

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Erregercharakterisierung *E. coli***

#### 2.1.1. Allgemeine Eigenschaften

*E. coli* ist ein gram-negatives, nicht Sporenbildendes, nicht Säurefestes Stäbchenbakterium. Es gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und ist zwischen 2,0 und 6,0 µm lang und 1,1 bis 1,5 µm breit. Die überwiegende Zahl der Stämme ist durch ihre peritriche Begeißelung beweglich. Biochemisch ist der laktosepositive Keim gut von den anderen Enterobakterien abzugrenzen, ein Teil der Stämme bildet Hämolyse.

Für die Charakterisierung der *E. coli*-Isolate wurde zunächst die Serotypisierung entwickelt. Während anfängliche Studien im Hinblick auf aviäre pathogene *E. coli* (APEC) die Schlussfolgerung zuließen, dass bestimmte Serogruppen (O1, O2 und O78) am häufigsten im Zusammenhang mit der Kolibakteriose des Geflügels auftreten, konnten bei einer Vielzahl von Untersuchungen mehr als die Hälfte der isolierten *E. coli*-Stämme keiner dieser klassischen Gruppen zugeordnet werden oder war nicht typisierbar.

Die Serotypisierung ist nach wie vor ein häufig angewandtes diagnostisches Werkzeug. Allerdings lässt die Bestimmung der Serogruppe nicht gleichzeitig auf die Virulenz des *E. coli*- Stammes schließen, so daß sich aviäre pathogene *E. coli*-Isolate erst nach der genotypischen Untersuchung als solche identifizieren lassen (JANSSEN et al., 2001; JANSSEN, 2002; DELICATO et al., 2003; EWERS et al., 2004).

### **2.2. Epidemiologie**

*E. coli* ist Bestandteil der normalen Darmflora von Mensch und Tier. Als solche sind diese Bakterien in der belebten und unbelebten Umwelt weit verbreitet (GROSS, 1994). Beim Geflügel ist *E. coli* meist in einer Keimzahl von  $10^6$  Koloniebildenden-Einheiten (KbE) pro Gramm Kot zu finden (BARNES und GROSS, 1997; DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999).

Die Übertragung von *E. coli* erfolgt beim Geflügel überwiegend horizontal über erregerhaltigen Staub, Kot oder Wasser. Die vertikale Infektion mit dem Erreger wird im Zusammenhang mit der aus einer *E. coli*-Infektion resultierenden Salpingitis beschrieben in deren Folge eine Übertragung des Keimes auf das Ei möglich ist. Gleichzeitig kann dies auch durch die mit Kot verunreinigte Eischale geschehen (HOOP, 2002).

*E. coli* ist ebenfalls im oberen Respirationstrakt des Geflügels zu finden und kann außerdem, in Abhängigkeit des Grades der Kontamination der Umwelt, aus Federn und von der Haut isoliert werden (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). Die mit dem Kot ausgeschiedenen Keime gelangen in den Staub, in dem sie umso länger persistieren, je trockener dieser ist (DORN, 1971). Damit erlangen sie auch für die Verminderung der Abwehrmechanismen der Schleimhäute im Respirationstrakt Bedeutung.

Andere Wegbereiter einer *E. coli*-Infektion sind negative Umweltfaktoren, wie hohe Ammoniakbelastungen und schlechtes Haltnungsmanagement sowie sozialer Stress (PHILIPP und VOSS, 2001; HOOP, 2002). Immunsuppression oder primär stattgefundene respiratorische virale bzw. bakterielle Infektionen begünstigen ebenfalls die Ausbildung schwerer Krankheitsbilder (VANDEMAELE et al., 2002).

### 2.2.1. Virulenzfaktoren

Der überwiegende Teil der aviären *Escherichia coli* sind als normale Bewohner der Mikroflora des Intestinaltraktes des Geflügels anzusehen und apathogen. Einige Stämme sind jedoch befähigt, Erkrankungen aus dem Symptomkomplex der Kolibakteriose hervorzurufen. Von Bedeutung sind dabei spezifische Virulenzfaktoren (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999).

Studien zur Beteiligung dieser Faktoren an der Virulenz der APEC werden bereits seit mehreren Jahren durchgeführt. Unzureichend ist bisher jedoch geklärt, inwiefern die Virulenzfaktoren an der Pathogenese beteiligt sind und welche Funktionsmechanismen dabei von Bedeutung sind (DIAS DASIVEIRA et al., 2002; EWERS et al., 2003; EWERS et al., 2004).

Ihre Beteiligung an verschiedenen Pathomechanismen der Bakterien gilt jedoch als gesichert. Dazu gehören die Anheftung der Bakterien an das Epithel des Respirationstraktes, ihre Ausbreitung und Vermehrung, die Entwicklung von Resistenzen gegen wirtsspezifische Abwehrmechanismen, genauso wie die Manifestation in verschiedenen Organen und Ausbildung zytopathischer Effekte (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999; EWERS et al., 2003).

## Adhäsine

### Fimbriale Adhäsine

Fimbrien sind faserartige Strukturen auf der Oberfläche von Bakterien. Sie setzen sich aus Proteinen unterschiedlicher Größe zusammen. Pathogenen Bakterien ermöglichen sie die Anheftung an die Wirtszellen, so dass eine Besiedlung erfolgen kann (JANSSEN, 2002; EWERS et al., 2003). Man unterscheidet 4 Gruppen von Fimbrien (F1-Fimbrien (Typ1), P-Fimbrien, Curli und F17-Fimbrien), denen bzgl. der Anheftung an den Respirationstrakt eine Bedeutung im Krankheitsgeschehen der Kolibakteriose zugeschrieben wird.

#### *F1-Fimbrien (Typ 1)*

Diese stäbchenförmigen Strukturen werden von vielen Enterobakterien exprimiert. F1-Fimbrien werden anderthalb bis zweimal häufiger in pathogenen, als in nicht-pathogenen Stämmen gefunden (DOZOIS et al., 1992; WOOLLY et al., 1992; MC PEAKE et al., 2005). Ihr Funktionsmechanismus im Hinblick auf die Kolibakteriose beruht auf der Vermittlung einer Mannose-spezifischen Adhärenz an die Epithelzellen des Respirationstraktes (DOZOIS et al., 1995; VIDOTTO et al., 1997). Beim Geflügel werden F1-Fimbrien vorzugsweise in der Trachea sowie in geringen Mengen in der Lunge und den Luftsäcken exprimiert. In keinem Fall konnten F1-Fimbrien jedoch im Blut oder anderen Organen nachgewiesen werden (DOZOIS et al., 1994; POURBAKHSI et al., 1997a).

F1-Fimbrien sind heterogene Proteine, die mehrere Untereinheiten besitzen. Die größte Untereinheit bildet das FimA-Protein (major subunit). Zusätzlich existieren kleinere Proteine, die auch als Nebenproteine angesprochen werden (u.a. FimF-, FimG-, FimC- und FimH-Protein). Die Codierung dieser Proteine erfolgt über das chromosomal lokalisierte *fim (pil)*-Gen-Cluster, das insgesamt neun Gene umfasst, wie beispielsweise die Regulator-Gene *fimB* und *fimE*, die Struktur-Gene *fimC* und *fimD* sowie das *fimH*. Als Produkt des letztgenannten *fimH* wird dem FimH-Protein eine maßgebliche Rolle im Hinblick auf die adhäsiven Eigenschaften der F1-Fimbrien zugesprochen (VIDOTTO et al., 1997). Allerdings belegen andere Studien, dass eine Besiedlung der Trachea von Hühnern durch aviäre pathogene *E. coli* in Abwesenheit des FimH-Proteins sogar wahrscheinlicher ist (ARNE et al., 2000). Diese widersprüchlichen Daten bedürfen der Klärung, wobei sich insbesondere die Frage stellt, inwieweit stammesspezifische Virulenzunterschiede eine Rolle spielen (EWERS et al., 2003). Möglicherweise besitzen die F1-Fimbrien zusätzliche Relevanz im Hinblick auf die Immunabwehr des Wirtsorganismus (MELLATA et al., 2003a). Hinweise dazu könnten Untersuchungen zur Bedeutung der F1-Fimbrien beim Schutz der Bakterien

vor Phagozytose und der Ausbildung von Serumresistenzen gegenüber bakteriziden Effekten geben (DOZOIS et al., 1992, WOOLLY et al., 1992).

Unter Umständen spielen beide Faktoren für die Ausbildung oder Nichtausbildung von F1-Fimbrien in Adhärenz zu bestimmten Organen, sowie dem Schutz vor Phagozytose im Hinblick auf die Pathogenität der APEC-Isolate, eine Rolle. POURBAKHSH et al. (1997b) zeigten in ihren Untersuchungen, dass F1-Fimbrien einerseits insbesondere von Bakterien exprimiert werden, die die Trachea und Lunge besiedeln andererseits hochvirulente aviäre pathogene *E. coli* nur eine Resistenz gegen bakterizide Effekte aviärer Makrophagen aufweisen, wenn sie keine F1-Fimbrien besitzen. MELLATA et al. (2003a, 2003b) erklären diesen Diskrepanz damit, dass F1-Fimbrien die Aufnahme der aviären pathogenen *E. coli* in die Makrophagen und heterophilen Granulozyten begünstigen, die Lyse in Phagozytomen jedoch erschweren.

Die exakte Funktion der F1-Fimbrien während der Infektion ist jedoch bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen und für ihre Bedeutung in der Pathogenese der Kolibakteriose besteht noch Klärungsbedarf (JANSSEN, 2002; EWERS et al., 2003).

#### *F-17 Fimbrien*

Zur Familie der F17-Fimbrien zählen die Subtypen F17a-, F17b-, F17c-, und F17d. F17-Fimbrien sind eng mit bovinen und ovinen pathogenen *E. coli* assoziiert, die bei Durchfallgeschehen und Septikämien isoliert werden. Von uropathogenen humanen *E. coli*-Stämmen werden G-Fimbrien produziert, die einen weiteren Subtypen der F17-Fimbrien darstellen (LE BOUGUENEC and BERTIN, 1999; EWERS et al., 2003)

Die Adhäsion der Subtypen der F17-Fimbrien wird durch die Bindung an *N*-Acetylglucosamine (Nag) vermittelt, wobei die entsprechenden Rezeptoren auf den Erythrozyten sowie den intestinalen Schleimhautzellen des Wirtsorganismus vorhanden sind (LINTERMANS et al., 1988).

Das *f17a*-Gen-Cluster setzt sich aus den Genen *f17a-A* (Struktur-Gen), *f17a-C* („Platzanweiser“-Gen für Äußere-Membran-Proteine), *f17a-D* (periplasmatisches Chaperon-Gen) und *f17a-G* (Adhäsion-Gen) zusammen (STORDEUR et al., 2002; EWERS, et al., 2003).

Im Ergebnis epidemiologischer Studien hinsichtlich der Prävalenz von F17-Fimbrien bei aviären pathogenen *E. coli*-Isolaten konnten STORDEUR et al. (2002) bei 4, 7% von 1601 untersuchten Stämmen, die fast ausschließlich aus den inneren Organen von Hühnern, Puten und Enten stammten, F17-Fimbrien isolieren.

Da die F17-Fimbrien bisher nicht als Virulenzfaktoren für aviäre pathogene *E.coli*-Isolate beschrieben sind, ist ihre Bedeutung im Pathomechanismus der Kolibakteriose bis dato noch ungeklärt (STORDEUR et al., 2002; EWERS et al., 2003).

### *P-Fimbrien*

P-Fimbrien sind heteropolymorphe, proteinartige, Mannose-resistente, hämagglutinierende Fasern. Sie kommen oft bei *E. coli*-Stämmen vor, die Infektionen des oberen Urogenitaltraktes verschiedener Tierarten und des Menschen hervorrufen. P-Fimbrien finden sich bei einer Vielzahl extraintestinalen, pathogener *E. coli*-Isolate.

Die Besiedlung des Wirtes und die daraus folgende entzündliche Reaktion des geschädigten Gewebes wird über die Gal(a 1-4)Gal-spezifische Bindung an Glycolipid-Isorezeptoren vermittelt, die sich auf den Epithelzellen des Zielgewebes befinden (JOHNSON et al., 2000).

P-Fimbrien werden durch das chromosomal lokalisierte und insgesamt 11 Gene umfassende (*papA-papK*) *pap*-GenCluster kodiert (HACKER, 1992).

Die Expression von P-Fimbrien erfolgt in weitaus geringerem Umfang als die der F1-Fimbrien (VAN DEN BOSCH et al., 1993). Auch die Bedeutung der P-Fimbrien in der Pathogenese der Kolibakteriose ist noch nicht ausreichend geklärt. In diversen Studien konnte ihre Fähigkeit zur Adhärenz an verschiedenen Organen, insbesondere an den Zellen von Lunge und Luftsäcken, nachgewiesen werden. Dies gilt jedoch nicht für das Gewebe von Trachea oder Pharynx (VAN DEN BOSCH et al., 1993; DOZOIS et al., 1994).

Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen lassen darauf schließen, dass sie im Rahmen der bakteriellen Persistenz und der Resistenz gegenüber der Phagozytose im späteren Infektionsverlauf eine wichtige Rolle spielen, jedoch für die primäre Besiedelung des oberen Respiratiostraktes mit aviären pathogenen *E. coli*-Stämmen irrelevant sind (POURBAKHSI et al., 1997a, b; MELLATA et al., 2003a, b).

### *Curli*

Als Curli bezeichnet man dünne, filamentöse Strukturen, die an der Oberfläche von *E. coli* und *Salmonella subsp.* zu finden sind. Sie binden an extrazelluläre Matrix und Serumproteine wie Laminin, Fibronectin, Plasminogen und Plasminogen aktivierende Proteine (JANSSEN, 2002). Auch die Bedeutung dieser Oberflächenstruktur in der Pathogenese der Kolibakteriose ist noch nicht hinlänglich geklärt (EWERS et al., 2003).

Es ist jedoch anzunehmen, dass die Curli-Fasern an der bakteriellen Adhärenz und Besiedlung des Zielgewebes zu Beginn der Infektion beteiligt sind. Durch ihre Fähigkeit zur

Bindung an Matrix- und Serumproteine sind sie auch in der Lage an die Proteinstrukturen des „major histocompatibility complex“ class I und II zu binden (OLSEN et al., 1998).

### Nicht-fimbriale Adhäsine

Pathogene *E. coli* produzieren zusätzlich adhäsive Strukturen, die nicht mit sichtbaren Fimbrien auf der bakteriellen Oberfläche im Zusammenhang stehen (MC PEAKE et al., 2005). Sie werden als „afimbriale“ Adhäsine (AFA) angesprochen und vornehmlich aus bovinen *E. coli*-Stämmen isoliert, die mit Durchfallgeschehen oder Septikämien in Verbindung gebracht werden. Gleichzeitig assoziiert man sie mit humanen extraintestinalen Infektionen (LE BOUGUENEC and BERTIN, 1999).

Die Kodierung der afimbrialen Adhäsine erfolgt über *afa*-Gen-Cluster, die sehr nah miteinander verwandt sind und von uropathogenen sowie von Durchfall und Septikämien auslösenden *E. coli*-Isolaten exprimiert werden (LE BOUGUENEC and BERTIN, 1999; EWERS et al., 2003).

Im Hinblick auf die tierpathogenen *E. coli* sind die *afa7*- bzw. *afa8*-Gen-Cluster von Bedeutung, wobei insbesondere *afa8* eine hohe Prävalenz in den *E. coli*-Stämmen zeigen, die aus erkrankten Tieren mit extra- bzw. intrainestinalen Infektionen isoliert werden. Das *afa8*- Gen-Cluster setzt sich aus den Genen *afaA* und *afaF* (Regulator-Gene für die Transkription), *afaB* (periplasmatisches Chaperon-Gen), *afaC*, („Platzanweiser“-Gen für Äußere-Membran-Proteine), *afaD* (Invasin-Gen) und dem *afaE* (Adhäsion-Gen) zusammen (STORDEUR et al. 2002; EWERS et al., 2003).

STORDEUR et al. (2002) konnten bei 4, 8 % von 1601 untersuchten extra- und intrainestinalen aviären *E. coli*-Stämmen, die ausschließlich von Hühnern, Puten und Enten stammten, das *afaE-8*-Gen isolieren.

Die afimbrialen Adhäsine wurden genauso wie die F17-Fimbrien noch nicht als Virulenzfaktoren von APEC-Isolaten eingestuft und über ihre Bedeutung in der Pathogenese der Kolibakteriose besteht noch Klärungsbedarf (STORDEUR et al. 2002; EWERS et al., 2003; MC PEAKE et al., 2005).

### Eisenaquirierung

Die geringe Konzentration an frei verfügbarem Eisen in den Körperflüssigkeiten der Tiere ( $10^{-9}$  mol/l), deckt bei weitem nicht den Bedarf ( $10^{-6}$  mol/l) für ein effektives Wachstum der Bakterien (CHIPPERFIELD und RATLEDGE, 2000). Infolgedessen haben pathogene Bakterien zwei prinzipielle Systeme entwickelt, mit deren Hilfe sie effektiv mit dem Wirtsorganismus um das lebensnotwendige Element Eisen konkurrieren können. Dabei

exprimieren sie einerseits Rezeptoren, mit denen die Eisenkomplexe wie Transferrin, Lactoferrin und Hämoglobin des Wirtes gebunden und als Eisenquelle genutzt werden (HANSON et al., 1992). Andererseits synthetisieren und sezernieren sie eisenbindende Proteine. Diese als Siderophoren angesprochenen Strukturen werden als Enterobactin (Catechol-Typ) und Aerobactin (Hydroxamat-Typ) gebildet. Sie sind in der Lage, Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirtsorganismus zu lösen und für den eigenen Bedarf zu nutzen (BAGG und NEILANDS, 1987; RATLEDGE und DOVER, 2000).

Aerobactin scheint im Hinblick auf die Pathogenese der Kolibakteriose eine entscheidende Position einzunehmen und wird über ein Operon codiert, auf dem 5 Gene lokalisiert sind. Für die Synthese von Aerobactin sind vier der fünf Gene (*iucA*, *iucB*, *iucC* und *iucD*) verantwortlich, wohingegen das *iutA*-Gen für das IutA-Protein codiert, einen Membranrezeptor, an den die entsprechenden Aerobactin-Eisen-Komplexe binden (JANSSEN, 2002; EWERS et al., 2003). Das Operon liegt auf einem ca. 80 kb großen Plasmid, dem Colicin-V-Plasmid (ColV-Plasmid), kann allerdings auch chromosomal lokalisiert sein (WATERS and CROSA 1991; EWERS et al., 2003; TIVENDALE et al., 2004). In zahlreichen Studien wurde die Existenz von Aerobactin-Genen im Zusammenhang mit aviären pathogenen *E. coli* geprüft. Übereinstimmend belegen diese eine signifikant höhere Nachweishäufigkeit der Gene bei *E. coli*-Isolaten von erkrankten Hühnern oder Puten, als bei gesunden Tieren (JANSSEN et al., 2001; GOPHNA et al., 2001; TIVENDALE et al., 2004). Möglicherweise spielt der Mechanismus des Aerobactin-Systems bei der Infektion mit *E. coli* eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Bakterienwachstum und deren Vermehrung (FINKELSTEIN et al., 1983; DHO und LAFONT, 1984; EWERS et al., 2004).

Grundsätzlich sind jedoch alle APEC-Stämme befähigt, unter eisenlimitierenden Bedingungen zu wachsen, obwohl nicht alle Aerobactin exprimieren. Allerdings wurde bei Untersuchungen von SCHUBERT et al. (1998, 1999) noch eine dritte Siderophore (Yersiniabactin) gefunden. Sie wird durch die „high pathogenic islands“ (HPI) kodiert. In diesem Zusammenhang konnten bei Untersuchungen an aviären pathogenen *E. coli* anhand der Gene *irp2* und *fyuA* die HPI bei nahezu allen Isolaten der O-Gruppen O78 und O2 entdeckt werden. Gleichzeitig enthielt der überwiegende Teil der untersuchten Isolate, unabhängig vom Serotyp, sowohl die HPI als auch das *iucD*-Gen. Es liegt also die Vermutung nahe, dass zwei voneinander unabhängige eisenacquirierende Systeme parallel in zahlreichen *E. coli*-Isolaten existieren (GOPHNA et al., 2001; JANSSEN et al., 2001; JANSSEN, 2002; EWERS et al., 2003).

## Hämolsine

Die Beteiligung dieser Virulenzfaktoren an der Pathogenese der *E. coli*-Infektion scheint nicht von Bedeutung, wie verschiedene in diesem Zusammenhang durchgeführte Untersuchungen von APEC-Isolaten belegen (REINGOLD et al., 1999; GOMIS et al., 2000; JANSSEN et al., 2001).

## Temperatur-sensitives-Hämagglutinin (Tsh)

Das Temperatur-sensitive-Hämagglutinin (Tsh) zählt zu den sog. Serin-Protease-Autotransportern. Diese Autotransporter-Proteine sind große, in funktionellen Domänen organisierte Polyproteine. Sie besitzen verschiedene virulenzassoziierte Funktionen und werden von gram-negativen Bakterien autark sezerniert (EWERS et al., 2003). Das Tsh-Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen: dem sekretorischen Anteil (Tsh<sub>s</sub>-Protein) und dem Tsh<sub>g</sub>-Protein, das auf der äußeren Membran gelegen ist (STATHOPOULOS et al., 1999; EWERS et al., 2003; KOSTAKIOTI and STATHOPOULOS 2004). Gewöhnlich ist das *tsh*-Gen auf einem großen Plasmid lokalisiert, häufig auf dem ColV-Plasmid (DOZOIS et al., 2000; JOHNSON et al., 2006).

Im Zusammenhang mit APEC wurde das Tsh erstmalig bei Isolaten der O-Gruppe O78 entdeckt. Im Unterschied zu anderen Hämagglutininen, die *E. coli*-Stämme überwiegend bei 37 °C ausbilden, werden Temperatur-sensitive-Hämagglutinine vornehmlich bei niedrigeren Temperaturen exprimiert. Dabei liegt ihre größte Aktivität im Bereich von 26 °C, welche das Tsh mit Erhöhung der Temperatur jedoch zunehmend verliert, bis sie bei 42 °C nicht mehr vorhanden ist (PROVENCE und CURTISS, 1994).

Die exakte Bedeutung der Temperatur-sensitiven-Hämagglutinine im Pathomechanismus der Kolibakteriose ist bisher nur unzureichend geklärt. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass bis zu 85 % der Tsh-positiven APEC-Isolate hochvirulent sind (MAURER et al., 1998; DOZOIS et al., 2000; JANSSEN et al., 2002; EWERS et al., 2005)

ZHAO et al. (2005) konnten über einen Zeitraum von fünf Jahren in mehr als 80 % der untersuchten aviären *E. coli*-Isolate das virulenzassoziierte *tsh*-Gen aus an Kolibakteriose verendeten Tieren nachweisen. Auf ähnliche Ergebnisse verweisen VANDEKERCHOVE et al. (2005) bei Untersuchungen an Legehennen. Allerdings wiesen MC PEAKE et al. (2005) das *tsh*-Gen gleichermaßen aus an Kolibakteriose erkrankten Tieren und aus Kotproben von gesundem Geflügel nach. TIVENDALE et al. (2004) konnten im Ergebnis ihrer Untersuchungen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *tsh* und der Virulenz aviärer pathogener *E. coli* feststellen.



## Anti-Wirtsabwehrsysteme

Unter diesem Begriff werden Systeme der APEC zusammengefasst, die Proteine besitzen, welche ihnen die Fähigkeit verleihen, sich bestimmten Abwehrmechanismen des Zielorganismus zu entziehen. Dazu gehören das äußere Membranprotein (OMP), Increased serum survival Proteine (Iss), Lipopolysaccharide (LPS), Kapseln sowie die Colicin V-Produktion (WOOLEY et al., 1993; GROSS, 1994; NGELEKA et al., 1996; JANSSEN, 2002).

### *Äußere Membranproteine (OMP)*

Die äußere Membran ist Bestandteil der gram-negativen Bakterien. Sie besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die sich aus Lipiden, Lipoproteinen und Lipopolysacchariden zusammensetzt (SELBITZ, 2002). In der äußeren Membran sind sowohl integral als auch peripher Proteine eingelagert, deren Zusammensetzung sehr spezifisch ist (EWERS et al., 2003). Zu ihnen zählt man die sog. „kleinen Proteine“, die sehr spezielle Funktionen wie beispielsweise die Nahrungsaufnahme übernehmen oder als Rezeptorproteine fungieren. Sie liegen nur unter definierten Wachstumsbedingungen oder in wenigen Kopien vor. Vorherrschend sind allerdings die „großen Proteine“. Zu ihnen zählen u.a. Murein-Lipoproteine, OmpA-Proteine genauso wie zahlreiche Enzyme.

Im Hinblick auf den Abwehrmechanismus der Bakterien sind zwei Proteine von besonderer Bedeutung, das Outer Membran Protein (OMP) sowie das Lipoprotein-TraT, welches die Serum-Resistenz virulenter *E. coli*-Stämme erhöht und durch das auf dem Resistenzplasmid lokalisierte *traT* kodiert wird (JANSSEN, 2002, EWERS et al., 2003).

Das TraT-Protein bewirkt eine Änderung von Funktion und Struktur am Komplementsystem und reduziert damit parallel die Anlagerung von Protein der Komplementkaskade an die Bakterienoberfläche. Gleichzeitig wird damit die Phagozytose der im Serum befindlichen Bakterien eingeschränkt (AGUERO et al., 1984; JANSSEN, 2002).

Struktur stabilisierende Mechanismen werden möglicherweise über das OMP gesteuert. Eine Bindung von Antikörpern und die damit verbundene Begrenzung ihrer tödenden Wirkung könnte ebenfalls der Funktionsweise des OMP zugeschrieben werden (WEISER und GOTSCHLICH, 1991).

### *Increased serum survival-Protein (Iss-Protein)*

Als charakteristisches Merkmal für APEC-Isolate im Hinblick auf deren Resistenz gegen das Komplementsystem gilt das Increased serum survival-Protein (Iss-Protein/iss-Gen) (JOHNSON et al., 2002; GIBBS, et al., 2003; MC PEAKE et al., 2005). Es ist wie das *traT*

episomal lokalisiert, und beide wirken durch die Blockade der letzten Stufe der Kaskade des Komplementbindungssystems, folgen jedoch unterschiedlichen Regulationsmechanismen (BINNES et al., 1982; EWERS et al., 2003). Das *iss*-Gen sichert den Bakterien so eine höhere Überlebensrate im Blut. Diese können damit über die Blutbahn zu den inneren Organen gelangen (HORNE et al., 2000). Allerdings ist bis dato nicht geklärt, inwiefern *iss* selbst zur Virulenz von APEC-Isolaten beiträgt oder ob die Anwesenheit von *iss* lediglich den Hinweis auf eine größere pathogenetische Einheit gibt (NOLAN et al., 2003). Im Ergebnis ihrer Untersuchungen stellten TIVENDALE et al. (2004) fest, dass *iss* möglicherweise eine Rolle im Hinblick auf die Virulenz aviärer pathogener E.coli-Stämme spielt. Gleichzeitig bestätigten sie jedoch Studien von PFAFF-MC DONOUGH et al. (2000), wonach der alleinige Nachweis von *iss* keinen Rückschluss auf die Virulenz von APEC-Isolaten zulässt.

### *Lipopolysaccharide (LPS)*

Lipopolysaccharide sind ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Sie sind zusammengesetzt aus der Lipid A-Komponente, dem Kern-Polysaccharid und der Polysaccharidkette.

Das Lipid A ist verantwortlich für eine Reihe von biologischen Eigenschaften. Sie werden den während der Zell-Lyse freigesetzten Lipopolysacchariden zugeschrieben, die eine stark toxische Wirkung entfalten. Dem Lipid A angeschlossen ist das Kern-Polysaccharid, welches aus fünf basalen Zuckern besteht und in die Lipid A proximale- (innere Kernpolysaccharide) sowie die Lipid A distale Region (äußere Kernpolysaccharide) unterteilt ist. Die distale Lipid A Region sowie die sich anschließenden Oligopolysaccharidketten unterliegen in ihrer Struktur und Zusammensetzung starken Variationen. Sie werden als O-spezifische Seitenkette oder O-Antigen angesprochen, sind ausschlaggebend für die Vielfalt der verschiedenen Serotypen und interagieren mit der Umgebung sowie dem Immunsystem des Wirtsorganismus (EWERS et al., 2003). Die Oligopolysaccharidketten können die Bakterien als raue (Rough) oder glatte (Smooth) Kolonien wachsen lassen. Raue Polysaccharidketten haben die Fähigkeit verloren, O-spezifische Seitenketten oder Teile des Kernpolysaccharides zu synthetisieren. Sie werden als sogenannte Verlust-Mutanten angesprochen, da sie nicht in der Lage sind, in den Ablauf des Komplementsystems einzugreifen. Sie sind serumsensitiv (HEINRICHS et al., 1998). Glatte Formen sind hingegen grundsätzlich serumresistent. Sie wirken über die Hemmung der Aktivierung von Komplement im Komplementsystem und inhibieren gleichzeitig die Rezeptoren-vermittelte Phagozytose durch Makrophagen (LIANG-TAKASAKI et al., 1982; EWERS et al., 2003).

## Kapsel

Verschiedene Bakterienspezies bilden sogenannte Kapseln (bestehend aus extrazellulären Polysacchariden oder anderen Polymeren) aus, die der Zellwand aufliegen und deren chemische Zusammensetzung je nach Bakterienspezies variiert. Für *E. coli* sind gegenwärtig mehr als 100 Kapselpolysaccharide bekannt (EWERS et al., 2003).

Bei APEC sind sie überwiegend bei Isolaten vom O-Typ O1 und O2 aber auch bei nicht typisierbaren Stämmen als K1-Kapseln zu finden (GROSS, 1994). Im Zusammenhang mit neonataler Meningitis oder akuter Pyelonephritis werden beim Menschen oft *E. coli* mit K1-Kapseln isoliert (ROBBINS et al., 1974, DESZO et al., 2005). Aufgrund der starken Assoziation mit den APEC-Isolaten der pathogenen O-Gruppen O1 und O2 gehen manche Autoren davon aus, dass aviäre pathogene *E. coli*-Stämme auch als Zooanthroponose-Erreger einzustufen sind (EWERS et al., 2003). Die Ergebnisse weiterer Studien bestärken den Einfluss der K1-Kapseln im Hinblick auf die Serumresistenz der APEC-Stämme (POURBAKHS et al., 1997a; LI et al., 2005).

Als schwaches Immunogen, das gleichzeitig Ähnlichkeit mit körpereigenen Neuraminidasestrukturen hat, wird das K-Antigen vom jeweiligen Wirtsorganismus oft nicht als „fremd“ erkannt. Gleichzeitig wird mittels struktureller Maskierung der Oberfläche von Bakterien eine Bindung an das Komplementsystem bzw. dessen Aktivierung unmöglich (CZIROK et al., 1990; POURBAKHS et al., 1997b; DHO-MOULIN and FAIRBROTHER, 1999).

## Colicin-V

Colicine sind antimikrobielle Toxine, die als Proteine oder Protein-Kohlenhydrate strukturiert sind. Dabei werden sie von einem *E. coli*-Stamm gebildet, jedoch nur gegen andere *E. coli*-Stämme aktiv. Analog ihrer Funktion bzw. Aktivität wird dabei eine Untergliederung in „Porenformende“ und „Nuklease“ Colicine vorgenommen. Ihre Kodierung erfolgt über die auf den Col-Plasmiden lokalisierten Gen-Cluster. Deren Zusammensetzung ist durch drei Gene charakterisiert (Colicin-Gen, Immunitäts-Gen, Lyse-Gen).

Colicin-V unterscheidet sich von den übrigen Colicinen durch sein geringeres Molekulargewicht, weshalb es auch als „Mikrozin“ angesprochen wird, und durch die Regulierungsmechanismen seiner Synthese. Im Vergleich zu anderen wird Colicin-V in Abhängigkeit des frei zur Verfügung stehenden Eisens synthetisiert und nicht mittels Zell-Lyse freigesetzt, sondern exportiert. Sein Gen-Cluster besteht außerdem aus vier Genen, wobei *cvaA* und *cvaB* für den Zell-Export verantwortlich sind, *cvaC* das Strukturgen repräsentiert, und *cvl* für die Sicherung der Immunität gegen das synthetisierte Colicin

verantwortlich ist. Bei der Kolibakteriose fungiert Colicin-V partiell als Toxin gegen die eukariotischen Zellen, zum andern stärkt es die Überlebensfähigkeit der Bakterien, von denen es synthetisiert wird, mittels Komplement-Resistenz-vermittelnder Gene (*iss*), die auf dem ColV-Plasmid gelegen sind. Stämme, die Colicin-V produzieren, sind oft am Krankheitsbild des Swollen Head-Syndroms beteiligt (DIAS DA SIVEIRA et al., 2002). Zahlreiche Studien belegen die Korrelation zwischen der Anwesenheit des Col-V-Plasmids, auf dem mehrere Virulenzfaktoren (u.a. *iss*, *aer*-Gene sowie das ColV-Gen-Cluster) lokalisiert sind, und der Virulenz von aviären pathogenen *E. coli*-Isolaten (JOHNSON et al., 2002; GIBBS et al., 2003; EWERS et al., 2004; TIVENDALE et al., 2004; JOHNSON et al., 2006).

### Toxine und Cytotoxine

Pathogene *E. coli* sind in der Lage virulenzvermittelnde Toxine zu bilden. Obwohl die Toxine der aviären pathogenen *E. coli* bisher nur unzureichend charakterisiert wurden, sind offenbar einige in die Pathogenese der Kolibakteriose involviert, wobei insbesondere den Cytotoxinen mit ihrer Fähigkeit, schädigende Wirkung auf die Stoffwechselfvorgänge der Zelle bzw. auf die Zelle selbst auszuüben, eine bedeutsame Rolle zugeschrieben wird. Zu ihnen zählen Verotoxine, die bei an Kolibakteriose erkrankten oder verendeten Hühnern und Puten isolierten aviären pathogenen *E. coli*-Stämmen nachgewiesen wurden. In diesem Zusammenhang wurden hitzelabile Cytotoxine beschrieben, die besonders gegen Verozellen aber auch in Nebennierentumorzellen und HeLa-Zellen eine zytotoxische Aktivität zeigten. Bezüglich ihrer Aktivität sind sie den Shiga-Toxinen sehr ähnlich, jedoch nicht antigenetisch verwandt (PARREIRA and YANO, 1998; EWERS et al., 2003). Bei *E. coli*-Stämmen, die von erkrankten Tieren mit dem Symptomkomplex des „Swollen Head“ isoliert wurden, trat die Produktion von Cytotoxinen mit der anschließenden Vakuolisierung der entsprechenden Zellen überdurchschnittlich oft auf, so dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen diesem Krankheitsbild und der Produktion von Cytotoxinen zu vermuten ist (PARREIRA and YANO, 1998; SALVADORI et al., 2001).

Im Rahmen der Kolibakteriose konnte weiterhin das hitzestabile Toxin EAST-1 nachgewiesen werden, das im Allgemeinen von enteroaggregativen *E. coli* (EaggEC) gebildet wird.

Shigatoxine konnten bisher nur aus *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden, die aus dem Kot von Vögeln isoliert worden, wobei es sich um die neue Stx-Variante Stx3 handelte. (PARREIRA and YANO, 1998; SALVADORI et al., 2001). Bei Untersuchungen von APEC-Isolaten konnte Stx3 nicht detektiert werden (JANSSEN et al., 2001).

EWERS et al., 2003 stellten jedoch einschränkend fest, dass bisher noch keine abschließenden Ergebnisse hinsichtlich der Identifizierung der genannten Toxine vorliegen und somit die zitierten Befunde kritisch zu bewerten sind.

Dem in den Flagellen von *E. coli*-Stämmen vorkommenden Flagellar-Toxin wird ebenfalls eine Bedeutung in der Pathogenese der Kolibakteriose zugesprochen. Die mit Flagellen ausgestatteten *E. coli*-Stämme besitzen die Kompetenz, die Schleimhaut der Epithelien zu penetrieren. Indessen haben nicht alle aviären pathogenen *E. coli*-Stämme, die im Zusammenhang mit an Kolibakteriose erkrankten oder verendeten Tieren isoliert werden, Flagellen (LA RAGIONE et al., 2000; EWERS, et al. 2003).

## **2.3. *E. coli* und Geflügel**

### 2.3.1. Vorkommen, Geschichte, Bedeutung

Im Jahre 1885 wurde diese Keimart erstmals von Theodor Escherich, Professor für Kinderheilkunde in Graz, aus dem Stuhl von Säuglingen als *Bakterium coli commune* entdeckt und beschrieben (WILLINGER, 1992; SELBITZ, 1992). Für das Geflügel wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts ein kausaler Zusammenhang zwischen Krankheitszuständen von Vögeln und Infektionen mit *E. coli* festgestellt. Im Jahre 1889 wurde beispielsweise eine solche Erkrankung bei einem Waldhuhn, 1894 bei Hühnern und Puten, die Perikarditis und Konjunktivitis aufwiesen, 1898 als eine mit Abmagerung einhergehende chronische Erkrankung beim Geflügel sowie 1904 ein mit *E. coli* in Zusammenhang gebrachtes geflügelcholeraartiges Syndrom bei Hennen beschrieben (GRATZL und KÖHLER, 1968). Zu dieser Zeit vertrat man die Ansicht, dass besonders durch Einschränkung der Widerstandsfähigkeit, wie etwa infolge von Hunger, Durst, Kälte, Sauerstoffmangel oder weite Transporte, das *Bacterium coli* virulent werden, den Darm verlassen und seuchenartige Septikämien verursachen kann (GRATZL und KÖHLER, 1968).

Mit Entwicklung der modernen Geflügelhaltung Anfang bis Mitte des 20. Jahrhunderts stellten sich durch die erhöhten Besatzdichten, räumlich begrenzt nutzbare Flächen, den Handel von Zucht- und Nutzgeflügel sowie die gestiegenen Leistungsansprüche an die Tiere existenzbedrohende hygienische Probleme ein (SIEGMANN und NEUMANN, 2005).

Zunehmend erlangten daher Begriffe wie Haltungs- und Fütterungskrankheiten Bedeutung (GERRITS, 1959). Die Infektion mit *E. coli* entwickelte sich im Zusammenhang mit steigenden Tierkonzentrationen des Wirtschaftsgeflügels zu einer verlustreichen Infektionskrankheit, wobei resistenzmindernde Faktoren den Krankheitsprozess begünstigten

(WIESENER und RIBBECK, 1991). Der überwiegende Teil der mit *E. coli* assoziierten Infektionen beim Geflügel tritt als Sekundärerkrankung, ausgelöst durch prädisponierende Faktoren, in Erscheinung (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999).

Stressoren jeglicher Art wirken prädisponierend für eine Infektion mit *E. coli*. Dazu gehören beispielsweise die Infektion mit primär respiratorischen Krankheitserregern, wie *Mycoplasma gallisepticum* oder dem Virus der Infektiösen Bronchitis und Newcastle Disease aber auch der Befall mit Endo- und Ektoparasiten (Askariden, *Dermanyssus gallinae*), Reaktionen auf Lebendimpfstoffe (Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease) sowie immunsuppressive Vorgänge (IGBOKWE et al., 1996; MITRA et al., 2004).

NAKAMURA et al. (1994) wiesen in ihren Studien nach, dass der kombinierte Einsatz von IB- und ND-Lebendimpfstoffen in mit *Mycoplasma gallisepticum* infizierten Herden den Ausbruch einer *E. coli*-Septikämie induzieren können. Versuche von EL TAYEB und HANSON (2002) an 8 Wochen alten Hühnern und Untersuchungen von PIRSON et al. (1996) sowie PAKPINYO et al. (2002) bei Puten konnten diese Aussage experimentell bestätigen. HARREY und HEMSLEY (1965) belegen, dass eine Infektion des Gewebes im oberen Respirationstrakt mit einem dieser pathogenen Erreger die Gewebsveränderung sowie eine Dezillation der Trachealmucosa nach sich zieht. Daraufhin erfolgt die vermehrte Besiedlung der Luftsäcke mit *E. coli*. Allerdings müssen Kolibakteriosen, die mit hohen Mortalitätsraten einhergehen, nicht zwangsläufig mit Erregern von Atemwegserkrankungen vergesellschaftet sein (VANDEKERCHOVE et al., 2004a). Auf ähnliche Ergebnisse verweisen GRATZL und KÖHLER (1968) sowie FABICANT und LEVINE (1962).

Als Stressfaktoren spielen vor allen Dingen unzureichende Haltungs-, Klima- und Fütterungsbedingungen sowie ein gestörtes Sozialverhalten (Federpicken, Kannibalismus) eine entscheidende Rolle (GERRITS, 1959; DORN, 1971; WILLINGER, 1992; BARNES und GROSS, 1997; PHILIPP und VOSS, 1999). Vor diesem Hintergrund wurde beispielsweise im Rahmen einer Evaluierung alternativer Haltungsformen für Legehennen ein erhöhtes Verlustgeschehen (Mittelwert 11, 8 %) im Vergleich zur konventionellen Käfighaltung (5-8 %) beschrieben. Außerdem konnten in mehr als 27 % der Herden bakterielle und in über 15 % der bewerteten Gruppen parasitäre Infektionen beobachtet werden. Des Weiteren sind für die alternativen Haltungsformen ein den gesetzlichen Grenzwert überschreitender Staubgehalt (3 mg/m<sup>3</sup>) und eine hohe Ammoniakkonzentration beschrieben. Diese liegt sogar oft höher als der Orientierungswert der TA Luft (0, 33 kg/Tierplatz und Jahr) (BERGFELD et al., 2002).

In der Käfighaltung kommt es hingegen seltener zu gehäuften Verlusten, beispielsweise durch *E. coli*-Peritonitis, als in den letztgenannten Haltungssystemen (BÖHLAND, 1999). Auch HARREY und HEMSLEY (1965) berichten über eine höhere Verbreitung von *E. coli* bei

Hühnern, die in Bodenhaltung aufgestellt waren im Vergleich mit Tieren im Ganzrostenssystem. AHLERS et al. (2000) konnten bei verendeten Legehennen aus Bodenhaltung in bis zu 80 % der durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen *E. coli* isolieren. Ein Zusammenhang wird außerdem zwischen der vermehrten Verbreitung der *E. coli*-Stämme in der Umwelt der Tiere und dem Ausbruch von *E. coli*-Infektionen gesehen (HARREY und HEMSLEY, 1965). VANDEKERCHOVE et al. (2004b) berichten in ihren Studien bei Legehennen von dem signifikant geringeren Risiko (33%, odds ratio=0.75) des Ausbruchs einer Kolibakteriose mit zunehmendem Abstand zwischen den Farmen.

Eine zentrale Position in der Ursachenforschung der durch *E. coli* bedingten Krankheitsbilder fällt demnach den Parametern des Herdenmanagements (Haltung, Fütterung, Hygiene, Umwelt, Prophylaxe) zu. TABLANTE et al. (1999) berichten in ihren Ausführungen über den „Early Respiratory Disease Complex“ (ERDC) bei Broilern, der mit erhöhten Verlusten bedingt durch Kolibakteriose einhergeht. Sie bewiesen den signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der aufgestellten Tiere bzw. der Leerstandszeit der Ställe und dem Vorkommen des ERDC. BARNES und GROSS (1997) berichten hingegen, dass gesunde Tiere mit einer intakten Abwehr gegen die natürlich vorkommenden, einschließlich der virulenten *E. coli*-Stämme, resistent sind.

Die Pathogenese der Kolibakteriose, insbesondere die Funktionsmechanismen der aviären pathogenen *E. coli*, sowie der Einfluss verschiedener Managementparameter auf das Infektionsgeschehen konnte trotz zahlreicher Versuche bisher nicht abschließend geklärt werden.

### 2.3.2. Krankheitsbilder beim Geflügel unter Beteiligung von *E. coli*

Einige für das Geflügel pathogene Stämme sind in der Lage, spezifische Virulenzfaktoren auszubilden. Sie werden unter dem Synonym der Aviären Pathogenen *E. coli* (APEC) zusammengefasst (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999; KARIUKI et al., 2002). Auf APEC zurückzuführende lokale und systemische Erkrankungen des Geflügels werden allgemein unter dem Begriff der Kolibakteriose eingeordnet. Klinisch treten dabei akute Infektionen mit plötzlich ansteigender Mortalität, milde Formen mit geringen Mortalitätsraten oder chronische Erkrankungen auf. Sie manifestieren sich in verschiedenen Symptomkomplexen, wie zum Beispiel der Koliseptikämie, Koligranulomatose, Chronic Respiratory Disease (CRD), Kolidermatitis, Swollen Head Syndrom (SHS), *E. coli*-Peritonitis/Salpingitis, *E. coli*-Synovitis/Osteomyelitis, Omphalitis (Mushy Chick Disease), Panophthalmie, treten aber oft vergesellschaftet miteinander in Erscheinung (BARNES und GROSS, 1997).

### 2.3.2.1. Koliseptikämie

Die klinischen Symptome der Koliseptikämie sind unspezifisch. Ihr Verlauf, die Dauer der Infektion sowie das Alter der betroffenen Tiere und die Art der infizierten Organe können sehr stark variieren. Während es sich bei Säugetieren vornehmlich um eine Primärerkrankung handelt, tritt sie beim Geflügel als typische Sekundärinfektion in Erscheinung (BARNES und GROSS, 1997; SHANE, 2001a). Selten sind Primärerkrankungen zu beobachten (WILLINGER, 1992). Die ersten klinischen Anzeichen zeigen sich in Form von verminderter Futteraufnahme bzw. -verwertung. Die Tiere sind teilnahmslos, mit struppigem Gefieder, sitzen abgegrenzt und entwickeln teilweise eine schwere Atmung mit gelegentlichen Japsen, selten können Atemgeräusche oder Husten beobachtet werden. Morbidität und Mortalität variieren sehr stark, wobei die Tierverluste selten 5 % übersteigen, jedoch oft mehr als 50 % der Tiere vom Infektionsgeschehen betroffen sind (WRAY und DAVIES, 2001). Plötzliche Todesfälle sind möglich.

Die primäre Invasion der Erreger erfolgt via Respirationstrakt. Dorthin gelangen die Keime durch Inhalation von kontaminiertem Staub, wo sie sich vermehren und entzündliche Veränderungen in den jeweiligen Organen (Luftsack, Lunge) verursachen. Ausgehend vom Respirationstrakt penetrieren die Erreger in die Blutbahn und siedeln sich in anderen Organsystemen an. Hier rufen sie ebenfalls entzündliche Veränderungen hervor. Gleichzeitig ist eine Weiterverbreitung durch den mit *E. coli* infizierten abdominalen Luftsack über den angrenzenden Mesosalpinx möglich (WILLINGER, 1992; GROSS, 1994).

Im Sektionsbild finden sich Veränderungen in Form einer Polyserositis, wie Perihepatitis und Perikarditis. Vielfach steht eine fibrinöse Aerosakkulitis im Vordergrund der pathologisch-anatomischen Veränderungen, wobei die verdickten, mit käsigen Exsudat gefüllten Luftsäcke kennzeichnend sind (WILLINGER, 1992). Der Herzbeutel ist von käsigen Belägen bedeckt und die Leber ist nahezu immer von einer Haut fibrinösen Materials überzogen. Milz, Nieren und Leber können vergrößert sein, teilweise werden eine leichte Tracheitis und Exsudatansammlungen in der Lunge beobachtet. Letzteres tritt vor allen Dingen bei primär respiratorisch bedingten Infektionen auf (SHANE, 2001b).

Die im Rahmen einer Sektion vermutete Diagnose muss jedoch in jedem Fall unter Zuhilfenahme bakteriologischer Untersuchungen verifiziert werden. Differentialdiagnostisch müssen andere Erreger von Septikämien wie Pasteurellen, Salmonellen, Mycoplasmen oder Erysipelothrix ausgeschlossen werden (WILLINGER, 1992; WRAY und DAVIES, 2001; SHANE, 2001b).



### 2.3.2.2. Dottersackinfektion (YOLK SAC INFECTION, MUSHY CHICK DISEASE, OMPHALITIS)

Diese Erkrankung ist eine der häufigsten Todesursachen von Küken in den ersten Lebenstagen (WRAY und DAVIES, 2001). Bei einem akuten Verlauf kann die Mortalität binnen weniger Tage auf 10 % steigen (DORN, 1971). Teilweise entwickelt sich die Dottersackentzündung in den letzten Tagen vor dem Schlupf der Küken im Brutei (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). ROSARIO et al. (2004) identifizierten bei ihren Untersuchungen zu dieser Problematik O19 (12 %), O84 (9 %), O8 (6 %) und O78 (5 %) als die vorherrschenden *E. coli*-Stämme.

Die Omphalitis kann sich in verschiedenen klinischen Bildern manifestieren. Typisch sind dabei plötzliche Todesfälle, zentralnervöse Störungen wie Festliegen und Kopfverdrehen aber auch Durchfälle und angestregtes Atmen bzw. Atembeschwerden (HOOP, 2002). Tiere, die älter als 3-5 Tage werden, fallen durch ihr aufgeblähtes Abdomen, einen entzündeten, verdickten, teilweise nekrotischen Nabel, sistierende Futter- und Wasseraufnahme sowie das reduzierte Allgemeinverhalten und verstärktes Wärmebedürfnis auf. Zu beobachten sind außerdem Tiere mit gestäubtem Gefieder und verklebten Flaumfedern im Kloakenbereich bis hin zur Kotballenbildung (Pseudoopstipation) (WILLINGER, 1992; DORN, 1971).

In erster Linie fungiert der schlecht abgeheilte, entzündete Nabel als Eintrittspforte für die Bakterien (SHANE, 2001b; WRAY und DAVIES, 2001; GERRITS, 1959).

Im Sektionsbild zeigen sich die Unterhaut- und Dottersackgefäße geweitet. Leber, Lunge, Milz und Nieren sind dunkel verfärbt und stark geschwollen.

Auffallend ist der nicht bzw. nur unvollständig resorbierte, entzündete und von Blutgefäßen umgebene Dottersack sowie seine abnorme Farbe und Konsistenz. Dabei kann der Dotter von einer gelben, grünen bis hin zu braunen Färbung sein. Er zeichnet sich oft durch einen faulig, stinkenden Geruch aus. Als charakteristisches Merkmal ist außerdem die zu beobachtende Peritonitis mit haemorrhagischer Serositis anzusehen (SHANE, 2001b; WRAY und DAVIES, 2001). Tiere, welche die Dottersackinfektion überstehen, fallen durch ihr geringeres Wachstum und schlechte Körpermasseentwicklung auf.

Die Ursachen der durch *E. coli* hervorgerufenen Dottersackinfektion sind vielschichtig. Sie können sowohl durch Unzulänglichkeiten im Bereich der Elterntiere (Management, Erkrankungen) als auch durch suboptimale Brut- und Aufzuchtbedingungen hervorgerufen werden. Die fäkale Kontamination der Eischale mit *E. coli* zusammen mit anderen potentiell pathogenen Erregern wie Pseudomonaden oder Staphylokokken, aber auch mangelnde Nesthygiene oder eine verspätete Eisammlung, können hier ausschlaggebend sein (BARNES und GROSS, 1997). Pathogene *E. coli* können während der Eiablage die Eihäute

durchdringen und unter bestimmten Voraussetzungen die Omphalitis der Küken hervorrufen (DIAS DA SILVEIRA et al., 2002).

Ungenügende Brut- und Transporthygiene sowie schlechtes Aufzuchtmanagement (Transporthygiene, Stallklima, Stallhygiene, Futterhygiene) sind weitere Faktoren, die eine solche Infektion begünstigen können (SHANE, 2001b; HOOP, 2002). Differentialdiagnostisch müssen Infektionen mit Erregern wie *Proteus subsp.*, Clostridien, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* und Staphylokokken ins Kalkül gezogen werden (WRAY und DAVIES, 2001).

#### 2.3.2.3. Koligranulomatose (HJÄRRE'S DISEASE)

Als Koligranulomatose wird eine zuerst von HJÄRRE und WRAMBY (1947) beschriebene Erkrankung des Geflügels angesprochen (GERRITS, 1959).

Sie tritt nur sporadisch bei Huhn und Pute auf, zeichnet sich jedoch nicht durch spezifische klinische Symptome aus. An Koligranulomatose erkrankte Tiere verenden spontan oder erst nach einer längeren Phase, die mit ständigem Kränkeln und zunehmendem Konditionsverlust verbunden ist (DORN, 1971; WRAY und DAVIES, 2001). Pathologisch-anatomisch fallen typische derbe, knotige Granulome am Mesenterium und der Wand des Intestinum auf. Sie sind teilweise auch am Caecum zu finden und von gelber Farbe. In seltenen Fällen ist die Leber in ähnlicher Weise mit betroffen.

Differentialdiagnostisch müssen Krankheiten wie Aviäre Leukose und Geflügeltuberkulose ausgeschlossen werden.

Wirtschaftlich ist die Koligranulomatose jedoch bisher nur von untergeordneter Bedeutung, da sie sich fast ausschließlich als Einzeltiererkrankung darstellt.

#### 2.3.2.4. Kolidermatitis (CELLULITIS)

Diese durch *E. coli* bedingte Erkrankung wird auch als nekrotische oder tiefe Dermatitis benannt. Veränderungen der Haut, welche die Kolidermatitis auszeichnen, befinden sich zumeist im Bereich des unteren Abdomens unterhalb des Magens und der Schenkel. Die tiefe Dermatitis zeigt sich an der Hautoberfläche als markstück- bis handtellergröße, hell- bis dunkelgelbliche oder bräunlich verfärbte Verdickung und Verhärtungen der Haut (FRIES et al., 2001). Diese Veränderungen fallen außerdem als fibrinöse Plaques in der Unterhaut auf (GROSS, 1994). Jährlich verursacht diese Erkrankung bedeutende ökonomische Verluste

bei Mastgeflügel durch den Verwurf bzw. die Abwertung betroffener Schlachtkörper (SHANE, 2001b; VAILLANCOURT und BARNES, 2003; BOULIANNE, 2003). GOMIS et al. (2000) fanden im Rahmen einer Studie bei 21 % der untersuchten Schlachtkörper von Broilern Cellulitis, hervorgerufen durch *E. coli*. In der überwiegenden Zahl der Fälle werden die Serogruppen O78:K80 sowie O1 und O2 isoliert (MESSIER et al., 1993, PEIGHAMBARI et al., 1995a, b; GROSS, 1994; GOMIS, 1997). Eine Beteiligung anderer Bakterien ist nicht auszuschließen (WRAY und DAVIES, 2001).

Es gilt als erwiesen, dass prädisponierende Faktoren wie Immunsuppression, ausgelöst durch eine Infektion mit dem Virus der Infectious bursal disease (IBD), aber auch defizitäre Managementparameter wie erhöhte Besatzdichten oder die Aufstallung von Rassen mit geringerem Federwachstum ursächlich für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich sind. Möglicherweise haben aber auch die Veränderungen im Geno- und Phänotyp der Broiler einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung dieser Erkrankung (BERGMANN, 1995; KRÜGER, 2005).

Durch den unzureichenden Schutz und/oder kleine Verletzungen der Haut kommt es zu den im Zusammenhang mit der Kolidermatitis erwähnten Läsionen der Unterhaut, in denen sich über eine Ausdehnung von 0,5 bis zu 3 cm käsiges Exsudat ansammelt. Experimentell konnte dies über die Infektion eines Hautkratzers mit einem pathogenen *E. coli*-Stamm reproduziert werden. Hier bildete sich innerhalb von 24 h ein Exsudat in der Unterhaut (PEIGHAMBARI et al., 1995a, b; SHANE 2001b). In Studien von MESSIER et al. (1993) wurde aus 88,1 % der beprobten Hautkratzer *E. coli* isoliert. Ähnliche Aussagen treffen VALENTIN und WILLSCH (1987) und GLÜNDER (1990) im Rahmen von Übertragungsversuchen.

Prophylaktisch ist die Minimierung der prädisponierenden Faktoren über eine Optimierung des Hygiene- und Herdenmanagements von grundlegender Bedeutung für die Verminderung dieser Erkrankung (SHANE, 2001b; WRAY und DAVIES, 2001).

Als wichtiger Punkt ist hier die systematische Umsetzung grundlegender hygienischer Maßnahmen wie eine ausreichende Reinigung und wirkungsvolle Desinfektion sowie die konsequente Einhaltung der Servicezeiten zwischen der Belegung der einzelnen Ställe anzusehen. So beschrieben ELFADIL et al. (1996) eine negative Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten der Kolidermatitis bei Broilern und den Leerstandzeiten der Ställe. Differentialdiagnostisch müssen auch andere bakterielle Erreger mit in Betracht gezogen werden (WRAY und DAVIES, 2001).

### 2.3.2.5. Swollen Head Syndrom (SHS)

Das Swollen Head Syndrom charakterisiert eine subakute bis akute ödematöse Schwellung des Periorbitalbereiches und des angrenzenden Gewebes bei Broilern, Broilerelterntieren und Legehennen. Die Ausbildung der Erkrankung scheint eine zuvor stattgefundene Infektion mit einem Corona- oder Pneumovirus zu erfordern (HAFEZ und LÖHREN, 1990; HAFEZ, 1994; BARNES und GROSS, 1997; MAJO et al., 1997).

Klinisch sind zunächst ein reduziertes Allgemeinbefinden, Konjunktivitis, Augenausfluss, Atemgeräusche und Schniefen zu beobachten. Später entstehen Ödeme, die sich über die gesamte Kopfregion ausbreiten können. Im folgenden Krankheitsverlauf kommt es zum Sistieren der Wasser- und Futteraufnahme und zentralnervösen Störungen, welche bis zum Tod der Tiere führen können.

Die Einlagerungen von blutigem bis hin zu fibrinösem Exsudat in das fasziale Unterhautgewebe sowie Rhinitiden und Konjunktivitiden kennzeichnen die pathologisch-anatomischen Veränderungen. Gelegentlich treten im Zusammenhang mit dem SHS Sinusitiden auf. Häufig fallen Tiere mit zentralnervöser Symptomatik auf, die unter der Sektion entzündliche Veränderungen des Mittelohrs mit Ansammlungen eitrigem Exsudates zeigen. Beschrieben werden ebenfalls Entzündungen des Eierstocks, Eileiters und des Bauchfells bei Legehennen (MORLEY und THOMSON, 1984; GOREN, 1985; PATTISON et al., 1989; HAFEZ und LÖHREN, 1990; PELETEIRO, 1991; PERLEMANN et al., 1991; ARNS und HAFEZ, 1992).

Die Erkrankung tritt vornehmlich in den Wintermonaten auf, wo prädisponierende Faktoren wie schlechte Belüftung sowie ein hoher Ammoniakgehalt der Stallluft und eine geringe Luftfeuchtigkeit begünstigend auf die Entstehung des SHS wirken (BARNES und GROSS, 1997; SHANE, 2001b).

PARREIRA and YANO (1998) und SALVADORI et al. (2001) isolierten *E. coli*-Stämme, die aus an SHS erkrankten Hühnern stammten. Dabei detektierten sie ein Zytotoxin (VT2y), dessen Zielgewebe das vaskuläre Endothelium ist. Gleichzeitig verursacht es charakteristische, dem Verotoxin ähnliche, zytotoxische morphologische Veränderungen bei Verozellen. Nach Studien von DIAS DA SIVEIRA et al. (2002) wird vor allem Colicin V von *E. coli*-Stämmen produziert, die aus dem Krankheitsbild des „Swollen Head Syndroms“ isoliert werden. STEHLING et al. (2003) konnten diesen Zusammenhang in ihren Untersuchungen nicht bestätigen. Sie isolierten von Hühnern mit klinischen Symptomen des SHS einen aviären pathogenen *E. coli*-Stamm (SHS4), der 2 Plasmide (60 und 98MDa) besitzt und Resistenzen gegen Streptomycine und Tertzzykline zeigt. Mittels PCR konnten dabei die virulenzassoziierten Gene *fimA*, *csgA* und *tsh* nachgewiesen werden. Auf den Ergebnissen ihrer Betrachtungen basierend vermuten sie einen Zusammenhang zwischen den auf

dem 60 MDa-Plasmid befindlichen Adhäsionsgenen und der initialen Kolonisierung des aviären pathogenen *E. coli*-Stammes im oberen Respirationstrakt der Hühner.

#### 2.3.2.6. Chronic Respiratory Disease (CRD) (AIR SAC DISEASE, LUFTSACKERKRANKUNG)

Die CRD zählt zu den bekanntesten Erkrankungen des Geflügels und verursacht große wirtschaftliche Schäden mit Tierverlusten bis zu 20 %. Gewöhnlich ist sie im Alter von der 2. bis 12. Woche zu beobachten (GROSS, 1994). Dem auslösenden Mechanismus dieses Krankheitsbildes liegen verschiedene Faktoren zugrunde. Dabei stehen virale Infektionen, Mykoplasmosen sowie Belastungen der Tiere mit kontaminierter Luft oder Einstreu durch pathogene Agentien und hohe Ammoniakkonzentrationen als prädisponierende Faktoren im Vordergrund (MYERS und ARP, 1987). Auch subklinische Erkrankungen des Respirationstraktes mit einzelnen oder kombinierten IB- und/oder ND-Infektionen bzw. durch Impfstämme hervorgerufene Veränderungen führen in Verbindung mit *E. coli* zu diesem Symptomkomplex. Hier scheinen insbesondere die Serovare O2 und O78 im Zusammenhang mit dieser Infektionsproblematik zu stehen (WEEBADDA et al., 2001). Im Hinblick auf die primäre Kolonisierung des oberen Respirationstraktes mit aviären pathogenen *E. coli* kommt den F1-Fimbrien eine besondere Rolle zu (POURBAKHSI et al., 1997c).

Klinisch fallen die Tiere durch ein reduziertes Allgemeinbefinden auf. Pathologisch-anatomisch ist eine Entzündung der Luftsäcke beschrieben, die verdickt und mit käsigem Exsudat gefüllt sind (GROSS, 1994). Eine Ausbreitung auf das angrenzende Gewebe ist ebenfalls möglich, so dass zeitweise auch Pleuropneumonien, Pneumonien, Perikarditiden oder Perihepatitiden beobachtet werden (BARNES und GROSS, 1997).

TABLANTE et al. (1999) beschrieben Risikofaktoren bei der Ausbildung des Early respiratory disease complex (ERDC) in Broilerbeständen im Zusammenhang mit *E. coli*. Übereinstimmend erwähnten sie dabei die negative Wirkung von vorangegangenen Infektionen mit IB, ND, Mycoplasmen aber auch IBD.

Signifikant wurde jedoch der Einfluss von Managementparametern herausgestellt. So wirkten sich beispielsweise ein höherer Tierbesatz, mangelnde Hygiene sowie geringe Servicezeiten zwischen den Stallbelegungen und die zunehmende Farmgröße negativ auf die Ausbildung des mit ERDC assoziierten Krankheitsbildes aus. Differentialdiagnostisch müssen die Infektionen mit Chlamydien und Pasteurellen mit berücksichtigt werden (TABLANTE et al., 1999).

### 2.3.2.7. Peritonitis/Salpingitis

Die chronische Infektion des Eileiters und die oft daraus resultierende Entzündung des Bauchfells ist ein Krankheitsbild, das überwiegend bei Broilerelterntieren und Legehennen aber auch bei anderen Geflügelarten vorkommt (SHANE, 2001b). CRESPO et al. (2001) berichten über eine solche Infektion bei Lege-Pekingenten.

Die Entzündung breitet sich durch die Kloake infolge Retroperistaltik aus (SHANE, 2001b). Die Erkrankung wurde auch als Bestandsproblem beschrieben. Oft tritt dieser Symptomkomplex im Zusammenhang mit Kannibalismus oder aggressivem Federpicken und schlechtem Herdenmanagement auf (BARNES und GROSS, 1997).

In den vergangenen Jahren wurde die Erkrankung bei der steigenden Zahl an Freilandhaltungen zunehmend beobachtet (WRAY und DAVIES, 2001). AHLERS et al. (2000) konnten dieses Erkrankungsbild bei bis zu 46, 6 % der pathologisch-anatomisch untersuchten Legehennen aus Bodenhaltung feststellen. Im Sektionsbild fällt die mit käsigem, stinkenden Material oder milchiger Flüssigkeit gefüllte Bauchhöhle auf. Die Eierstöcke können verlagert und entzündet sein. Das Ovidukt ist dünnwandig, dilatiert und mit einer eitrigen Masse gefüllt, deren Volumen sich mit der Zeit vergrößern kann. Betroffene Tiere sterben zumeist in den ersten 6 Monaten nach der Infektion. Tiere, die überleben, legen nur selten Eier (WRAY und DAVIES, 2001).

GAZDZINSKI UND BARNES (2004) beschrieben die Entwicklung einer akuten Vaginitis bedingt durch *E. coli* infolge von Verletzungen des Hymens durch nicht korrekt durchgeführte künstliche Besamungen bei Legeputen.

Bei Schlachtkörpern von Legehennen bzw. Mastelterntieren können die aufgezeigten Veränderungen zu erhöhten Verwurfraten führen (BISGARD and DAM, 1981).

### 2.3.2.8. Synovitis/Osteomyelitis

Infolge einer Bakteriämie kann *E. coli* aus Gelenken von Geflügel isoliert werden. Einige Tiere entwickeln chronische Infektionen, andere gesunden nach circa einer Woche vollständig (WRAY und DAVIES, 2001).

Veränderungen zeigen sich in thoracolumbalen, vertebrealen Gelenken. Sie sind ursächlich an der Entwicklung von Spondylitiden, progressiven Paresen und Paralysen beteiligt. Bei der Pute kann es nach der hämatogenen Verbreitung von *E. coli* infolge einer hämorrhagischen Enteritis zur Ausbildung von Synovitiden und/oder Osteomyelitiden kommen (WILLINGER, 1992; DROUAL und CHIN, 1996; BARNES und GROSS, 1997; HUFF et al., 2000).

Allerdings muss die Beteiligung anderer bakterieller (Pasteurellen, Salmonellen) und viraler (Reovirus) Erreger sowie die Infektion mit *Mycoplasma synoviae* ausgeschlossen werden.

#### 2.3.2.9. Konjunktivitis/Panophthalmitis

Aufgrund mangelnder Hygiene und falschen Handlings der Tiere ist es möglich, dass sich Konjunktivitiden ausbilden, die sich im folgenden Verlauf zur Keratitiden oder Panophthalmitiden entwickeln können. Diese Form der Erkrankung wird ebenfalls durch unsachgemäße Applikation von Impfstoff via Augentropf-Methode bzw. verunreinigtem Impfstoff ausgelöst. Gewöhnlich ist nur ein Auge betroffen. Einige Tiere sterben kurz nach dem Höhepunkt der Infektion, andere überleben und erholen sich wieder.

Im Mikroskop lassen sich mononukleäre Infiltrate und heterophile Zellen erkennen. Die Kornea ist vollständig zerstört (BARNES und GROSS, 1997; SHANE, 2001b).

Differentialdiagnostisch muss insbesondere bei Puten die Infektion mit *S. arizonae* ausgeschlossen werden.

## 2.4. Diagnose

Obwohl sich im Sektionsbild oft schon durch den konkreten Verdacht ein Hinweis auf die Diagnose ergeben kann, müssen die klinischen und pathologisch-anatomischen Befunde über bakteriologische Nachweisverfahren abgesichert werden. Dabei ist auf das gleichzeitige Vorkommen anderer bakterieller Erreger zu achten (WILLINGER, 1992; WRAY und DAVIES, 2001).

### 2.4.1. Erregerisolierung und -identifizierung

Die Anzucht von *E. coli* aus Kotproben, Sektionsmaterial oder Tupferproben bereitet keine Schwierigkeiten (SELBITZ, 1992, 2002).

Das Bakterium stellt in der Kultur keine besonderen Ansprüche und wächst auf einem Großteil der gebräuchlichen künstlichen Nährmedien unter aeroben und anaeroben Bedingungen, bei Temperaturen zwischen 18 °C und 44 °C. Sein Temperaturoptimum liegt bei 37 °C (WILLINGER, 1992). Die gram-negativen Keime wachsen auf Blut-Agar als konvexe, kreisförmige, schleimige, graue Kolonien. Sie treten in der Glatt (S)- oder in der Rau (R)-Form auf, fermentieren Glucose, Mannitol und Laktose (WILLINGER, 1992, WRAY

und DAVIES, 2001). Eine weitere Differenzierung der Keime beginnt, nachdem das Laktosespaltungsvermögen auf Selektivnährmedien wie Endo-, Gassner- oder MacConkey-Agar festgestellt wurde. Die Speziesdiagnose *E. coli* wird durch die Ermittlung der biochemischen Eigenschaften gestellt. Innerhalb der Spezies erfolgt die Serotypisierung primär durch den Nachweis der somatischen Zellwand-O-Antigene, der Kapsel (K)- und Geißel (H)-Antigene, wobei es vorkommt, dass eine Kultur mehrere Serovare enthält (WILLINGER, 1992; SELBITZ, 1992). Obwohl die Serotypisierung als die Methode der Wahl für die Identifizierung von *E. coli*-Stämmen angesehen wird, zeigen neuere Untersuchungen, dass sich aviäre pathogene *E. coli*-Isolate nur durch zusätzliche diagnostische Untersuchungsmethoden charakterisieren lassen. Dazu gehört beispielsweise die Bestimmung ihrer Pathogenität durch die Verifizierung verschiedener Virulenzfaktoren mittels PCR, womit zukünftig die Serotypisierung als gebräuchliches Diagnostikum abgelöst werden könnte (JANSSEN, 2002).

#### 2.4.2. Indirekter Nachweis

Der Nachweis von Antikörpern kann mit dem indirekten Fluoreszenztest, dem indirekten Hämagglutinationstest und dem ELISA erbracht werden (HAAS, 1994).

##### 2.4.2.1. Nachweis von Antikörpern

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. coli* stehen wie schon erwähnt unterschiedliche Methoden zur Auswahl. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser mittels ELISA geführt, der nach LEITNER et al. (1990) beispielsweise im Vergleich zum indirekten Hämagglutinationstest (IHT) weitaus sensitiver ist und sich durch die Fähigkeit auszeichnet, Ergebnisse reproduzieren zu können. Auf diese Methode der Diagnostik soll im Folgenden näher eingegangen werden.

##### 2.4.2.1.1. Nachweis spezifischer Antikörpern gegen *E. coli* mittels ELISA

LEITNER et al. (1990) gelang es unter Verwendung eines modifizierten, nicht kompetitiven, indirekten ELISA, spezifische Antikörper gegen die *E. coli*-Serovare O78:K80 und O2:K1, die hauptsächlich an pathogenen Veränderungen beim Geflügel beteiligt sind, darzustellen. Die gemessenen Ergebnisse der Untersuchungen im indirekten Hämagglutinationstest (IHT)



waren bis zum 15. Tag nach der *E. coli*-Impfung vergleichbar mit denen des ELISA. Später fiel die gemessene Kurve des Antikörperspiegels beim IHT schneller als die beim ELISA gemessenen Werte ab.

Zusätzlich zu dem von LEITNER et al. (1990) etablierten ELISA-System der Antikörpermessung gegen spezifische Serovare von *E. coli* existieren noch weitere Nachweisverfahren. So bewerteten KARIYAWASAM et al. (2002, 2004a) mittels ELISA die Immunantwort (IgY) auf spezifische Oberflächenantigene aviärer pathogener *E. coli* bei experimentell infizierten Küken, um so potentiell für die Impfstoffherstellung geeignete *E. coli*-Stämme identifizieren zu können. Dabei stellten sie fest, dass der Antikörperspiegel (IgY) bei den Küken, denen ein Feldstamm injiziert worden war, signifikant höher lag als bei den mit einer *E. coli*-Mutante geimpften Tieren. RUBLE et al. (2002) untersuchten das Vorkommen von Serumantikörpern gegen gram-negative Antigene im ELISA auf Basis einer *Escherichia coli*-Mutante (J5).

Ein kommerzieller ELISA-Testkit steht bisher noch nicht zur Verfügung.

## **2.5. Differentialdiagnose**

Die *E. coli*-Infektion des Geflügels zeichnet sich durch kein pathognomonisches Krankheitsbild aus. Das kausale Agens ist durch die oft vorliegenden Mischinfektionen nicht immer sofort zu identifizieren. Eine korrekte Diagnosestellung erfordert daher, wie in den vorangegangenen Ausführungen bereits erläutert, individuell das jeweils vorliegende Geschehen von den anderen für das Geflügel pathogenen Erregern über weiterführende Nachweisverfahren abzugrenzen (WILLINGER, 1992).

## **2.6. Bekämpfungsmaßnahmen**

### **2.6.1. Therapie**

Der Einsatz von Stoffen mit pharmakologischer Wirkung kann die Mortalitätsrate im Fall einer akuten Kolibakteriose verringern. Der Verbraucherschutz erfordert die Gewinnung von Lebensmitteln, die frei von Arzneimittelrückständen sind. Gleichzeitig regeln und limitieren die aktuellen gesetzlichen Vorgaben den Einsatz von Stoffen mit pharmakologischer Wirksamkeit. Grundlage für den Einsatz von Chemotherapeutika ist in jedem Fall die Erstellung eines Antibiogramms, in dem die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Antibiotika geprüft wird, um insbesondere der zunehmenden Resistenzproblematik

Rechnung zu tragen (KIETZMANN und LÜDERS, 2005). Das Hauptaugenmerk bei der Bekämpfung dieser Erkrankung sollte daher auf die Umsetzung prophylaktisch wirksamer Maßnahmen gerichtet sein (WILLINGER, 1992).

## 2.6.2. Prophylaxe

Ein optimales Haltungsmanagement mit entsprechenden Haltungs-, Fütterungs- und Hygienemaßnahmen, die regelmäßige Gesundheitsüberwachung sowie ein angepasstes Prophylaxeprogramm sind Voraussetzung für die Beherrschung dieser Faktorenerkrankung (PHILIPP und VOSS, 2001; WRAY und DAVIES, 2001; SHANE 2001a). Letzteres soll im Folgenden näher erläutert werden.

### 2.6.2.1. Immunprophylaxe

Mit der Intensivierung der Geflügelproduktion in den vergangenen Dekaden wurde gleichzeitig das Risiko der rasanten Ausbreitung infektiöser Erkrankungen erhöht (SHARMA, 1999). In der modernen Geflügelwirtschaft sind unterschiedliche Aspekte für ein optimales Gesundheitsmanagement ausschlaggebend. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Vermeidung von Krankheitsausbrüchen.

Die Tiere sind für eine Vielzahl infektiöser Agentien wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten empfänglich (BARNES und GROSS, 1997). Die Erreger können subklinische Erkrankungen und Immunsuppression hervorrufen oder sogar bis zum Tod der Tiere führen. Die oft daraus resultierende suboptimale Entwicklung der Tiere verursacht hohe ökonomische Verluste für die Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie (SHARMA, 1999).

In den letzten Jahren gehen die Bemühungen zunehmend weg von therapeutischen Maßnahmen, die oft mit dem Einsatz von Antibiotika verbunden sind, hin zu prophylaktisch wirksamen Methoden.

Die bekannteste und zugleich bisher effektivste Variante des vorbeugenden Gesundheitsschutzes ist die Immunisierung der Tiere über Impfstoffe (YEGANI et al., 2005).

#### 2.6.2.1.1. *E. coli*-Vakzine beim Geflügel

Obwohl bei anderen Tierarten wie Rindern und Schweinen effektive Impfstoffe zur Bekämpfung der Kolibakteriose existieren, sind diese für das Geflügel nur bedingt verfügbar

(FROMMMER et al., 1994). Außer für den Einsatz bei Broilerelterntieren gibt es in Deutschland derzeit keine zugelassenen *E. coli*-Vakzine für Geflügel. Der großen ökonomischen Bedeutung dieses bakteriellen Erregers steht also ein Mangel an kommerziell verfügbaren Impfstoffen gegenüber (WIELER und SCHWARZ, 2000).

Trotz alledem wird in verschiedenen Studien über den erfolgreichen Einsatz unterschiedlicher *E. coli*-Vakzine bei Hühnern und Puten berichtet (ARP, 1980).

DEB und HARRY (1976, 1978) nutzen dafür eine Formalin-inaktivierte, mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans versetzte Vakzine. ROSENBERG et al. (1985) verwendeten für die Impfung gegen Kolibakteriose eine Formalin-inaktivierte Bakteriensuspension aus O2, O78- und O35-Coli-Serotypen in einer Öl-Emulsion bei Broilerelterntieren. Die Nachkommenschaft war daraufhin aufgrund der maternalen Antikörper vor *E.coli*-Infektionen und durch *E. coli* hervorgerufene Läsionen für 2 Wochen nach dem Schlupf geschützt. Allerdings galt dies nur für homologe Stämme. SANDHU und LAYTON (1985) prüften die Wirksamkeit einer kombinierten *E. coli*-(O78)-*Pasteurella anatipestifer*-Vakzine bei weißen Pekingenten. Obwohl sich die Vakzine gegen den homologen Challenge mit einem pathogenen O78 als wirksam erwies, konnte keinerlei signifikante Kreuzimmunität zu anderen *E. coli*-Stämmen verifiziert werden.

Eine weitere Variante der Herstellung prüften MELAMED et al. (1991), indem sie Bakterienkulturen der Serovare O78:K80 bzw. O2:K1 durch Ultraschall inaktivierten. HELLER et al. (1990) konnten bei der Anwendung einer beschallten experimentellen Vakzine mit einem kompletten Freud'schen Adjuvans in Zuchthennen Antikörper produzieren, die der Nachkommenschaft für mindestens 160 Tage immunologischen Schutz gewährte. Andere Herangehensweisen finden in der Nutzung der Antigenstrukturen der Bakterien ihre Anwendung. So fertigten PANIGRAHI und GYIMAH (1984), GYIMAH und PANIGRAHI et al. (1985) und GYIMAH et al. (1986) für Hühner sowie NAGARAJA et al. (1983) für Puten eine Öl-emulgierte Pili-Vakzine, welche die Tiere vor homologen Infektionen mit *E. coli* schützten. FROMMMER et al. (1994) berichten in ihren Untersuchungen hingegen über den erfolgreichen oralen und parenteralen Einsatz einer *E. coli*-Lebendvakzine. Ähnliche Ergebnisse erzielten AMOAKO et al. (2004), die nach dreimaliger oraler bzw. Spray-Applikation des *E. coli*-Lebendimpfstoffes am 1., 14. und 28. Lebenstag den höchsten Schutz nachweisen konnten. Gleichzeitig stellten sie fest, dass hohe Antikörpertiter nicht gleichzeitig einen hohen Impfschutz implizieren.

Nach ARP (1980) und KWAGA et al. (1994) scheinen Lebendimpfstoffe eine höhere Immunität zu induzieren. CHAFFER et al. (1997) entwickelten eine Vakzine aus Bakterienmembranen, die Vesikel bilden, und konnten damit einen wirksamen Schutz von Hühnern gegen die Infektion mit pathogenen *E. coli*-Erregern nachweisen. KARIYWASAM et al. (2004a) prüften für drei definierte attenuierte aviäre pathogene *E. coli*-Mutanten den

Einsatz als Vakzine via Spray-Verfahren am 1. und 14. Lebenstag bei Hühnerküken. Mittels ELISA konnten sie dabei einen Anstieg der IgY im Serum und in der Luftsacklavage der Tiere detektieren. Der Schutz gegen eine Infektion mit *E. coli* war allerdings nur serovarspezifisch ausgebildet. Ähnliche Ergebnisse zeigen Untersuchungen von PEIGHAMBARI et al. (2002). HUFF et al. (2002) versuchten über die mehrmalige Applikation einer Bakteriophage via Spray einen prophylaktischen Schutz gegen *E. coli*-Infektionen zu induzieren. Allerdings wurde dadurch die Mortalitätsrate lediglich geringgradig reduziert. Das aviäre IgY erfüllt mit der allgemeinen Reaktion auf Toxine und Antigene ähnliche biologische Funktionen wie das IgG der Säuger, wurde jedoch auch in Darm- bzw. respiratorischen Sekreten sowie in der Tränenflüssigkeit von Hühnern und Puten nachgewiesen (HIGGENS, 1996). Zum Schutz vor der Infektion des Respirationstraktes mit *E. coli* injizierten KARIYWASAM et al. (2004b) Broilerküken am 11. Tag intramuskulär IgY aus Dotter von immunisierten Broilereltern. Im Abstand von je 1 Woche waren diesen zuvor inaktivierte bzw. lebende *E. coli*-Stämme sowie verschiedene *E. coli*-Antigene verabreicht worden. Nach 3 Tagen erfolgte über den Luftsack der Challenge der Küken mit einem homologen (O78) bzw. heterologen (O2 oder O1) *E. coli*-Stamm. Mit Ausnahme eines Antigens (FimH) schützten alle passiven Antikörper zu 90-100 % gegen den homologen Challenge. Gegen den heterologen Challenge schützten lediglich anti-PapG und anti-lutA. Untersuchungen von VANDEMAELE et al. (2005) bestätigen, dass obwohl FimH eine starke Immunantwort induziert, kein Schutzmechanismus gegen die Infektion mit aviären pathogenen *E. coli* ausgebildet wird. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, wobei sich VANDEMAELE et al. (2003) im Hinblick auf die prophylaktische Impfung gegen *E. coli* von einer Vakzine auf der Basis einer PapG Untereinheit einen noch umfassenderen Schutz gegen die Infektion mit aviären pathogenen *E. coli* versprechen.

Wie bereits erwähnt, steht als einzige Vakzine für den Einsatz bei Hühnern derzeit in Deutschland der für Mastelterniere zugelassene Impfstoff Nobilis® *E. coli* inac der Firma Intervet zur Verfügung. Diese inaktivierte, als ölige Emulsion zu verabreichende Subunit-Vakzine wurde von der Fa. Intervet in den Jahren 1985-1995 entwickelt und kommt seither in verschiedenen Ländern bei Hühnern zum Einsatz. Ihre Zusammensetzung basiert auf 100 µg *E. coli*-Fimbrien-Antigen und 100 µg *E. coli*-Flagellar-Toxinantigen pro Dosis (0,5 ml). Hintergrund für die Wahl dieser Antigene als Grundlage für den Impfstoff ist deren Serotyp unabhängige Wirkung. Auf einer ähnlichen Basis wurde damit bereits im Rinder- und Schweinebereich erfolgreich gearbeitet. Gleichzeitig spielen Fimbrienantigene im Pathomechanismus der Kolibakteriose eine essentielle Rolle, indem sie den Bakterien die Anheftung an die unterschiedlichen Zielzellen ermöglichen [F1- und P- (F11) Fimbrien].

Flagellen von *E. coli* scheinen an toxischen Wirkungen gegen Verozellen beteiligt zu sein. Diese Toxine wurden bei den Untersuchungen für diesen Impfstoff bei einer großen Anzahl von *E. coli*-Stämmen gefunden und als so genannte Flagellar-Toxine (FT) bezeichnet. Erstaunlicherweise zeigte das Antiserum gegen diese Flagellar-Toxine (FT) Kreuzreaktivität zu allen anderen in diesem Zusammenhang untersuchten *E. coli*-Isolaten. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden insgesamt 203 verschiedene *E. coli*-Stämme von an Kolibakteriose verendeten Hühnern untersucht. In 93 % der Fälle wurde mindestens eins der beiden Antigene (*E. coli*-Fimbrien-Antigen F11 bzw. Flagellar-Toxine FT) ausgebildet. Damit schützt die Vakzine laut Herstellerangaben gegen 93 % der pathogenen *E. coli*-Isolate, die bei Hühnern nachgewiesen werden (PENNING, 2001).

#### 2.6.2.1.2. Bestandsspezifische Vakzine

Die Richtlinie 90/677/EWG, Art.1.3. definiert bestandsspezifische Impfstoffe als „inaktivierte, immunologische Tierarzneimittel, die auf der Basis von aus einem Tier oder Tieren ein- und desselben Tierbestandes isolierten pathogenen Organismus und Antigenen hergestellt und für die Behandlung dieses Tieres oder dieses Tierbestandes am selben Ort genutzt werden“. Die Herstellung und Abgabe von bestandsspezifischen Impfstoffen ist über den § 17c Abs. 1[2] und § 17d Abs.2 des Tierseuchengesetzes geregelt. Im Rahmen der gesetzlichen Neuorientierung in der Landwirtschaft zeigt sich besonders in der alternativen Tierhaltung die zunehmende Problematik bakterieller Infektionskrankheiten. Dort, wo sich der Einsatz von Pharmazeutika verbietet und/oder keine zugelassenen Impfstoffe zur Verfügung stehen, greift man daher immer öfter auf bestandsspezifische Vakzine zurück (JUNGBÄCK, 2000). Praktisch stellt der Einsatz dieser Impfstoffe die Grundlage für ein spezifisches, problembezogenes, prophylaktisches Instrument im modernen Herdenmanagement dar (BALJER et al., 1993).

Für die Erregercharakterisierung sollten Kot-, Tupfer-, Organ- und/oder Blutproben von akut erkrankten Tieren entnommen werden, um mit hoher Wahrscheinlichkeit die Keime, die ursächlich am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, zu isolieren. Dabei ist die Kenntnis über die Infektionskrankheit wichtig für die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Beprobung und die Art des Probenmaterials um eine effiziente Isolierung und Anzucht des ätiologisch relevanten Erregers zu realisieren. Nach der möglichst exakten Typisierung des jeweiligen infektiösen Agens erfolgt dessen Vermehrung durch Bebrütung von Boullionkulturen bei 37 °C über 24 Stunden, wobei für den Erfolg der Vakzine die Auswahl und Anpassung geeigneter Anzuchtmedien- bzw. bedingungen ausschlaggebend sind, insbesondere im

Hinblick auf die Expression protektiver Antigene. Die Pellets werden gewöhnlich auf Keimdichten zwischen  $10^8$  und  $10^{11}$  KBE/ ml eingestellt.

Über chemische (z.B. Formaldehyd) und/oder physikalische Prozesse (Hitzeinaktivierung im Wasserbad) erfolgt anschließend die Inaktivierung der entstandenen Keimsuspension. Dabei muss die Spezifität des Erregers mit ins Kalkül gezogen werden, um eine ausreichende Abtötung der Keime zu sichern, gleichzeitig jedoch Schäden an protektiven Antigenen zu vermeiden (WIELER und SCHWARZ, 2000). Analog gilt beispielsweise für die Inaktivierung mit Formaldehyd, dass laut dem Europäischen Arzneibuch nur 0, 05 % freien Formalins im Endprodukt verbleiben darf (JUNGBÄCK, 2000).

Nachdem der Vorgang der Inaktivierung abgeschlossen ist, folgen die Zentrifugation und Waschung. Um die immunogene Wirkung der Impfstoffe zu verstärken, werden Mineralölgemische oder Aluminiumhydroxid als Adjuvantien zugesetzt. Abschließend wird eine Sterilitätskontrolle durchgeführt.

Die Abgabe erfolgt unter Bezeichnung der Vakzine mit Registratur des Tierarztes, der Tierart, der Menge und des Datums zum umgehenden Verbrauch (BALJER et al., 1993; JUNGBÄCK, 2000; WIELER und SCHWARZ, 2000).

Durch Gefriertrocknung werden die typisierten Stämme für eventuelle Nachbestellungen konserviert und in der Stammsammlung vorrätig gehalten (BALJER et al., 1993).

Die Wirksamkeitsprüfung, die für kommerzielle Impfstoffe vorgeschrieben ist, greift nicht für bestandsspezifische Vakzine. Es ist überdies schwer für diese Impfstoffe eine objektive Einschätzung des Impferfolges zu erlangen, da dies vornehmlich über die Bestandsgesundheit (Morbidity, Mortalität) eingeschätzt wird, ohne dabei die oft parallel zum Einsatz gekommenen Bekämpfungsmaßnahmen außer Acht zu lassen (WIELER und SCHWARZ, 2000).

Eine mögliche Variante der Wirksamkeitsprüfung ist die bakteriologische Routineuntersuchung, wobei über die Ausscheidungsraten und den Grad der Organbesiedlung sowie den Nachweis spezieller immunologischer Konstanten Aussagen über die Protektivität des Impfstoffes getroffen werden könnten (WIELER und SCHWARZ, 2000).

Der Einsatz bestandsspezifischer Impfstoffe ist ein wichtiges Werkzeug im Rahmen der Prophylaxemaßnahmen in Geflügelbeständen, mit dem flexibel auf die spezifischen Gegebenheiten im Anwenderbestand eingegangen werden kann. So finden Änderungen des Erregerspektrums unmittelbar Berücksichtigung.

Allerdings weisen bestandsspezifische Vakzine im Vergleich zu kommerziell hergestellten Impfstoffen Defizite bei den Wirksamkeits- und Verträglichkeitsprüfungen auf. Die

Anwendung muss daher unter tierärztlicher Kontrolle erfolgen. Ein weiterer Schwachpunkt ist die begrenzte Lagerfähigkeit dieser Impfstoffe.

Abschließend ist jedoch zu bemerken, dass die korrekte Indikationsstellung und konsequente Durchführung der prophylaktischen bestandspezifischen Vakzinierung die Basis für ein optimales Gesundheitsmanagement einer Herde ist (BALJER et al., 1993).