

3. Material und Methoden

3.1. Teil 1 Herstellung eines indirekten enzymgebundenen Immunabsorbtionstests (ELISA) für serologische Untersuchungen

3.1.1. Material

3.1.1.1. Seren

3.1.1.1.1. Positivkontrollseren

Das im Kaninchen hergestellte Antiserum gegen den Serotyp O1 wurde von der Firma Biovac aus Frankreich bezogen.

3.1.1.1.2. Negativkontrollseren

Das Negativserum wurde aus unter SPF Bedingungen gehaltenen, *E. coli*-Antikörper freien Hühnern gewonnenen.

3.1.1.1.3. Andere Seren zur Prüfung der Spezifität des ELISA

Laboreigene sowie kommerzielle monospezifische Hyperimmunseren gegen Geflügelkrankheitserreger

aviäre Viren

Virus der Infektiösen Bronchitis	(IB)
Virus der aviären Influenza	(AI)
Virus der Newcastle Disease	(ND)
Aviäre Pneumoviren	(TRT)
Aviäre Encephalomyelitis	(AE)
Respiratory Enteritic Orphan Virus	(REO)
Fowl Adeno Virus	(FAV)
Virus der Infektiösen Bursitis	(IBD)

aviäre Bakterien

<i>Pasteurella multocida</i>		(PM)
<i>Ornitobacterium rhinotracheale</i>		(ORT)
<i>Escherischia coli</i> O2	Biovac	(<i>E. coli</i>)
<i>Escherischia coli</i> O78:K80	Biovac	(<i>E. coli</i>)
<i>Escherischia coli</i> O78:K80	Sifn	(<i>E. coli</i>)
<i>Mycoplasma meleagridis</i>		(MM)
<i>Mycoplasma synoviae</i>		(MS)
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>		(MG)

3.1.1.2. Medien, Puffer und Geräte zur Durchführung des ELISA

Puffer und Gebrauchslösungen

Carbonat-Bicarbonat-Coating-Puffer:

Natriumbicarbonat	(Na ₂ CO ₃)	1,59 g/l
Natriumhydrogencarbonat	(NaHCO ₃)	2,94 g/l

Die Reagentien in einem Liter Aqua dest. lösen und auf einen ph-Wert von 9,6 einstellen.

Waschpuffer:

Checkkit[®]-ELISA-Waschpuffer (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz); 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

Verdünnungspuffer:

Für die Verdünnung der Serumproben wurde ein kommerzieller Verdünnungspuffer der Firma IDEX benutzt (Probenverdünnungspuffer, IDEX GmbH, Wörrstadt, D).

Für die Verdünnung des Konjugates wurde Checkkit[®]-ELISA-Waschpuffer (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz); 1:10 verdünnt mit Aqua dest. unter Zusatz von 1 % Magermilchpulver verwandt.

Sonstige Reagentien

Konjugat

Als Konjugat diente in Ziegen hergestelltes peroxidasemarkiertes Anti-Chicken IgG, (Anti-Chicken IgG, POD-HPR (AAI 29P), Serotec Ltd., Oxford, UK), sowie Ziegen-Anti-Kaninchen IgG (Anti-Rabbit IgG POD), Serotec Ltd., Oxford, UK).

Substrat

Als chromogen Substrat kam 2,2'-Azino-di (3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure)-ABTS mit H₂O₂ (Checkkit[®]-Chromogen; Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz) zur Anwendung.

Stopplösung

Checkkit[®]-Stopplösung (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz)

ELISA-Platten

Als Antigenträger wurden 96 well Polyvenylchlorid Platten 96 Well (costar[®] # 2595, Cambridge, MA, U.S.A.) verwendet.

3.1.1.3. Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien

Micropipette Reference[®] (Eppendorf, Hamburg, D)

Pipettboy (Integra Bioscience, Chur, Schweiz)

Pipettenspitzen-PLASTIBRAND[®] (BRAND, D)

8-Kanalpipette (Eppendorf, Hamburg, D)

Vorverdünnungsröhrchen (Micronic Tubes ICN Flow Labs, Merckheim, D)

ELISA-Platten: 96 Well (costar[®] # 2595, Cambridge, MA, U.S.A.)

Dropper: Wellfill 5 (Denley Welltech, Krefeld, D)

Verdünnungsgerät: Microlab 500, (Firma Hamilton, Schweiz)

3.1.2. Methoden

3.1.2.1. Herstellung des ELISA Antigens

Durch das Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH wurde ein *E. coli*-Antigen, Stamm 68/01-03 (O1), für die Beschichtung der Platten zur Verfügung gestellt.

In Anlehnung an die von HAFEZ und STING (1999) beschriebene Methode für den ELISA-Nachweis von Antikörpern gegen *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) erfolgte die Herstellung des Antigens sowie die Behandlung der Testplatten.

Die Anzüchtung des *E. coli*-Referenzstammes K 68/01-03 (O1) erfolgte unter aeroben Bedingungen in Tryptose-Phosphat-Bouillon, bei einer Temperatur von 37 °C über 16h im Brutschrank. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und 4080 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in die gleiche Menge PBS resuspendiert. Die Wiederholung des Waschvorganges erfolgte noch zweimal. Das zuletzt verbliebene Bakterien-Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert.

Die entstandene Suspension wurde bei 100 °C für eine Stunde im Wasserbad Hitzeinaktiviert und anschließend bei 12.000 U/min für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als hitzestabiles Antigen für die Plattenbeschichtung verwendet.

Unter Einsatz verschiedener positiver und negativer Seren mit bekannten Extinktionswerten wurde mittels Schachbrettverfahren die Kalibrierung des Antigens zur Bestimmung dessen optimaler Verdünnung vorgenommen.

3.1.2.2. Beschichtung der ELISA-Platten

Entsprechend der Resultate aus den vorangegangenen Kalibrierungsversuchen wurden die Platten wie folgt beschichtet. Die Verdünnung des Antigens wurde mit Coating Puffer vorgenommen. Unter Verwendung des Wellfill 5-Droppers wurde je 100 µl Antigen in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten verbracht und schließlich bei 37 °C offen über Nacht inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Platten viermal mit Waschpuffer gewaschen und danach trocken geschleudert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Platten bei 4 °C in Alu-Folie verpackt.

3.1.2.3. Testdurchführung

Die ELISA-Platten und die benötigten Reagentien wurden zunächst auf Zimmertemperatur erwärmt und die zur Testdurchführung verwendeten ELISA-Platten nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer ausgeschleudert. Anschließend erfolgte eine Vorverdünnung der Serumproben und der Negativ-Kontrolle in Micronic-Tubes auf eine Verdünnung von 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer (IDEX Verdünnungspuffer) mittels Verdünnungsgerät (Microlab 500). Danach wurden 80 µl Verdünnungspuffer in die Kavitäten der Microtiterplatten vorgelegt und anschließend 20 µl vorverdünntes Serum dazugegeben, so dass sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:500 ergab. Eine vorherige Verdünnung des Positiv-Kontrollserums erfolgte nicht.

Die Pipettierung wurde nach folgendem Schema vorgenommen:

- 100 µl negative Kontrolle in je 4 Kavitäten
- 100 µl positive Kontrolle in je 2 Kavitäten
- Zwei Kavitäten pro Platte dienen als Blankkontrolle ohne Zusatz von Serum

Um sie vor Austrocknung zu schützen wurden die Platten abgedeckt und bei 37 °C in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert.

Später erfolgte eine viermalige Waschung mit Waschpuffer (Checkkit®-ELISA-Waschpuffer; 1:10 verdünnt mit Aqua dest.)

Das konzentrierte Konjugat (Goat Anti Chicken IgG POD) für die Serumproben und die Negativkontrolle wurde in einem Verhältnis von 1:5000 mit dem Verdünnungspuffer (Checkkit®-ELISA-Waschpuffer, 1:10 verdünnt mit Aqua dest. unter Zusatz von 1 % Magermilchpulver) verdünnt. Für das Konjugat der kommerziell erworbenen Positivkontrolle (Goat anti Rabbit IgG) erfolgte die Verdünnung mit dem genannten Puffer in einem Verhältnis von 1:3000.

Je 100µl der verdünnten Konjugate wurden in jede belegte Vertiefung der Microtiterplatte gegeben mit anschließender 60-minütiger Inkubation der Platten bei 37 °C in der feuchten Kammer. Daraufhin wurden die Platten viermal mit Waschpuffer gewaschen, nach Zugabe der Substrat-Lösung (Checkkit®-Chromogen; Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz) bei Raumtemperatur 20 Minuten abgedunkelt inkubiert und die Reaktion unter Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Vertiefung gestoppt. Die photometrische Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm, korrigiert bei 490 nm.

3.1.2.4. Interpretation der ELISA-Ergebnisse

Um eine Bewertung der Ergebnisse vornehmen zu können, wurde zunächst der Mittelwert X_n und die Standardabweichung SD der negativen Kontrollen errechnet.

Eine Serumprobe wurde als positiv gewertet, wenn ihr Wert gleich oder höher als der Mittelwert der Negativkontrollen (X_n) plus dem Dreifachen der Standardabweichung war (positiv $\geq X_n + 3 \times SD$).

Um eine Serumprobe fraglich werten zu können, musste deren Wert gleich oder größer als der Mittelwert der negativen Kontrollen (X_n) plus dem Zweifachen der Standardabweichung (fraglich $\geq X_n + 2 \times SD$) und kleiner als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus dem Dreifachen der Standardabweichung sein (fraglich $< X_n + 3 \times SD$).

Eine Serumprobe wurde als negativ eingestuft, wenn deren Wert kleiner als der Mittelwert der negativen Kontrollen (X_n) plus dem Zweifachen der Standardabweichung war (negativ $< X_n + 2 \times SD$).

3.1.2.5. Korrektur der ELISA-Ergebnisse

Um einen Vergleich der Ergebnisse aus den einzelnen ELISA-Platten anstellen zu können, ist es nötig, die Variationen zwischen den Resultaten der unterschiedlichen Platten und Testzeitpunkte zu korrigieren.

Als Grundlage für die vorzunehmende Korrektur wurde der OD-Mittelwert des positiven Referenzserums (XK_{soll}) aus allen zu vergleichenden Platten ermittelt.

Aus den OD-Werten der Ansätze des positiven Referenzserums jeder einzelnen Platte errechnete sich der Mittelwert (XK_{ist}).

Ergaben sich dabei Abweichungen des XK_{ist} vom Wert des XK_{soll} , wurden die Einzelwerte der Probenseren dieser Platte mit einem Korrekturfaktor (F) multipliziert. Dieser Korrekturfaktor ermittelte sich wie folgt : $F = XK_{soll}/XK_{ist}$.

3.1.2.6. Prüfung der Spezifität des selbst hergestellten indirekten ELISA

Um die Spezifität des verwendeten ELISA zu prüfen, wurden insgesamt 16 Hyperimmunseren gegen folgende aviäre Erreger untersucht: Virus der Infektiösen Bronchitis, der Aviären Influenza, der Newcastle Disease, der Infektiösen Bursitis und der Aviären Encephalomyelitis sowie Reo-, ANV- und Adenoviren. Außerdem wurde ein in Puten hergestelltes TRT-Positivkontrollserum, ebenso wie die Erreger *Pasteurella multocida*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma meleagridis*, *-synoviae*, *-gallisepticum* und *Escherischia coli* (O78:K80, O2) geprüft.

Die Seren wurden der üblichen Testmethode unterworfen. Jedes Serum wurde in 4 Ansätzen getestet und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der OD ermittelt.

3.1.2. Reproduzierbarkeit

3.1.3.1. Innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenzen)

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Platte wurde ein positives Serum, ein Serum im Grenzbereich und ein negatives Serum in 16-fachem Ansatz auf verschiedenen Positionen einer Platte untersucht.

Die Seren wurden der üblichen Testdurchführung unterworfen.

3.1.3.2. Zwischen verschiedenen Platten (Interassay-Differenzen)

Um festzustellen, ob die Ergebnisse durch Testansätze auf verschiedenen Platten bzw. an verschiedenen Tagen beeinflusst werden, wurde der ELISA-Test an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Als Testseren wurden zwei *E. coli*-Positivkontrollseren, zwei Negativkontrollseren und zwei Seren im Grenzbereich verwendet.

Für die Testdurchführung wurde Hühner- bzw. Kaninchenkonjugat, Substrat und Stopplösung der selben Charge verwendet.

Jedes Serum wurde im 6-fachen Ansatz mit der üblichen Methode getestet.

Aus den daraus resultierenden Werten des 6-fachen Ansatzes eines Serums wurden pro Testtag der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

3.1.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows in der Version 7.5, wobei die Tests mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ durchgeführt wurden.

3.2. Teil 2 Feldversuch zum prophylaktischen Einsatz verschiedener inaktivierter Impfstoffe gegen *E. coli* bei Legehennen im alternativen Haltungssystem

3.2.1. Material

3.2.1.1. Impfstoffe

Zum Einsatz kamen 3 verschiedene inaktivierte Ölemulsions-Impfstoffe.

3.2.1.1.1. Nobilis® *E.coli* inac

Dieser kommerzielle Impfstoff der Firma Intervet (Fa. Intervet International, Boxmeer, NL) ist für den Einsatz bei Mastelertieren zugelassen. Nach den Angaben des Herstellers handelt es sich dabei um eine Sub-Unit-Vakzine, die Fimbrienantigen (F11) und Flagellartoxin (FT) enterotoxischer *E. coli*-Stämme enthält. Nach den Angaben der Herstellerfirma schützt dieser Impfstoff gegen 93 % der *E. coli*-Isolate, welche bei Ausbrüchen von Kolibakteriosen beim Hühnergeflügel nachgewiesen werden.

Zusammensetzung Nobilis® *E. coli* inac

Eine Dosis (0,5 ml) enthält :

F11-Antigensuspension (100 µg <i>E. coli</i> Fimbrienantigen F11)	68,3 mg
FT -Antigensuspension (100 µg <i>E. coli</i> Flagellartoxinantigen FT)	68,3 mg
Dünnflüssiges Paraffin	214,42 mg
Formalin	0,675 mg

3.2.1.1.2. Bestandsspezifische Impfstoffe

In Ermangelung kommerziell zugelassener Impfstoffe gegen Kolibakteriose zum Einsatz bei Legehennen sollte außerdem die Variante der Impfung mit bestandsspezifischen Vakzinen als mögliche Alternative geprüft werden.

Angewandt wurden zwei, im Lohmann Veterinärlabor hergestellte bestandsspezifische, inaktivierte Impfstoffe. Sie beinhalten drei ausgewählte Stämme der zuvor aus dem Versuchsbestand isolierten *E. coli*-Isolate. Dabei unterschieden sich die Vakzine lediglich in den Keimzahlen, die auf 10^8 bzw. 10^9 KbE/ml eingestellt waren.

Der Impfstoff wurde den Hennen in einer Dosierung von 0,5 ml/Tier s.c. verabreicht.

3.2.1.2. Versuchstiere zur Prüfung der bestandsspezifischen Impfstoffe

Als Versuchstiere wurden 3.610 Lohmann Braun und 3.586 Lohmann Tradition, also insgesamt 7.196 Legehennen-Eintagsküken aus der Brüterei (Horstmann, Stolzenau) eingestallt. Jedes Tier war in der Brüterei durch eine Flügelmarke gekennzeichnet worden.

Im weiteren Verlauf der Aufzucht erhielten alle Tiere die laut Prophylaxeplan vorgegebenen Impfungen (Tabelle 3).

Dem vorgegebenen Produktionsverlauf folgend wurden die Tiere vom ersten Lebenstag bis zur 17. Lebenswoche in der Aufzuchtfarm aufgestellt und danach innerhalb von 3 Tagen in die durch das Produktionszyklogramm festgelegte Legefarm verbracht. Dort verblieben die Tiere bis zur 73. Lebenswoche.

3.2.1.3. Bruteier

Zur Durchführung des Pathogenitätstests im Brutei wurden SPF-Bruteier (VALO-Lohmann Cuxhaven) verwendet.

3.2.1.4. Hilfsmittel, Verbrauchsmaterialien

Mehrwegkanülen (12x10),(Firma Schippers, Kerken, D)

Syring with luer lock (# VS LL Firma LAAT, Veterinary Supplies, NL)

Holder Set at 0,5 ml dose volume (# VH 05 Firma LAAT, Veterinary Supplies, NL)

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (# 0030120.086 Eppendorf, Hamburg, D)

Einmalkanülen (Sterican[®], Braun, Melsungen, D)

Tupfer Bakteriette 169 (EM-TZ-Vertrieb, Hamburg, D)

Hühnerringe

3.2.2. Methoden

3.2.2.1. Auswahl der Stämme zur Herstellung der bestandsspezifischen Vakzine

Vor dem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kamen in dem Legehennenbetrieb bereits bestandsspezifische Impfstoffe bei Tieren, die für die Boden- bzw. Freilandhaltung bestimmt waren, zum Einsatz wobei die Bestimmung der dabei verwendeten *E. coli*-Stämme (Serotypen O2, O45, O46, O78, O83) ausschließlich über die Serotypisierung erfolgte und die Applikation der Impfstoffe einmalig s.c. in der 17. Lebenswoche, während der Umstallung von der Kükenaufzucht in die Legefarmen, vorgenommen wurde.

Seit etwa 2 Jahren traten jedoch zunehmend Ausfälle, verbunden mit Eileiter- und Bauchfellentzündungen, auf. Aus solchen Hennen wurden immer *E. coli* isoliert, ohne dass in der Regel eine weitere Differenzierung erfolgte. Um eventuell eine bestandsspezifische Vakzine mit besserer Wirksamkeit herstellen zu können, wurden aus den anfallenden Verlusten der betroffenen Farmen Tiere bakteriologisch untersucht.

Die aus dem Herzblut (20 Stämme) und Eifollikeln (5 Stämme) isolierten *E. coli* wurden zur weiteren Differenzierung und Virulenzbestimmung mittels PCR an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin übersandt. Anhand der erzielten Ergebnisse dieser weiterführenden Untersuchungen wurden fünf Stämme aufgrund ihrer virulenzassoziierten Gene ausgewählt und als geeignet für die Impfstoffherstellung empfohlen.

3.2.2.2. Nachweis des Virulenzgrades der Isolate an Bruteiern für die Auswahl der Stämme zur Herstellung der bestandsspezifischen Vakzine

In SPF-Bruteiern erfolgte in Anlehnung an die von WOOLEY et al. (2000) beschriebene Methode die Prüfung der Virulenz der fünf ausgewählten *E. coli*-Stämme.

Die Beimpfung der Bruteier wurde am 10. Bebrütungstag in die Allantoishöhle vorgenommen. Die Anzucht der zu untersuchenden *E. coli*-Isolate erfolgte auf Schafblutagar-

platten während einer 24 stündigen aeroben Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurden die gewachsenen Kulturen mit PBS abgewaschen und die so entstandene Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 650 nm auf eine optische Dichte von $A=0,165$ eingestellt. Das entsprach einer Keimzahl von 5×10^7 KbE/ml.

Daraufhin wurde die eingestellte Keimsuspension PBS auf zirka 2500 KbE/ml verdünnt.

Die Beimpfung der Bruteier wurde mit 0,2 ml der verdünnten Suspension vorgenommen. Die Infektionsdosis entsprach daher etwa 500 KbE pro Ei.

Für jeden der zu prüfenden *E. coli*-Stämme wurden 11 Bruteier mit lebenden Embryonen zur Bestimmung der Pathogenität angesetzt. Vor dem Beimpfen wurden abgestorbene oder unbefruchtete Bruteier durch Schieren selektiert. Nach der anschließend vorgenommenen Oberflächendesinfektion der Eischale mit 70 %-igem Alkohol wurde diese unter Zuhilfenahme eines Eilochers behutsam am stumpfen Pol eröffnet. Mittels steriler Einwegspritze und -kanüle konnte danach die Beimpfung der Allantioshöhle erfolgen und die entstandene Öffnung der Eischale mit Holzleim (Ponal, Henkel, Düsseldorf) verschlossen werden. Die Bruteier wurden für weitere 6 Tage bei 37,2 °C inkubiert, wobei sie täglich durchleuchtet und abgestorbene Embryonen aussortiert wurden.

Nach Beendigung der Virulenzprüfung erfolgte die Tötung der überlebenden Embryonen durch Lagerung für 48 Stunden bei 4 °C .

Als Positivkontrollen dienten 2 Isolate der Serotypen O2, die zuvor bereits im Brutei getestet worden waren und sich wegen ihrer hohen Virulenz im Brutei als geeignet erwiesen.

Zur Beurteilung der Virulenz der zu prüfenden *E. coli*-Isolate konnte in Anlehnung an WOOLY et al. (2000) der Embryoletalitäts-Index bestimmt werden. Dieser errechnete sich aus den absoluten Absterberaten und der Embryoletalität über den Beobachtungszeitraum von 6 Tagen. Pro Beobachtungstag wurde dabei die Anzahl der überlebenden Embryonen pro Stamm ermittelt und nach Versuchsabschluß die Summe der Werte aus 6 Tagen kalkuliert. Der aus dieser Berechnung resultierende Wert, ergab den Virulenz-Index für das jeweilige Isolat. (siehe Tabelle 2)

Tabelle 1 Bewertung der Virulenz

Index	Absterberate nach 6 Tagen in %	Virulenzgrad
≤12	<40	schwach virulent
13-44	40-80	mittelgradig virulent
≥45	>80	hochgradig virulent

3.2.2.3. Herstellung der bestandsspezifischen Impfstoffe

Anhand der Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Bestimmung der Virulenz, wurden insgesamt 3 Stämme der O-Gruppe O18 und O1 (Nr. 2537, Nr. 2540, Nr. 2542) zur Impfstoffherstellung ausgewählt. Unter Verwendung dieser Isolate sowie des Freund'schen inkompletten Adjuvans erfolgte die Produktion zweier bestandsspezifischer Impfstoffe im Lohmann Veterinärlabor. Dabei wurden die gesetzlichen Vorgaben des Tierseuchengesetzes (§ 17c Abs. 1[2] und § 17d Abs. 2), welche die Herstellung und Abgabe von bestandsspezifischen Impfstoffen regeln, eingehalten.

Die hergestellten Vakzine unterschieden sich lediglich in der Keimdichte, die zum einen auf 10^8 KbE/ml und zum anderen auf 10^9 KbE/ml eingestellt worden waren.

In einer Dosierung von 0,5 ml/ Tier wurde der Impfstoff den Hennen subkutan verabreicht. Was einer Keimmenge von 5×10^7 bzw. 5×10^8 KbE/Tier entspricht.

3.2.2.4. Versuchsdurchführung

3.2.2.4.1. Allgemeine Versuchsbedingungen

3.2.2.4.1.1. Struktur des Versuchsstandortes

Im Hinblick auf die Haltung von Legehennen kann der Standort, an dem die Versuchsdurchführung stattfand, auf eine beachtliche Historie verweisen.

Bereits im Jahr 1968 wurden hier auf einer Gesamtfläche von 120 ha, ca. 1 Millionen Hühner gehalten und Eier produziert. Zunächst geschah dies in den verschiedenen Käfighaltungssystemen, bis Anfang der 90er Jahre eine Neuorientierung der Verbraucher hin zu alternativen Produkten und damit verbunden eine Umstrukturierung des Eiermarktes absehbar wurde. Seit dem sind gut ein Drittel der Legehennen in Boden- bzw. Freilandhaltung aufgestellt, wobei die einzelnen Geflügelfarmen über Tierplätze in Größenordnungen zwischen 35.000 und 75.000 Legehennen verfügen.

Obwohl alle Farmen einem strengen Hygieneregime unterliegen („all in-all out“) und regelmäßig Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen durchgeführt werden, zeichneten sich bei den alternativen Legefarmen zunehmend erhöhte Mortaliätsraten ab. Dabei stiegen die kumulativen Gesamtverluste der Herden in 72 Lebenswochen oft auf bis zu 40 % der eingestellten Hennen.

Hauptabgangsursachen waren in der überwiegenden Zahl der Fälle Infektionen mit *E. coli*. Einen Lösungsansatz für dieses Problem sah man in der Anwendung von Impfstoffen gegen

E. coli. Da kommerziell keine *E. coli*-Vakzine für Legehennen verfügbar waren, griff man auf bestandsspezifische Impfstoffe zurück, die mit unterschiedlichem Erfolg zum Einsatz kamen. Aufgrund der Struktur und seiner epidemiologischen Voraussetzungen verfügte der Standort somit über ideale Versuchsbedingungen. Zur Prüfung der Wirksamkeit von verschiedenen bestandsspezifischen Impfstoffen im Rahmen dieses Versuches wurde daher eine Farm ausgewählt, in der die Gesamtmortalität der eingestellten Legehennen zwischen 25 und 30 % in 72 Lebenswochen während der beiden vorangegangenen Haltungsperioden lag. Ursache für das Verlustgeschehen waren auch hier überwiegend (ca. 60 %) Infektionen bedingt durch *E. coli*.

3.2.2.4.1.2. Allgemeine Managementparameter

3.2.2.4.1.2.1. Stallsystem Aufzucht

Die Versuchstiere wurden unter nachfolgend aufgeführten Bedingungen im Bodenstall aufgezogen.

Tabelle 2

Tierzahl pro 1/2 Stall	7.000 Tiere	gesamt	
Hallenfläche	12x85 m	1.020 m ²	14,7 Tiere pro m ²
Sitzstangen	4 Sitzreihen rechts a´ 75 m 4 Sitzreihen links a´ 75 m	600 m	
Reuter	25/Halle a´ 14,40m (9x1,60 m) Sitzstangen+Reuter	360 m 960 m	15,6 Tiere pro m
Nippeltränkestrang	3 a´ 85 m	255 m	
Tränknippel	1.114 Nippel/Strang	3.342 Nippel	4,5 Tiere pro Nippel
Cupschalen	3 Stränge a´ 371 Cups	1.113 Cups	
Futtertrog	4 a´85 m (2 Seiten)	680 m	22,1 Tiere pro m
Frischluffklappen		16 Stück	
Ventilatoren		10 Stück	
Beleuchtung/Lampen	3 Stränge a´ 20 Lampen (40 W)	60 Stück	
Lichtband	0,55 m a´ 85 m (2 Seiten)	93,5 m ²	
Gasheizung	2 Stück/Halle	2 Stück	

3.2.2.4.1.2.2. Impfprogramm Aufzucht

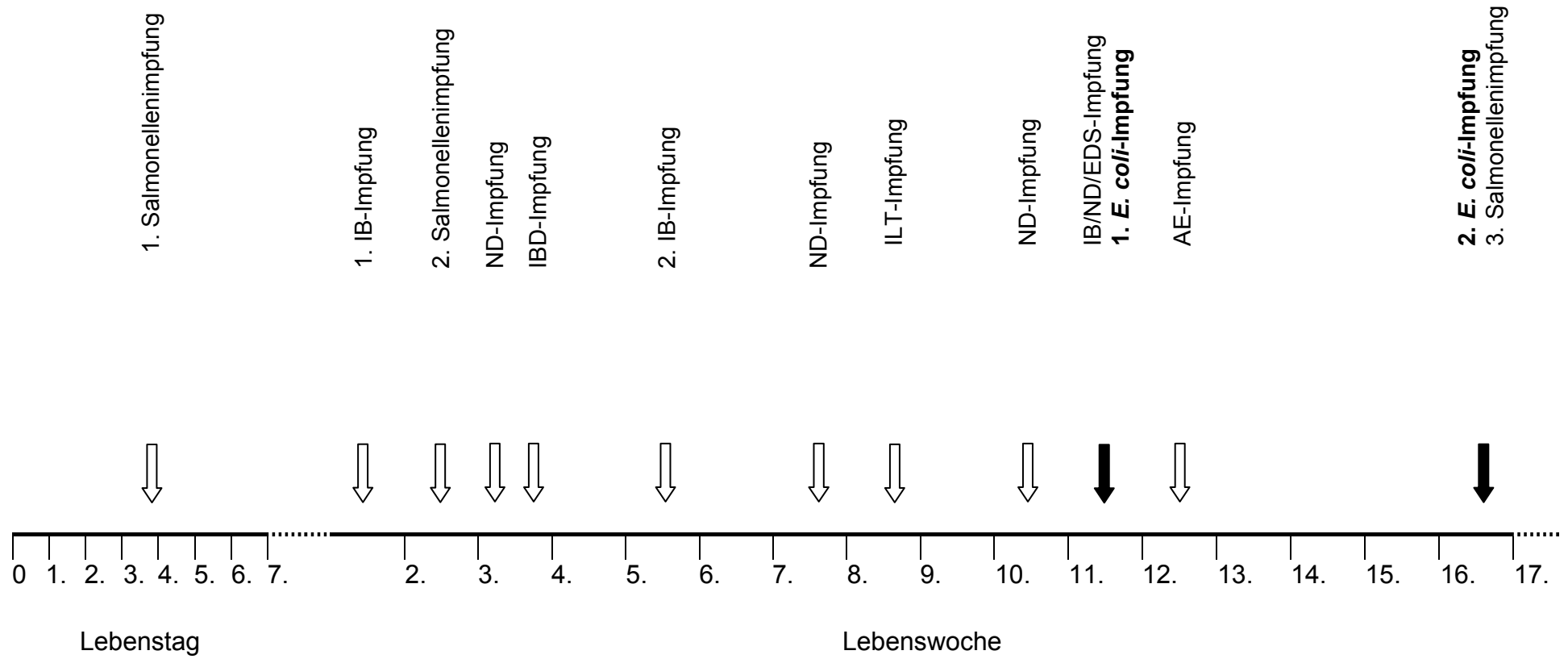
Die Impfungen während der Aufzuchtperiode wurden nach folgendem Schema (Tabelle 3, Abbildung 1) vorgenommen. Für einen möglichst lang anhaltenden Impfschutz der Tiere gegen *E. coli*-Infektionen wurde der Zeitpunkt der zweiten Impfung auf die letzte Aufzuchtwoche terminiert.

Um gleichzeitig einen optimalen Boostereffekt erzielen zu können, der nach Literaturangaben bei 3-6 Wochen zwischen erster und zweiter Impfung erreicht wird, erfolgte die Erstvakzination der Tiere gegen *E. coli* bereits in der 12. Lebenswoche.

Tabelle 3

Alter	Impfung	Impfstoff	Anwendung
4. Tag	1. Salmonellenimpfung	Salmovac SE (IDT)	Trinkwasser
10. Tag	1. IB Impfung	TAD IB vac I (LAH)	Spray
18. Tag	2. Salmonellenimpfung	Salmovac SE (IDT)	Trinkwasser
22. Tag	1. ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
26. Tag	IBD Impfung	TAD Gumboro vac (LAH)	Trinkwasser
6. LW	2. IB Impfung	TAD IB vac II (LAH)	Trinkwasser
8. LW	2. ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
9. LW	ILT Impfung	TAD ILT vac (LAH)	Trinkwasser
11. LW	3. ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
12.LW	IB/ND/EDS-Impfung	Nobilis IB/ND/EDS (Intervet)	sub cutan
12. LW	1. <i>E. coli</i> Impfung	Versuch	sub cutan
13. LW	AE Impfung	TAD AE Vac (LAH)	Trinkwasser
17. LW	2. <i>E. coli</i> Impfung	Versuch	sub cutan
17. Lebenswoche	3. Salmonellenimpfung	Salenvac (Intervet)	sub cutan

Abbildung 1 Zeitschema der im Versuchsbestand durchgeführten Impfungen in der Aufzucht



3.2.2.4.1.2.3. Stallsystem Legehennen

Mit der Umstallung in die Legefarmen wurden die Hennen in das in Tabelle 4 dargestellte Haltungssystem verbracht.

Tabelle 4

Tierzahl / Stall	7.000 Legehennen		
Hallenfläche	12x85 m	1.020 m ²	
Sitzstangen	12x85 m (2 Seiten)	1.020 m	6,8 Tiere pro m
Nippeltränkenstrang	2x85 m (2 Seiten)	170 m	
Tränknippel (5 Nippel pro Meter)	170a´ 5 Nippel	850 Nippel	8,2 Tiere pro Nippel
Futtertrog	2 a´ 85m (2 Seiten)	680 m	10,3 Tiere pro m
Nestfläche	2 Reihen a´(0,35m x 85 m) 2 Seiten	119 m ²	
Scharraum	2,50 m x 85 m (2 Seiten)	425 m ²	
Systemfläche	6 x (1,40 m x 85 m)	714 m ²	
Wintergarten	2 x (3,00 m x 85m)	510 m ²	
Lichtband	0,40 m a´ 85 m (2 Seiten)	68 m ²	
Beleuchtung (Neonröhren)	2 Stränge a´ 12 Lampen (18 W)	24 Stück	
Auslaufluken (zum Wintergarten)	6 rechts, 6 links	12 Stück	

3.1.2.4.1.2.4. Impfprogramm Legeperiode

Die Impfungen während der Legeperiode wurden nach folgendem Schema (Tabelle 5) vorgenommen.

Tabelle 5

Alter	Impfung	Impfstoff	Anwendung
28. LW	IB Impfung	IB vac I (LAH)	Trinkwasser
34. LW	ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
40. LW	IB Impfung	IB vac I (LAH)	Trinkwasser
46. LW	ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
52. LW	IB Impfung	IB vac I (LAH)	Trinkwasser
58. LW	ND Impfung	TAD ND Ia Sota (LAH)	Trinkwasser
64. LW	IB Impfung	IB vac I (LAH)	Trinkwasser

3.2.2.4.2. Versuchsablauf

Insgesamt 7.196 Legehennen-Eintagsküken wurden in die Hälfte einer ca. 1000 m² großen Aufzuchtstalle eingestallt (Tabelle 2). Die Küken wurden in der Brüterei durch Flügelmarken gekennzeichnet. Durch die verschiedenartigen Farben (rot, grün, blau, gelb, braun) konnten so fünf Gruppen unterschieden werden.

Die zweite Hälfte des Stalles wurde mit der selben Anzahl unmarkierter Lohmann Braun Legehennen-Eintagsküken belegt. Die Trennung beider Gruppen erfolgte quer in der Mitte der Halle durch ein engmaschiges Netz.

Als Einstreu diente Stroh. Handelsübliches, dem Alter entsprechendes Futter sowie Tränkwasser stand allen Gruppen gleichermaßen zu Verfügung. Die Aufzucht erfolgte nach den üblichen Management- und Prophylaxeparametern (Tabelle 3). Die Erfassung der Verluste wurde täglich und bei den markierten Tieren unter Berücksichtigung der Farbe sowie Kennnummer vorgenommen.

In der 12. Lebenswoche und vor der Umstallung in den Legehennenstall wurden die Hennen dem Versuchsplan (Tabelle 6) folgend erstmals mit den unterschiedlichen *E. coli*-Vakzinen geimpft. Jedes einzelne Tier erhielt zusätzlich einen Fußring der entsprechenden Farbe als Markierung. Den fünf Versuchsgruppen waren also jeweils ca. 1.400 Hennen zugeordnet. Diese konnten farblich, durch die Kükenmarken bzw. Fußringe voneinander unterschieden werden.

Der Impfstoff wurde in einer Dosierung von 0,5 ml/Tier s.c. verabreicht. Um eine exakte Dosierung der zu verabreichenden Impfstoffmenge sicher stellen zu können, kamen für die Applikation der Vakzine Spritzen zum Einsatz, mit denen ausschließlich eine Dosis von 0,5 ml Impfstoff pro Hub verabreicht werden konnten (Holder Set at 0,5 ml dose volume; # VH 05 Firma LAAT, Veterinary Supplies, NL). Diese Spritzen wurden mit sterilen Kanülen und Einmalvorsätzen (Syring with luer lock; # VS LL Firma LAAT, Veterinary Supplies, NL) versehen, um mögliche Kreuzkontaminationen so gering wie möglich zu halten. Zur Prüfung der Dosiergenauigkeit aller Spritzen wurden vor Beginn der Impfung je vier Pumphübe, also insgesamt 2 ml der Vakzine in ein skaliertes Messröhrchen verbracht. Während der Impfstoffapplikation erfolgte nach je 200 geimpften Tieren ein Wechsel der Mehrwegkanülen.

Um Fehler bei der Versuchsdurchführung zu vermeiden, waren die Impfstoffflaschen während der Applikation unterschiedlich farblich markiert. Ferner trug jede Impfgruppe Mützen der entsprechenden Gruppenfarbe. Für jeden Impfstoff wurde jeweils nur eine, gekennzeichnete Spritze verwendet.

Die zweite Impfung erfolgte während der Umstallung der Junghennen in die Legefarm in der 17. Lebenswoche mit der gleichen Dosis (0,5 ml pro Tier). Hennen die mit einer blauen Kükenmarke bzw. Fußring gekennzeichnet waren, wurden nur einmalig in der 12. Lebenswoche geimpft, die braun markierten Kontrolltiere erhielten keine Impfung. Dem Versuchplan folgend wurden außerdem zu unterschiedlichen Zeitpunkten je 20 Blutproben pro Gruppe entnommen (Tabelle 6).

Tabelle 6 Schematischer Versuchsplan

Gruppen	Gruppe 1 2x <i>E. coli</i> Intervet-Rot	Gruppe 2 2x <i>E. coli</i> LTZ log 9-Grün	Gruppe 3 2x <i>E. coli</i> LTZ log 8-Gelb	Gruppe 4 1x <i>E. coli</i> LTZ log 9-Blau	Gruppe 5 Kontrolle-Braun
Blutentnahme	9. LW	9. LW	9. LW	9. LW	9. LW
Blutentnahme	12.LW	12.LW	12.LW	12.LW	12.LW
1. Impfung	12. LW	12. LW	12. LW	12. LW	ohne
Blutentnahme	14. LW	14. LW	14. LW	14. LW	14. LW
Blutentnahme	16. LW	16. LW	16. LW	16. LW	16. LW
2. Impfung	17. LW	17. LW	17. LW	ohne	ohne
Impfstoff	Nobilis <i>E.coli</i> (Fa. Intervet)	bestands- spezifisch 10 ⁹ KbE/ ml	bestands- spezifisch 10 ⁸ KbE/ ml	bestands- spezifisch 10 ⁹ KbE/ ml	Kontrolle
Impfdosis in ml pro Tier	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Blutproben während der Legeperiode in den Lebenswochen	19, 25, 30, 35, 39, 44, 46, 50, 56, 60, 64, 69, 73				

3.2.2.5. Untersuchungen, Beprobung und Datenerfassung

3.2.2.5.1. Klinische Untersuchungen

Die klinischen Untersuchungen des Wirtschaftsgeflügels nach JACKSCH und GLAWISCHNIG (1990) und SIEGMANN (1993) beinhalten überwiegend die Beobachtung der gesamten Gruppe, um Unruhe und Stress zu vermeiden.

Während der gesamten Aufzucht- und Legeperiode wurden die Tiere wöchentlich im Hinblick auf ihr Verhalten und den allgemeinen Gesundheitszustand begutachtet.

3.2.2.5.2. Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Während der Aufzucht wurden bei erhöhten Abgängen stichprobenweise verendete Tiere zur pathologisch-anatomischen Beurteilung entnommen. Nach der Umstallung wurde dem festgelegten Versuchsplan folgend einmal im Monat die Sektion verendeter Tiere vor Ort vorgenommen. Bei der Beurteilung der Tiere wurden sowohl der Allgemeinzustand der Hennen als auch alle Veränderungen an den einzelnen Organen mit berücksichtigt.

Ausgehend von dem häufig zu erwartenden Sektionsbild bei *E. coli* Infektionen war ein Untersuchungsprotokoll vorbereitet worden, unter dessen Zuhilfenahme die Ergebnisse unmittelbar dokumentiert werden konnten.

Abbildung 2 Schematische Darstellung des Sektionsprotokolls

Datum		Bereich :		
Farbe		Halle :		
Marken-Nr.				
Allgemeinzustand				
Verletzungen/ Technopathien	Nein	Ja	Wo	
Path-Anat. US	EEBE*			
	Polyserositis			
	Pericarditis			
	Perihepatitis			
Sonstige Befunde				
(EEBE*- Eierstocks-Eileiter-Bauchfellentzündung)				

3.2.2.5.3. Bakteriologische Untersuchungen und Probenahmen

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchungen wurden über sterile Medientupfer (Tupfer Bakteriette 169; EM-TZ-Vertrieb, Hamburg, D) Proben von Herz und Leber entnommen und zur weiteren Untersuchung auf Blut- und Gassner-Agar (Oxoid, Wesel) ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Konnte bei der bakteriologischen Untersuchung *E. coli* isoliert werden, erfolgte im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin eine Bestimmung der virulenzassoziierten Gene mittels PCR.

3.2.2.5.4. Serologische Untersuchungen und Beprobung

Für die serologischen Untersuchungen erfolgte die Blutprobenahme während der Aufzucht und über den Gesamtzeitraum der Legeperiode (Tabelle 6). Regelmäßig wurden dabei 2 ml Blut von je 20 Tieren einer Gruppe mit einer sterilen Einmalkanüle aus der Flügelvene entnommen. Das anschließend gewonnene Serum wurde bei -18 °C eingefroren und bis zur weiteren Untersuchung mittels selbst hergestellten indirekten ELISA aufbewahrt (siehe Pkt. 3.1.).

3.3. Teil 3 Belastungsversuch von gegen *E. coli* geimpften Legehennen durch eine tracheale Infektion

3.3.1. Material

3.3.1.1. Versuchstiere

Für den Challengeversuch wurden je 50 Hennen einer Gruppe, also insgesamt 250 Tiere im Alter von 73 Lebenswochen aus der Versuchsherde in der Legefarm entnommen. Alle Tiere waren dem Versuchsplan entsprechend geimpft und markiert. Die ausgewählten Tiere waren klinisch gesund, ihr Allgemeinbefinden und der Ernährungszustand ohne Besonderheiten.

Nach der Verladung wurden die Hennen unverzüglich an den Standort des Belastungsversuches, Bestand Gerdts (Altenbruch), verbracht, wo sie bis zum Versuchsbeginn in Bodenhaltung aufgestellt verblieben. Als Einstreu diente Stroh, Futter und Wasser waren den Tieren uneingeschränkt zugänglich.

3.3.1.2. Belastungsstämmе

3.3.1.2.1. Auswahl der Belastungsstämmе

Als Challenge-Stamm wurde ein in der bestandsspezifischen Vakzine verwendeter O1 Stamm (Nr. 2542) eingesetzt, der sich durch seine hohe Virulenz im Brutei auszeichnete.

3.3.2. Methoden

3.3.2.1. Vorbereitung der Belastungsstämmе

In Vorbereitung des Belastungsversuches wurde der Keim von einer Blutplatte in 9 ml Tryptosephosphat-Bouillon angeimpft und über Nacht bei 37 °C aerob bebrütet. Die weitere Kultivierung erfolgte in 300 ml Tryptosephosphat-Bouillon auf dem Magnetrührer. Nach 5 Stunden betrug die OD 600 nm (0,984). Anschließend wurde die so entstandene Keimsuspension unverdünnt, bzw. 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt, auf Eis gelagert und für den Versuch bereitgestellt. Die Keimzahlbestimmung im Spatelverfahren auf PC-Platten ergab $1,4 \times 10^9$ /ml. Für den Belastungsversuch wurde die Keimdichte Literaturangaben folgend, auf 5×10^7 KbE bzw. 5×10^8 KbE pro 0,5 ml eingestellt (HELLER et al., 1990; MELAMED et al., 1991; ROLAND et al., 2004).

3.3.2.2. Versuchsdurchführung

Von den 250 aus der Legefarm für den Belastungsversuch entnommenen Hennen konnten je 50 Tiere einer Gruppenfarbe zugeordnet werden (rot, grün, gelb, blau, braun). Pro Markierungsfarbe wurden zunächst 2 Gruppen zu je 25 Tieren eingeteilt, wobei in zwei Gruppen ein Tier fehlte. Pro Markierungsfarbe waren somit zwei, also insgesamt 10 Gruppen, vorhanden.

Anschließend erfolgte die Infektion der Tiere. Jedes Tier bekam dabei 0.5 ml der keimhaltigen Tryptosephosphat-Bouillon intratracheal verabreicht. Je eine Gruppe einer Farbe erhielt die Belastungsdosis von 10^7 KbE pro Tier in 0,5 ml, die andere Gruppe dieser Farbe 0,5 ml 10^8 KbE pro Tier.

Die Beobachtung der belasteten Tiere sowie die Dokumentation deren Mortalität zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 5 Tagen solange, bis kein Tier mehr verendete.

Während der Versuchsdurchführung wurden zweimal Tiere für weiterführende Untersuchungen entnommen und damit pro Gruppe je ein verendetes Tier 17 bzw. 41 Stunden nach Versuchsbeginn zerlegt sowie die Herzen auf Blut- und Gassner-Agar ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Konnte bei der bakteriologischen Untersuchung *E. coli* isoliert werden, erfolgte stichprobenartig eine Serotypisierung der Stämme.

Zur Ihrer weiteren Differenzierung wurden die isolierten *E. coli*-Stämme, ebenso wie der Belastungsstamm, an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin übersandt.