine.

Am. J. Vet. Res. 50, 1015-1021

Wood, M. W., M. A. Jones, P. R. Watson, S. Hedges, T. S. Wallis, E. E. Galyov (1998):

Identifikation of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity.

Mol. Microbiol. 29, 883-891

Wu, L., S. Morahan, J. A. Hendrzak, T. K. Eisenstein (1994):

Herpes simplex virus type 1 replication and JL-1 β gene expression in mouse peritoneal macrophages activated in vivo by an attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine or *Corynebacterium parvum*.

Microbiol. Pathogenesis 16, 387-399

Zeng, H., A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz, A. S. Neish (2003):

Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*.

J. Immunol. 171, 3668-3674

Zhang S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsolis, L. G. Adams, A. J. Bäumler (2003):

Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea.

Infect. Immun. 71, 1-12

Zhou, D., J. Galan (2001):

Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins.

Microbes Infect. 3, 1293-1298

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich nicht nur wie sonst üblich bei Herrn Prof. Heinritzi für die freundliche Überlassung des interessanten Themas bedanken, sondern vor allem für sein Verständnis und vorbehaltlose Unterstützung im vergangenen Jahr.

An gleicher Stelle sei auch Herrn Prof. Selbitz gedankt für seine Geduld, Konstruktivität und freundliche Beratung.

Herrn Dr. S. Hörmannsdorfer und seinem Team im LGL in Oberschleißheim möchte ich für die gute Einarbeitung und die Bereitstellung meines Laborplatzes, sowie für die Unterstützung bei den labordiagnostischen Untersuchungen danken.

Herrn Prof. Erhard und seinen Mitarbeitern im Oberwiesenfeld danke ich für die Bereitstellung der Stallgebäude und das eine oder andere freie Wochenende.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Schweine der Tierärztlichen Fakultät der LMU München für die tatkräftige Hilfe bei manchmal unangenehmer Arbeit.

Herrn Prof. Küchenhoff sei für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten gedankt. Vielen Dank Andrea!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir erst das Studium ermöglicht haben und Nicola für ihre endlose Geduld bei einseitigen Fachgesprächen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Matthias Eddicks
Geburtsdatum: 19. 02. 1977
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984 – 1987 Elisabeth Grundschule Osnabrück
1987 – 1989 Orientierungsstufe Schulzentrum Osnabrück-Eversburg
1989 – 1996 Ratsgymnasium zu Osnabrück
21. Mai 1996 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife am Ratsgymnasium zu Osnabrück

Studium:

1998 – 2004 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
18.02.2004 3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Beruf:

04/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München
12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München
10/2005 Assistenzarzt in der Tierärztlichen Praxis Dr. Hagn, Peffenhausen