

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation



# Immunbiologie der Salmonellen- Infektion beim Huhn

**Rautenschlein, S.**


Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

6. Dresdner-Kolloquium

## Übersicht



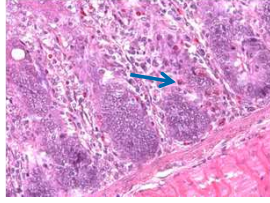
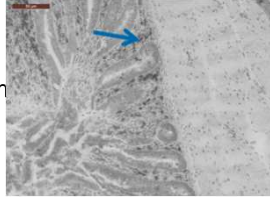
- Allgemeine Einleitung zur Darmimmunität
- Eigenschaften von Salmonellen
- *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Enteritidis und Typhimurium
- Pullorumkrankheit und Hühnertyphus
- Zusammenfassung



## Infektionen an der Oberfläche Darmepithel

---


1. Kommensale oder Pathogen?
  1. Pattern Recognition Rezeptoren (TLR, NOD-like Rezeptoren u.a.)
    1. Immunzellen
    2. Epitheliale Zellen
    3. Stroma Zellen
2. Rekrutierung von Heterophilen (frühe Phase)
  1. Abtöten von Pathogenen
  2. Rekrutierung anderer Immunzellen
3. Einbindung von NK-Zellen, Makrophagen, TCR $\gamma$  T-Zellen
4. TCR  $\alpha\beta$ -Zellen, B-Zellen (spätere Phase)
  1. Lamina Propria, IEC
  2. Kontrolle der Infektion

**Immunantwort  $\neq$  Effektivität und Kontrolle der Infektion!**

---

08.06.2016
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation
3



## Entwicklung des darmassoziierten Immunsystems

---

Jung  $\neq$  Alt!

- Schwache Immunantwort von Jungtieren
  - Beispiel: Empfänglichkeit von Küken < 3 LT für systemische SE und ST-Infektion mit hoher Mortalität
- Schnelle Entwicklung bis um die 4.-6. LW beim Huhn
- Clearance von S. abhängig vom Alter
- Antikörperentwicklung und T-Zellimmunität
  - Schwach bei Jungtieren
  - Unzureichende Protektion
  - Genetischer Einfluss bis ca. 6 LW
- Boosterantwort
  - Homing von Immunzellen aus der Milz
  - Schnellere Clearance from Darm

Beal et al. (2004) Vet. immunol. Immunopathology

---

08.06.2016
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation
4



## Salmonellen bei Geflügel

- ca. 2.500 antigenetische Varianten innerhalb des Genus *Salmonella* (Serovare) –
  - Spezies: *Salmonella enterica*
- 3 Kategorien:
  - ➔ 1. beweglich: nicht-wirtsspezifisch
    - Paratyphus - **selten akut, systemisch** – Jungtiere
    - *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*
  - ➔ 2. Nicht beweglich: wirtsspezifisch (aviäre Spezies)
    - *S. Pullorum* (Pullorum Krankheit) - **akut, systemisch** - Jungtiere
    - *S. Gallinarum* (Fowl Typhoid) - **akut- chron. septik.** – ältere Tiere
  - ➔ 3. beweglich: nicht-wirtsspezifisch
    - *S. enterica arizonae* - **akut, septikämisch** – junge Puten

08.06.2016

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

5

## Beispiele für das Immunsystem wichtige Eigenschaften/Virulenzfaktoren von Salmonellen



- Adhärenzfaktoren
  - Flagellen:
    - + SE, ST – Erkennung durch TLRs (5)
    - - SG, SP – fehlende TLR-Erkennung
  - Fimbrien
- Pathogenitätsinsel 1 und 2 Typ III Sekretionssystem (SG, SP)
  - Inhibition der antimikrobiellen Aktivität
  - Verhinderung der Fusion von Lysosomen mit phagozytischen Vakuolen
  - Modulation der MHC und Zytokin-Expression
- Endotoxine (LPS, TLR49)
  - Resistenz gegen Verdauung in Phagozyten
  - Fieber
- Enterotoxine
  - Sekretorische Antwort (invasive SE, ST)
- Zytotoxine:
  - Zerstörung der Darmepithelzellen (Proteinbiosynthese)
- Plasmide
  - Virulenzfaktoren
  - Resistenzgene

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Zoonose-relevante Salmonellen



*Salmonella* Enteritidis und *S. Typhimurium*

### Pathogenese

- Infektion des Magen-Darmtraktes (Zäkum/Ileum)
- Persistenz (Monate)
- Systemisch Infektion transient (Milz/Leber)
- Kaum klinische Erkrankung (Ausnahme: Eintagsküken)
- Vertikale Übertragung
  - Überleben systemisch
  - Immunsuppression durch Beginn der Legetätigkeit

Rychlik et al., (2014) Veterinary Research, DOI: 10.1186/s13567-014-0119-2

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Interaktion mit dem Immunsystem: SE und ST




- Induktion einer lokalen Entzündung
  - CXC-Zytokine-Expression hochreguliert (10 h pi, exp.)
  - Heterophile/Makrophagen-Infiltration
    - Restriktion der Organinvasion
- Systemische Phase
  - Proinflammatorische Zytokine
  - Transiente Hepatosplenomegalie
- Clearance: Th<sub>1</sub>-vermittelt
  - Hohe IFN-γ Expression (14-28 dpi)
  - Antikörpertiter (Bedeutung? – Protektion)
    - Schnelle, hohe Antikörpertiter (1 W pi)
    - Über 6 Monate detekierbar (hohe Level)

Neish (2007) American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology,  
DOI: 10.1152/ajpgi.00274.2006

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation


## S. Gallinarum – S. Pullorum



- Genome etwas kleiner als von SE/ST (event. Adaptationsprozess?)
- Salmonella pathogenicity Islands (SPI)
- 13 Fimbriengensets
- Flagella negativ!
  - ➔ Keine Expression von CXC Chemokinen/Pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ /IL-6) – SG
  - ➔ Runterregulation von CXCLi1 und CXCLi2
- Metabolische Besonderheiten
  - ➔ Genauer Beitrag zur Virulenz unbekannt

08.06.2016
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation
9

## Pathogenese wirtsadaptierte Salmonellen



- Infektion
  - Kropf
  - Magen
  - Darm
    - Blinddarm
    - Zäkaltonsillen
      - SP und SG schlechte Kolonisation
  - Aufnahme durch Dendritische Zellen/Makrophagen
    - **Überleben in Makrophagen durch SPI-2 Typ III Sekretionssystem**
      - Effektormoleküle: Interferenz mit intrazell. Trafficking (keine Fusion zw. Phagosomen und Lysosomen)
  - Über Lymphsystem zu Milz und Leber (?)

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Fowl Typhoid und Pullorum Krankheit



*Salmonella* Gallinarum und Pullorum

Pathogenese

- Phase 1: Infektion über den Magen-Darm-Trakt
- Phase 2: Etablierung einer **systemischen Infektion**
  - Infektion von Makrophagen und DC
  - Translokation in die Milz und Leber (Replikation)
- Phase 3: Unkontrollierte S.-Replikation und Tod oder Clearance
  - SP: persistente Infektion von Milzmakrophagen

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Wirtsfaktoren: SG und SP



Resistenz vs. Empfänglichkeit

Braune Linien > Weiße Linien für SP

- Interaktion mit **Makrophagen und Heterophilen**
  - Progression vs immunologische Clearance
  - **Resistente Tiere:**
    - Makrophagen – Respiratorischer Burst, Zytokin-Induktion – Abtöten der S.
    - Induktion einer protektiven Th1- und Antikörper-Antwort
  - **Empfängliche Tiere**
    - Trägerstatus
      - » Infektion des Reproduktionstraktes (CD4+ T-Zellen ↓)
      - » Equilibrium zwischen adaptiver Immunantwort und Modulation der Wirtsantwort
      - » Immunsuppression mit Beginn der Legetätigkeit

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Versagen der Immunantwort



- Versagen der angeborenen Immunantwort
  - Replikation in Milz und Leber
    - Hepatosplenomegalie (Läsionen)
    - Anämie (SG)
    - Septikämie
    - Magendarmtrakt Wiederbesiedlung (Blutungen, massive Entzündungserscheinungen, Ulzera)
  - Tod (6-10 dpi)
  - Bei Persistenz (SP)
    - Weitgehend Clearance
    - Überleben von kleinen Mengen an S. in intrazellulären Nischen.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Carrier-Status: S. Pullorum



- Persistenz in Makrophagen (Leber, Milz)
  - IL-10 ↓
  - MHC ↓
- Trotz zellvermittelter und humoraler Immunantwort
  - 12 Wochen pi – 10-100 CFU of S.
  - Legebeginn: Systemische Infektion – Reproduktionstrakt (nicht in Hähnen!)
  - Über 50 Wochen pi (Infektion um 7. Lebenstag)

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## SP vs SE



Infektion 1. Lebenswoche

→ 14 dpi:

- SP: Persistenz in Makrophagen in Milz
  - IL-18, IFN- $\gamma$  = Kontrolle
  - IL-4  $\uparrow$  - Th-2
  - Antikörpertiter  $\uparrow\uparrow$
  - Gleichgewicht zwischen Immunantworten
- SE: Clearance bis 28 dpi
  - IFN- $\gamma$   $\uparrow$
  - Antikörpertiter  $\uparrow$

Chappell et al. 2009

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Verlauf der Infektion: Salmonellen



➤ Abhängig

- Serovar
- Genotyp des Wirts

Resistent vs. Empfänglich

- Multifaktoriell
- Nramp1, TLR, SAL1 Locus
- Resistent:
  - Oxidatives Killing  $\uparrow$
  - Schnellere Zytokin- und Chemokin-Expression
    - IL-18 (Th-1 assoziiertes Zytokin)  $\uparrow$
- ➡ Schnellere Aktivierung des angeborenen Immunsystems
- ➡ Bessere Aktivierung der adaptiven Immunantwort

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation



## Zusammenfassung



- Die Wirtsantwort ist komplex
  - Wirt + Pathogen + Umwelt
  - Zusammenspiel von tausenden von Molekülen
- SP/SG ≠ SE/ST
  - SP/SG: *SAL1* locus, MHC, *Nramp1*, TLR4
  - SE/ST: iNOS, IL-2, *Nramp1*, TGF-β2 u.a.
- Systemische Salmonellose
  - Evasion der innate Immunantwort
  - Subversion von Makrophagenfunktionen
  - Modulation der adaptiven Immunantwort

- Genotyp
- Alter
- Mikrobiota
- Präimmunität

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation

## Interaktionen zwischen Salmonellen und dem Hühner-Immunsystem



**Infektion: fäkal-oral**

- Anheftung und Invasion Darmepithel
- Aktivierung der angeborenen Immunität (TLR4,5 und 21)
- Pro-inflammatorische CXC Chemokine und Heterophilen-Infiltration
- Schädigung der Darmschleimhaut und Aktivierung einer Immunantwort
- Wirtsspezifische S: kaum oder keine Aktivierung der angeborenen Immunität

**Systemische Antwort**

- Translokation Milz, Leber
- Etablierung einer intrazellulären Infektion in Makrophagen
  - Antimikrobielle Reaktionen (*SAL1* Resistenzen)
- Induktion der zellvermittelten Antwort (IFNγ – γδ T-Zellen)
- Immunmodulation und Hochregulation der Th2-Immunantwort (SP, SG)
- Entwicklung einer IgM und IgY Antikörperantwort

**Darm-Antwort**

- Inflammatorische Antwort (Tregs)
- Rolle der TH17? (Erhalt der Darmintegrität)
- Muzine und Gallinazine limitieren Infektion
- Sekretorisches IgA
- S. Persistenz im hinteren Darm (Zäkum)

**Tod**

- Unkontrollierte Replikation in Makrophagen von empfänglichen Tieren (Bakteriämie)

**Clearance**

- Systemische Clearance (2-4 W pi), zellvermittelt und Antikörper
- Darm-Clearance (3-12 W pi) TH1, vermittelt

**Persistenz**

- Intrazelluläre Persistenz bei wirtadaptierten Serovaren in Makrophagen
- Rekrudescenz nach Immunsuppression in Legehennen durch CD4+ T Zellabfall bei Geschlechtsreife

Initiale Infektion

Etablierung der Infektion

Ausgang der Infektion

Wigly, (2014) Front. Immunol.



## Zusammenfassung

- Salmonellen-Infektionen
  - ein gutes Modell für die Forschung
  - Immunologie in der Reproduktion
  - Verständnis des aviären angeborenen Immunsystems
  - Zukunft: Verständnis der immunmetabolischen Veränderungen in der frühen und späten Infektion (Kogut et al., 2016, Poult. Sci.)

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation



## Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation