

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion zu Teil 1**

#### 5.1.1. Herstellung eines indirekten enzymgebundenen Immunoabsorbtionstests (ELISA) für serologische Untersuchungen

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. coli* stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Bisher wurde sowohl mit dem indirekten Hämagglutinationstest, als auch mit verschiedenen ELISA-Systemen gearbeitet (LEITNER et al., 1990; RUBLE et al., 2001; KARIYAWASAM et al., 2002).

Nach wie vor stellt der ELISA beim Geflügel ein wichtiges Instrument in der Routinediagnostik dar, welches sich durch seine hohe Sensitivität, Spezifität und gute Reproduzierbarkeit auszeichnet. Da die Methode zusätzlich verhältnismäßig einfach und gleichzeitig preisgünstig ist, hat das Diagnostikum ELISA eine weite Verbreitung gefunden (HAFEZ, 1994).

Das *E. coli*-ELISA-Antigen der vorliegenden Untersuchung wurde auf Basis des *E. coli*-Referenzstammes K68/01-03 (O1) aus Reinkulturen als hitzestabiles Antigen hergestellt, im Unterschied zu LEITNER et al. (1990), die in ihrer Arbeit die Serotypen O2:K1 bzw. O78:K80 als Ultraschall inaktivierte Antigene verwendeten.

Um die Testseren als positiv oder negativ bewerten zu können, war die Festlegung eines Grenzwertes (Cut off) notwendig. In Anlehnung an die Arbeit von HAFEZ und STING (1999) wurde dies bei den vorliegenden Untersuchungen durch die Bildung des Mittelwertes der OD-Werte der negativen Kontrollseren, zu dem die 2- bzw. 3-fache Standardabweichung addiert wurde, ermittelt (siehe Abschnitt 3.3.2.4.).

Die Spezifität des selbst hergestellten ELISA wurde durch die Untersuchung von 16 Hyperimmunseren gegen verschiedene pathogene aviäre Erreger einschließlich verschiedener *E. coli*-Serotypen (O2 Biovac, O78:K80 Biovac, Frankreich; O78:K80 Sifin, Deutschland) geprüft. Das Kontrollserum der O-Gruppe O2 der Firma Biovac (Frankreich) zeigte Reaktionen im leicht positiven Bereich die anderen beiden Seren waren negativ. Eine Kreuzreaktion mit den übrigen Seren konnte nicht nachgewiesen werden

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse des enzymgebundenen Immunoabsorbtionstests (ELISA) innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenz) und zwischen verschiedenen Platten an aufeinander folgenden Tagen (Interassay-Differenz) überprüft. Die vorgenommene Varianzanalyse ergab dabei keine signifikanten Unterschiede. Um die Schwankungen der OD-Werte positiver Seren auf den

verschiedenen Platten unter gleichen Versuchsbedingungen ausgleichen und die Werte der Platten untereinander vergleichen zu können, musste anhand eines positiven Referenzserums die Korrektur der Testergebnisse erfolgen.

Dem Versuchsplan folgend wurden von den Hennen vor und nach den Impfungen bzw. einmal monatlich während der Legeperiode je 20 Blutproben zur späteren serologischen Untersuchung entnommen. Mit Hilfe des zuvor hergestellten enzymgebundenen Immunoabsorbtionstests (ELISA) erfolgte die serologische Verlaufsuntersuchung der gewonnenen Seren. Insgesamt wurden 1445 Serumproben in die Untersuchung mit einbezogen. Das entspricht je 17 Proben pro Versuchsgruppe und Entnahmezeitpunkt. Ähnlich wie in der Literatur beschrieben (LEITNER et al., 1990), stiegen die Antikörper-Titer innerhalb von 14 Tagen nach der 1. Impfung im Alter von 12 Lebenswochen stetig an. Allerdings konnte nicht nur in den geimpften Versuchsgruppen sondern auch in der ungeimpften Kontrollgruppe eine Erhöhung der Werte beobachtet werden. Dabei war in den Gruppen 1 (2x *E. coli* Intervet-Rot), 2 (2x *E. coli* LTZ log 9-Grün) und 3 (2x *E. coli* LTZ log 8-Gelb) ein weiterer Anstieg der Antikörper-Titer bis zur 16. Lebenswoche und bei der einmalig vakzinierten Gruppe 4 (1x *E. coli* LTZ log9-Blau) ein Anstieg der Antikörper bis zur 19. Lebenswoche festzustellen. Im Gegensatz dazu erhöhten sich die Titer-Werte der ungeimpften Kontrollgruppe nur noch unwesentlich. Möglicherweise ist der zusätzliche Stress der Tiere während der Impfung (Handling) dafür verantwortlich zu machen. Ein signifikanter Unterschied im Anstieg der Titer ist dabei nur zwischen der Gruppe 2 (2x *E. coli* LTZ log 9-Grün) und der ungeimpften Kontrollgruppe im Zeitraum zwischen der 12. und 16. Lebenswoche auszumachen. Im Ergebnis der serologischen Verlaufsuntersuchungen fielen die OD-Werte aller Versuchsgruppen übereinstimmend ab. Über den gesamten Versuchszeitraum blieben die Kontrollgruppe (Braun) und die Gruppe 4 (1x *E. coli* LTZ log 9-Blau), mit Ausnahme von einer Messung (Lebenswoche 30), durchgehend im negativen Bereich. Bei allen übrigen, zweifach vakzinierten Versuchsgruppen konnten abwechselnd negative Werte bzw. Werte im Grenzbereich eruiert werden. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Im Vergleich zu allen bisherigen Angaben aus der Literatur liefern die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des ELISA vorgenommenen Untersuchungen nicht nur zeitlich begrenzte Daten über den Verlauf der Blutserumtiter vor bzw. nach einer Vakzination gegen *E. coli*, sondern über den gesamten Versuchszeitraum bis zur 73. Lebenswoche. Zusätzlich war es mittels der gewonnenen Daten möglich, die Entwicklung des Antikörperspiegels in den verschiedenen geimpften Versuchsgruppen und der ungeimpften Kontrollgruppe nach einem Challenge mit aviären pathogenen *E. coli* unter Praxisbedingen zu verfolgen.

Betrachtet man den Verlauf der Blutserumtiter unter Berücksichtigung der Verlaufskurve der Mortalität in der Legephase so fällt auf, dass der gemessene Antikörperspiegel beginnend

mit der 19.-20. Lebenswoche stetig abfällt und in der 50. Lebenswoche seinen niedrigsten gemessenen Wert in der Legeperiode aufweist. Die Mortalitätskurve der Legephase bleibt bis zur 52. Lebenswoche auf vergleichsweise geringem Niveau, bevor sie nachfolgend weiter ansteigt. Zur gleichen Zeit ist ebenfalls ein erneuter Anstieg des Antikörpertiters bei den geimpften Versuchstieren zu verzeichnen. Möglicherweise bestätigt dies Untersuchungen von MELAMED et al. (1991), wonach eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Antikörperspiegels und dem Schutz gegen *E. coli*-Infektionen besteht. Gleichzeitig lässt das die Vermutung zu, mögliche Boostereffekte von Feldinfektionen mit *E. coli* bei zuvor gegen *E. coli* vakzinierten Tieren mit Hilfe des etablierten ELISA detektieren zu können. Eine weitere Impfung beispielsweise in der 40. Lebenswoche könnte über einen zusätzlichen Boostereffekt den Anstieg des Antikörperspiegels und damit gegebenenfalls den Schutz gegen *E. coli*-Infektionen erhöhen, hat allerdings aus praktischer Sicht lediglich für den Einzelfall Relevanz.

Es bleibt jedoch zu bemerken, dass durch die erzielten Ergebnisse der Nachweis von Antikörpern gegen *E. coli* mittels ELISA als geeignetes Verfahren zur Kontrolle einer erfolgreich durchgeführten Applikation von *E. coli*-Vakzinen angesehen werden kann. Aussagen zur Bewertung der Belastbarkeit des Impfschutzes nach ein- bzw. zweimaliger Applikation eines *E. coli*-Adsorbat-Impfstoffes anhand der Antikörperspiegels können im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht getroffen werden, da die gemessenen Antikörperspiegel zum Zeitpunkt des durchgeführten Belastungstests bereits im negativen Bereich lagen. Inwieweit die Höhe der Antikörpertiter mit der Belastbarkeit des Impfschutzes korreliert, muss in nachfolgenden Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt nach der Impfung, geklärt werden.

## **5.2. Diskussion zu Teil 2**

### **5.2.1. *E. coli*-Isolate zur Herstellung der bestandsspezifischen Vakzine und Bestimmung des Virulenzgrades der *E. coli*-Isolate im Brutei**

Die Verschiebung der konventionellen Haltung von Legehennen in Käfigen hin zu alternativen Haltungsformen im Zuge der politischen Neuorientierung sowie die damit verbundene Infektions- und Reinfektionsproblematik dieser Haltungsformen gewinnt zunehmend an Bedeutung (NEUMANN et al., 2002; CONRATHS et al., 2005). Als eine der Hauptabgangsursachen, die jährlich große wirtschaftliche Verluste verursacht, steht dabei die Infektion mit *E. coli* im Vordergrund (BARNES und GROSS, 1997; ROSARIO et al., 2004). Ein therapeutisches Eingreifen ist jedoch nur begrenzt möglich. Im Fokus der Bemühungen zur Beherrschung dieser Problematik steht daher die Prophylaxe, für die ein

optimales Haltungs- und umfangreiches Hygienemanagement Voraussetzung sind. Insbesondere haben dabei die Lüftungs-, Fütterungs- und Tränkhgiene sowie die Reinigung und Desinfektion einen hohen Stellenwert. Zusätzliche, flankierende Maßnahmen finden beispielsweise in Form von Impfungen Anwendung.

Vor dem Hintergrund, dass für Legehennen derzeit in Deutschland keine kommerzielle *E. coli*-Vakzine verfügbar ist, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Erkenntnisse zum Einsatz verschiedener inaktivierter bestandsspezifischer *E. coli*-Vakzine bei Legehennen im alternativen Haltungssystem unter Feldbedingungen beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls ein für Mastelertiere zugelassener *E. coli*-Impfstoff der Firma Intervet (Nobilis® *E.coli* inac) zum Vergleich mit in die Betrachtungen einbezogen.

*E. coli* ist ein normaler Bestandteil der Mikroflora im Intestinaltrakt des Geflügels. Dort sowie im oberen Respirationstrakt können sowohl nicht pathogene als auch pathogene aviäre *E. coli*-Stämme (APEC) nachgewiesen werden (WILLINGER, 1992). Auch infolge von Immunsuppression, primär stattgefundenen viralen oder bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes führen pathogene *E. coli*-Stämme zu schweren Krankheitsbildern aus dem Symptomkomplex der Kolibakteriose. Verschiedene spezifische virulenzassoziierte Faktoren spielen dabei eine Rolle (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999).

Den Literaturangaben folgend gehören die häufigsten im Zusammenhang mit *E. coli* beim Geflügel isolierten aviären pathogenen *E. coli*-Stämme überwiegend den O-Gruppen O1, O2, und O78 an (ROSARIO et al., 2004). Die Serotypisierung beschreibt dabei ein weit verbreitetes Diagnostikum zur Typisierung von *E. coli*-Stämmen. Die Bestimmung der Serogruppe lässt jedoch nicht gleichzeitig auf die Virulenz des *E. coli*-Stammes schließen. Eine Identifizierung aviärer pathogener *E. coli*-Isolate ist somit erst nach deren genotypischer Untersuchung möglich (JANSSEN et al., 2001; JANSSEN, 2002; DELICATO et al, 2003; EWERS et al., 2004)

Die für die bestandsspezifischen Impfstoffe verwendeten Stämme waren im vorliegenden Versuch zuvor aus an Kolibakteriose erkrankten Legehennen isoliert worden. Um eine bestandsspezifische Vakzine mit höchst möglicher Wirkung herstellen zu können, wurde unter Berücksichtigung der nachgewiesenen virulenzassoziierten Faktoren eine Vorauswahl unter 25 isolierten *E. coli*-Stämmen getroffen. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurden daraufhin 5 dieser *E. coli*-Isolate für die Impfstoffherstellung empfohlen.

Bei der Charakterisierung der für die Impfstoffherstellung zur Auswahl stehenden *E. coli*-Isolate erfolgte die Bestimmung der virulenzassoziierten Gene mittels PCR. Die *E. coli*-Stämme wurden auf sieben dieser Gene untersucht. Es handelte sich dabei um *astA*, *irp2*, *fyua*, *iucD*, *tsh*, *fimC* und *papC*, wobei in allen 5 *E. coli*-Stämmen die virulenzassoziierten Gene *iucD* und *tsh*, in 4 *E. coli*-Isolaten *fimC*, *fyuA* und *irp2*, 3 mal *papC* und in 2 Fällen *astA* nachgewiesen werden konnten.

Die Wirkungsweise des für das enteroaggregative hitzestabile Toxin (EAST-1) kodierenden *astA* in der Pathogenese der Kolibakteriose ist bis dato noch weitestgehend ungeklärt. Es wurde bisher vornehmlich bei darmpathogenen *E. coli*-Isolaten nachgewiesen und hat möglicherweise einen schädigenden Einfluss auf Stoffwechselfvorgänge der Zelle (YAMAMOTO und ECHEVERRIA, 1996; PARREIRA and YANO, 1998).

Eisen hat für das Wachstum und die Vermehrung der *E. coli*, genauso wie für viele andere Mikroorganismen, einen hohen Stellenwert. Weil die Konzentration von frei verfügbarem Eisen in den Körperflüssigkeiten den Bedarf der Bakterien nicht deckt, synthetisieren *E. coli* so genannte Siderophore. Aerobactin ist eine Siderophore vom Hydroxamat-Typ (BAGG et al., 1987, RATLEDGE et al., 2000). In den für die Impfstoffherstellung zu prüfenden 5 *E. coli*-Stämmen wurden in diesem Zusammenhang drei virulenzassoziierte Gene (*iucD*, *irp2* und *fyuA*) nachgewiesen, wobei *iucD* für ein Enzym aus der Synthesekette von Aerobactin kodiert, *irp2* und *fyuA* eisenregulative Proteine für die Siderophore Yersiniabactin sind, die ebenso wie Aerobactin eine Rolle bei *E. coli*-Septikämien spielen könnte. Untersuchungen von LI et al. (2005) bestätigen die Bedeutung der Eisen-aquirierenden Systeme im Zusammenhang mit der Pathogenität von aviären pathogenen *E. coli*.

Aviäre pathogene *E. coli*, bei denen das Temperatur-sensitive-Hämagglutinin (*tsh*) nachgewiesen wird, scheinen im Pathomechanismus der Kolibakteriose eine große Relevanz zu haben. Sie gelten als Indiz für die Virulenz dieser Stämme, die überwiegend im Zusammenhang mit an *E. coli* verendeten Tieren isoliert werden (MAURER et al., 1998; DOZOIS et al., 2000; VANDEKERCHOVE et al., 2005; ZHAO et al., 2005).

Die beiden virulenzassoziierten Gene *fimC* und *papC* kodieren für F1- bzw. P-Fimbrien. Fimbrien sind faserartige Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien. Die F1-Fimbrien, die beim Geflügel insbesondere im Respirationstrakt (Trachea, Lunge, Luftsack) exprimiert werden, ermöglichen den aviären pathogenen *E. coli* dort die Anheftung an die Epithelzellen (DOZOIS et al., 1995; VIDOTTO et al., 1997).

Durch die Ausbildung von P-Fimbrien sind die APEC in der Lage sowohl den Luftsack und die Lunge als auch innere Organe (Leber, Herz, Nieren) zu kolonisieren, nicht jedoch das Gewebe von Trachea oder Pharynx (VAN DEN BOSCH et al., 1993; DOZOIS et al., 1994).

Im Rahmen der bakteriellen Persistenz und der Resistenz gegenüber Phagozytose scheinen F1- und P-Fimbrien wichtige virulenzassoziierte Faktoren im späteren Infektionsverlauf der Kolibakteriose zu sein, für die initiale Besiedlung des oberen Respirationstraktes spielen sie jedoch keine Rolle (POURBAKHS et al., 1997a,b; MELLATA et al., 2003a, b).

Um den Grad der Virulenz der zu prüfenden *E. coli*-Isolate unabhängig von ihren mittels PCR bestimmten virulenzassoziierten Genen ermitteln zu können, wurde zusätzlich ein Virulenzstest im embryonierten Hühnerei basierend auf den Untersuchungen von WOOLEY et al., (2000) vorgenommen. Der hier gewählte Infektionsweg via Allantoishöhle ermöglicht im Gegensatz zu der über den Dottersack initiierten Infektion eine Unterscheidung zwischen

den verschiedenen Virulenzstufen zu testender Isolate. Alle fünf geprüften *E. coli*-Stämme waren als virulent einzustufen, wobei ein Stamm starke, die übrigen vier eine mittelgradige Virulenz zeigten.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Charakterisierungsmethoden im Hinblick auf die Virulenz der zu prüfenden *E.-coli*-Isolate wurden insgesamt 3 Stämme als für die Impfstoffherstellung geeignet ausgewählt. Davon 2 Isolate der O-Gruppe O1, die als mittelgradig bzw. hoch virulent eingestuft worden waren. Das mittelgradig virulente Isolat besaß alle und der im Virulenztest als hoch virulent bewertete Stamm sechs der sieben mittels PCR untersuchten virulenzassoziierten Gene (*irp-2*, *fyua*, *iucD*, *tsh*, *fimC*, *papC*).

Ein drittes, mittelgradig virulentes *E. coli*-Isolat der O-Gruppe O18, welches jedoch über fünf virulenzassoziierte Gene verfügte (*ast A*, *irp-2*, *fyua*, *iucD*, *tsh*), wurde außerdem als für die Impfstoffherstellung geeignet bewertet.

Im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven wurden 2 bestandsspezifische Vakzine hergestellt. Jede der beiden enthielt alle 3 ausgewählten *E. coli*-Isolate. Sie unterschieden sich lediglich in ihrer Keimzahl die auf  $10^8$  bzw.  $10^9$  Kolonie-bildende Einheiten (KbE) pro ml eingestellt waren. Laut Literaturangaben kommen *E. coli*-Vakzine oft in Keimzahlen von  $1 \times 10^8$  und  $2 \times 10^8$  sowie  $1 \times 10^9$  und  $2 \times 10^9$  zum Einsatz (CLOUD et al., 1985; ARP et al., 1980; HELLER et al., 1994; FROMMER et al., 1994; CHAFFER et al., 1997; KARIYAWASAM et al., 2003).

Als dritte Vakzine wurde der Impfstoff Nobilis® *E. coli* inac mit in den Versuch einbezogen. Diese für Mastelterniere zugelassene Vakzine kann jedoch auch mit der entsprechenden Ausnahmegenehmigung bei Legehennen zum Einsatz kommen. Der Impfstoff basiert auf *E. coli*-Fimbrien-Antigen und *E. coli*-Flagellar-Toxinantigen. Sie bilden die Grundlage für dessen Serotyp-unabhängige Wirkung. Ausgehend von der Tatsache, dass Infektionen mit *E. coli* seit Jahrzehnten große wirtschaftliche Verluste in der Geflügelproduktion verursachen, wurde die Herstellung und der Einsatz von *E. coli*-Impfstoffen für das Geflügel mit den verschiedensten Ansätzen für deren Einsatz vielfach geprüft und beschrieben. In der Literatur finden sich dazu Ausführungen verschiedener Autoren. So beschrieben DEB und HARRY (1976, 1987) den erfolgreichen Einsatz einer Formalin-inaktivierten *E. coli*-Vakzine bei Hühnern und Puten. Andere Untersuchungen (ARP et al., 1980; ROSENBERG et al., 1985, HELLER et al., 1990, MELAMED et al., 1991, CHAFFER et al., 1997) bestätigen dies auf Basis unterschiedlicher *E. coli*-Vakzine. KWAGA et al. (1994) und AMOAKO et al. (2004) berichten über vielversprechende Erfolge mit einer *E. coli*-Lebendvakzine und KARIYAWASAM et al. (2003) applizierten eine *E. coli*-Vakzine via Sprayverfahren. Aktuelle Untersuchungen berichten über die Entwicklung eines *E. coli*-Impfstoffes für Hühner auf Basis eines attenuierten *Salmonella Typhimurium*-Stammes, der gleichzeitig *E. coli*-Antigene ausbildet (KENNETH et al., 2004).

In der verfügbaren Literatur beziehen sich die bisherigen Untersuchungen zum Einsatz von *E. coli*-Vakzinen bei Legehennen allerdings ausschließlich auf experimentelle Versuchsansätze, die lediglich Aussagen zum Schutz der Tiere nach einem direkten Challenge im Anschluss an die *E. coli*-Impfung bzw. zum Infektionsschutz der Nachkommenschaft zulassen. In dem vorliegenden Versuchsansatz galt es verschiedene *E. coli*-Inaktivat-Vakzinen auf ihre Wirksamkeit unter Praxisbedingungen genauer zu überprüfen. Dazu wurden verschiedene Parameter wie die Mortalität, pathologisch-anatomische Veränderungen in verendeten Tieren und die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen über einen Zeitraum von 73 Lebenswochen mit in die Betrachtungen einbezogen.

In diesem Zusammenhang sollte gleichzeitig ein schnelles, unkompliziertes und praxistaugliches diagnostisches Verfahren zur Kontrolle des Impferfolges, der Dauer eines möglichen Impfschutzes, sowie der eventuellen Erkennung klinisch inapparenter *E. coli*-Infektionen über Serumtitel in Form eines enzymgebundenen Immunoabsorbtionstestes (ELISA) für serologische Untersuchungen etabliert werden.

#### 5.2.2. Aufzucht der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden als Küken in der Brüterei durch Flügelmarken gekennzeichnet. Durch die verschiedenartigen Farben (rot, grün, blau, gelb, braun) konnten so, mit Blick auf den späteren Versuchsablauf, fünf Gruppen unterschieden werden. Diese Gruppen wurden entsprechend des Impfprogrammes je nach Impfmodus mit den verschiedenen *E. coli*-Vakzinen in **Gruppe 1** (2x *E. coli* Intervet-**Rot**: Impfung mit Nobilis® *E. coli* inac in der 12. und 17. Lebenswoche), **Gruppe 2** (2x *E. coli* LTZ log 9-**Grün**: Impfung mit bestandsspezifischem Impfstoff,  $10^9$  KBE/ml, LTZ, in der 12. und 17. Lebenswoche), **Gruppe 3** (2x *E. coli* LTZ log 8-**Gelb**: Impfung mit bestandsspezifischem Impfstoff,  $10^8$  KBE/ml, LTZ, in der 12. und 17. Lebenswoche), **Gruppe 4** (1x *E. coli* LTZ log 9-**Blau** Impfung mit bestandsspezifischem Impfstoff,  $10^9$  KBE/ml, LTZ, in der 12. Lebenswoche) und die ungeimpfte **Gruppe 5** (Kontrolle-**Braun**) unterteilt.

Tierverluste in der Aufzucht entwickeln sich in Abhängigkeit von verschiedenen, nicht ausschließlich auf das Aufzuchtmanagement zurückzuführenden Faktoren, wie beispielsweise der Qualität des Managements in der Brüterei und der Bruteier sowie dem Alter bzw. dem Gesundheitsstatus der Elterntiere. In der Regel klingen sie bis zum 10. Lebensstag ab. Grundsätzlich wird während der Aufzuchtphase von einer Mortalität zwischen 2-3 % ausgegangen (Vorgaben aus dem Legehennen Managementprogramm Lohmann-Brown-Classic). In allen vier Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe waren die Mortalitätsraten in der Aufzucht bei Werten zwischen 0,81 % in Gruppe 3 (2x *E. coli* LTZ log

8-Gelb) und 1,94 % in Gruppe 1 (2x *E. coli* Intervet-Rot) angesiedelt. Sie lagen damit im Bereich der zu erwartenden Abgänge.

Die insgesamt 17 während der Aufzuchtphase pathologisch-anatomisch untersuchten Tiere zeigten überwiegend Omphalitis, Dottersackentzündung und Enteritiden bedingt durch Kokzidienbefall.

### 5.2.3. Legeperiode

#### 5.2.3.1. Mortalität in der Legeperiode

Alternative Legehennenhaltungssysteme stellen in Bezug auf das Herdenmanagement (Haltung, Fütterung, Hygiene, Umwelt, Prophylaxe) hohe Ansprüche. Unzureichende Haltungsbedingungen können genauso wie parasitäre, virale, bakterielle und immunsuppressive Erkrankungen als Stressoren prädisponierend auf die Entwicklung von *E. coli*-Infektionen wirken (GERRITS et al., 1959; DORN et al., 1971; WILLINGER, 1992; IGBOKWE et al., 1996; PHILIPP und VOSS, 1999; MITRA et al., 2004). Im Vergleich zu konventionellen Käfigen ist die Verlustrate bei alternativen Haltungssystemen höher (BÖHLAND, 1999; HAFEZ et al., 2001; BERGFELD et al., 2004).

Der Verlauf und die Symptome einer Kolibakteriose sind unspezifisch und können im Hinblick auf die Dauer, das Alter der betroffenen Tiere, die Art der betroffenen Organe und die Mortalität stark variieren (BARNES und GROSS, 1997; SHANE, 2001a). Die in der Literatur beschriebenen Verlustraten bei *E. coli*-Infektionen schwanken, da sie als Primärerkrankungen eine untergeordnete Rolle spielen, als Sekundärinfektionen jedoch für hohe Verlustraten verantwortlich sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bei den Legehennen zeigten im Mittel eine Mortalität von 7,38 % in 55 Lebenswochen, wobei der niedrigste Wert bei 6,54 % (ungeimpfte Kontrolle-Braun) und der höchste bei 8,35 % Gruppe 4 (1x *E. coli* LTZ log 9-Blau) lag.

Zur Beurteilung dieser Ergebnisse müssen verschiedene Parameter Berücksichtigung finden. Die laut Züchturvorgaben zu erwartende Mortalität liegt bei dieser Rasse zwischen 4-6 % (Vorgaben aus dem Legehennen Managementprogramm Lohmann-Brown-Classic) während der Legephase. Allerdings gehen diese Angaben von optimalen Haltungsbedingungen aus und sind daher überwiegend im Käfigsystem zu erwarten. BERGFELD et al. (2004) geben die durchschnittlichen Abgangsrate bei alternativen Haltungssystemen mit 11,8 % an. Die Gesamtmortalität der Legehennen in den beiden vorangegangenen Haltungsperioden der für den Versuch ausgewählten Farm lag mit 25-30 % weit über diesen Angaben und war überwiegend bedingt durch Infektionen mit *E. coli*. Zieht man die unter 4.1.3.3. beschriebenen Ergebnisse der pathologisch-anatomischen



Untersuchungen und die Tatsache, dass die ungeimpfte Kontrollgruppe die niedrigste Abgangsrate aufwies, mit ins Kalkül, so ist davon auszugehen, dass bei den Versuchstieren während der Legeperiode wahrscheinlich nur in geringem Umfang eine Belastung mit aviären pathogenen *E. coli* stattgefunden hat. Gleichzeitig darf jedoch die Bedeutung einer möglichen Reduzierung des Infektionsdruckes durch den Einsatz der neu angepassten bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzine nicht außer Acht gelassen werden. Parallel muss mit berücksichtigt werden, inwiefern eine durch den Versuch bedingte intensivere Betreuung der Legehennen durch das Farmpersonal zusätzlich positive Effekte auf die Gesamtentwicklung des Versuchsbestandes hatte. Inwieweit der Einsatz von *E. coli*-Vakzinen bei Legehennen Einfluss auf den Verlauf der Mortalität der Tiere hat, muss in weiterführenden Untersuchungen abgeklärt werden.

#### 5.2.3.2. Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Von den insgesamt 523 verendeten Legehennen gelangten einmal monatlich die Tierverluste eines Tages, im Ganzen 88 Tiere, zur pathologisch-anatomischen Untersuchung. Beginnend mit der 21. Lebenswoche war das Sektionsbild überwiegend durch tumoröse bzw. speckige Veränderung der Leber, Milz und des Drüsenmagens geprägt, was den Hinweis auf eine Infektion mit dem Virus der Marek'schen Krankheit gab. Dies wurde durch histopathologische und virologische Untersuchungen bestätigt. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnten mit wiederkehrender Regelmäßigkeit Veränderungen, hervorgerufen durch Kannibalismus, nachgewiesen werden. Diese Verletzungen waren vielgestaltig, jedoch überwiegend im Bereich der Kloake und des Legebauches zu finden. In der Literatur wird neben anderen Stressoren wie immunsuppressiven Erkrankungen der Kannibalismus als eine Hauptursache für durch *E. coli* bedingte Sekundärinfektionen angesehen (GERRITS et. al., 1959; DORN et. al., 1971; WILLINGER, 1992; BARNES und GROSS, 1997; PHILIPP und VOSS, 1999). Mit zunehmendem Alter der Tiere (ab der 45. Lebenswoche) bestimmten gleichzeitig pathologische Befunde in Form von Eierstocks-Eileiter-Bauchfell-Entzündungen sowie serofibrinöse bis hin zu fibrinöser Polyserositiden, Perikarditiden und -hepatitiden zunehmend das Sektionsbild. Ähnliche Veränderungen beschreiben WRAY und DAVIES (2001). Dabei ist das Sektionsbild geprägt von der mit käsigem, stinkendem Material oder milchiger Flüssigkeit gefüllten Bauchhöhle sowie Eierstöcken, die verlagert und entzündet sein können. Das Ovidukt ist dünnwandig, dilatiert und mit einer eitrigen Masse gefüllt, deren Volumen sich mit der Zeit vergrößern kann. AHLERS et al. (2000) beschreiben dieses Sektionsbild überwiegend bei verendeten Tieren aus Bodenhaltung. Eine vergleichende Beurteilung von gesunden Tieren erfolgte nicht. Allerdings ergaben die

Untersuchungen der Schlachtkörper im Rahmen der Geflügelfleischhygieneverordnung keine Abweichungen von der Norm.

#### 5.2.3.3. Bakteriologische Befunde

Bei den durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen konnten insgesamt 36 mal *E. coli* und 14 mal andere aerobe Keime isoliert werden, in 14 Fällen verlief der Keimnachweis negativ. Ein Pathogenitätstest nach WOOLEY et al. (2000) wurde nicht durchgeführt.

##### 5.2.3.3.1. Serotypisierung und Virulenzbestimmung

Die Serotypisierung von *E. coli*-Stämmen ist die klassische Methode zu deren Typisierung. Nach Literaturangaben sind insbesondere die Isolate der O-Gruppen O1, O2 und O78 für die Infektionen aus dem Symptomkomplex der Kolibakteriose verantwortlich (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch lediglich 4 (19 %) der untersuchten Isolate aus an *E. coli* verendeten Hühnern der O-Gruppe O2 zugeordnet werden. Die übrigen 17 *E. coli*-Stämme (81 %) waren durch keine der verwendeten Antiseren gegen O1, O2 und O78 zu identifizieren.

Von den 25 an das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen zur Virulenzbestimmung weitergeleiteten *E. coli* verdächtigen Isolaten konnten insgesamt 21 als *E. coli* verifiziert und mittels PCR auf ihre virulenzassoziierten Gene untersucht werden. Dabei wurden *iss* in 20 (95,2 %), *iucD* in 11 (52,4 %), *irp2* in 7 (33,3 %), *astA* in 7 (33,3 %), *tsh* in 5 (23,8 %), und *papC* in 1 (4,8 %) der Stämme nachgewiesen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Pathogenese der APEC ist die Fähigkeit der Bakterien, sich verschiedenen Abwehrsystemen des Wirtes entziehen zu können. Neben äußeren Membranproteinen, den Lipopolysacchariden und dem Colicin V wird diese Kompetenz durch das Increased serum survival Protein (*Iss*-Protein) vermittelt, welches bei dieser Untersuchung in 20 (95,2 %) *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden konnte. Mit 8 Nachweisen wurde es in der Gruppe 1 (2x *E. coli* inac-Intervet-Rot) am häufigsten und in der Gruppe 5 (Kontrolle-Braun) nur in einem Fall und hier als einziges, virulenzassoziiertes Gen erfasst. Im Vergleich zu den anderen virulenzassoziierten Genen konnte *iss* in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Das *Iss*-Protein greift auf Ebene der Komplementkaskade durch Blockade der letzten Stufe in die Abwehrmechanismen des Wirtes ein und sichert damit die erhöhte Überlebensrate der

Bakterien im Blut sowie deren systemische Verbreitung im Organismus (HORNE et al., 2000). Es wird vermehrt in APEC-Stämmen nachgewiesen und gilt als virulenzassoziiertes Faktor (PFAFF-MC DONOUGH et al., 2000; JOHNSON et al., 2002; GIBBS, et al., 2003). MC PEAKE et al. (2005) sehen bei ihren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Koliseptikämien bei Hühnern und dem Nachweis von *iss*.

Der Nachweis dieses als Indikator zur Identifizierung aviärer pathogener *E. coli*-Stämme (JANSSEN, 2002) einzuordnenden virulenzassoziierten Gens in allen Versuchsgruppen kann als Beweis für die Anwesenheit von APEC-Stämmen während des Versuchszeitraumes gewertet werden und bestätigt dessen Bedeutung im Infektionsgeschehen der Kolibakteriose. Gleichzeitig muss dies bei der zukünftigen Herstellung bestandsspezifischer Vakzinen Berücksichtigung finden.

Wie bereits erwähnt, sind verschiedene eisenaquirierende Systeme Grundlage für ein effektives Wachstum der Bakterien. In den untersuchten *E. coli*-Isolaten konnten 2 für den Eisenstoffwechsel bedeutende virulenzassoziierte Gene detektiert werden, davon 11 mal *iucD* (52,4 %) und in 7 Fällen *irp2* (33,3 %). In Kombination gelang lediglich ein fünffacher Nachweis (23,8 %). Aerobactin, eine Siderophore vom Hydroxamat-Typ, spielt für die Eisenaquirierung von *E. coli*-Stämmen eine zentrale Rolle. Für sie kodiert das virulenzassoziierte Gen *iucD*. In der vorliegenden Arbeit konnte *iucD* mit Ausnahme der Kontrollgruppe in allen anderen Versuchsgruppen eruiert werden. Als regulatives Protein ist *irp2* unter anderem in die Biosynthese und den Transport der Siderophore Yersiniabactin eingebunden und chromosomal auf einer so genannten „high pathogenicity island“ lokalisiert (SCHUBERT et al., 1998). In 2 der 5 Versuchsgruppen, Gruppe 2 (2x *E. coli* LTZ log 9-Grün) und Gruppe 5 (Kontrolle-Braun), konnte *irp2* nicht nachgewiesen werden. Mit dem vierfachen Nachweis in Gruppe 3 (2x *E. coli* LTZ log 9-Gelb) wurde er dabei am häufigsten erfasst.

Nach Untersuchungen von JANSSEN et al. (2001) ist die Fähigkeit von *E. coli*-Stämmen, das essentielle Eisen an verschiedenen Lokalisationen im Wirtsorganismus aufnehmen zu können, ein wichtiges Indiz für deren Pathogenität. Übereinstimmend belegen Studien 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). Alle untersuchten *E. coli*-Isolate wurden aus an Kolibakteriose verendeten Hühnern isoliert. Obwohl nicht alle Stämme *iucD* bzw. *irp2* aufwiesen, konnte mindestens eines dieser virulenzassoziierten Gene, mit Ausnahme der Kontrollgruppe-Braun, in jeder einzelnen Versuchsgruppen, detektiert werden. Das gibt einen zusätzlichen Hinweis für deren Einfluss auf den Pathomechanismus der Kolibakteriose.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten des Weiteren die virulenzassoziierten Gene *astA* in 7 (33,3 %), *tsh* in 5 (23,8 %) und *papC* in 1 (4,8 %) der *E. coli*-Isolate nachgewiesen werden. Die Bedeutung von *astA* für die Pathogenese der *E. coli*-Infektion beim Geflügel ist, wie bereits beschrieben, bisher noch weitestgehend ungeklärt. Lediglich in zwei

Versuchsgruppen konnte *astA* nachgewiesen werden. In Gruppe 1 (2x *E. coli* inac-Intervet-Rot) sechsmal und in Gruppe 2 (2x *E. coli* LTZ log 9-Grün) einmal.

Die Expression von P-Fimbrien erfolgt in weitaus geringerem Umfang als die der F1-Fimbrien (VAN DEN BOSCH et al., 1993). Obwohl die Bedeutung des *papC* als virulenzassoziiertes Gen, das für die P-Fimbrien kodiert, in der Pathogenese der Kolibakteriose bisher nicht abschließend analysiert wurde, scheinen sie für spätere Stufen der Infektion im Hinblick auf die Persistenz der Bakterien im Tier bzw. deren Resistenz gegenüber Phagozytose ausschlaggebend zu sein. Dabei vermitteln sie die Adhäsion an heterophile Granulozyten und Makrophagen während ihnen für das Überleben in den Zellen sowie der primären Besiedlung des oberen Respirationstraktes mit aviären pathogenen *E. coli* keine Bedeutung zugesprochen wird (POURBAKHSI et al., 1997a, b; MELLATA et al., 2003a, b).

Das Temperatur-sensitive Hämagglutinin (Tsh) ist zwar an der Ausbildung von Läsionen im Luftsack, die mit gleichzeitiger Fibrinablagerung einhergehen, verantwortlich, besitzt jedoch für die anschließende systemische Infektion keine Relevanz (DOZOIS et al., 2000). Die Rolle von *tsh* im Pathomechanismus der Kolibakteriose ist nur schwer zu bestimmen. Allerdings lassen die Ergebnisse verschiedener Studien einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *tsh* und dem letalen Ausgang einer APEC-Infektion bei Hühnern vermuten (MAURER et al., 1998; DOZOIS et al., 2000; JANSSEN et al., 2001; EWERS et al., 2003; VANDEKERCHOVE et al., 2005). Gleichzeitig detektierten VANDEKERCHOVE et al. (2005) einen signifikant höheren Anteil *tsh* von *E. coli*-Stämmen aus Legehennen, die an *E. coli* erkrankt bzw. verendet waren, als bei vergleichbaren Isolaten von gesunden Hennen.

Während der Nachweis von *papC* ausschließlich bei einem *E. coli*-Stamm aus Gruppe 3 (2x *E. coli* LTZ log 9-Gelb) gelang, konnte *tsh* mit Ausnahme der Gruppe 2 (2x *E. coli* LTZ log 9-Grün) und der Gruppe 5 (Kontrolle-Braun) in allen Versuchsgruppen eruiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei allen molekularbiologisch untersuchten *E. coli*-Isolaten, die von an Kolibakteriose verendeten Legehennen stammen, verschiedene virulenzassoziierte Gene, die im Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der APEC diskutiert werden, nachgewiesen. In den für die Herstellung des bestandsspezifischen Impfstoffes ausgewählten 3 *E. coli*-Stämmen wurden die virulenzassoziierten Gene *astA*, *irp2*, *iucD*, *tsh*, *fimC*, *fyua* und *papC* detektiert. Vergleicht man diese mit den erfassten virulenzassoziierten Genen der *E. coli*-Stämme aus den verendeten Versuchstieren [*iss* (95,2 %), *iucD* (52,4 %), *irp2* (33,3 %), *astA* (33,3 %), *tsh* (23,8 %), *papC* (4,8 %)], so fällt auf, dass insbesondere das nicht über den Impfstoff abgedeckte *iss* häufiger nachgewiesen werden konnte. Das virulenzassoziierte Gen *iss* konnte in keinem der für die Impfstoffherstellung empfohlenen pathogenen *E. coli*-Stämme mittels PCR detektiert werden. Allerdings scheint seine Nachweishäufigkeit von (95,2 %) aus den an Kolibakteriose verendeten Tieren in diesem Versuch ein weiteres Indiz für dessen

Bedeutung im Pathomechanismus dieses Symptomkomplexes zu sein. Im Zusammenhang mit der Herstellung einer wirksamen bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzine für diesen Bestand, sollte dieses Faktum zukünftig Berücksichtigung finden. Neben einer exakten Identifizierung der entsprechenden pathogenen *E. coli*-Stämme, ist deren effiziente Isolierung und Anzucht zu realisieren. Dabei ist die Auswahl und Anpassung geeigneter Anzuchtmedien- bzw. bedingungen sind insbesondere im Hinblick auf die Expression protektiver Antigene ausschlaggebend für den Erfolg der Vakzine (WIELER und SCHWARZ, 2000).

Während über die Serotypisierung lediglich 4 (19,0 %) *E. coli*-Isolate dem Serotyp O2 zugeordnet werden konnten, das ebenso wie die O-Gruppen O1 und O78 als Indikator für aviäre pathogene *E. coli* gilt, waren mit Hilfe des molekularbiologischen Nachweisverfahrens in allen untersuchten *E. coli*-Stämmen mindestens ein APEC-spezifisches virulenzassoziiertes Gen zu detektieren. Demgegenüber steht offensichtlich eine Vielzahl von aviären pathogenen *E. coli*, die nicht den gängigen Serotypen O1, O2 und O78 zugeordnet werden kann. Vor diesem Hintergrund ergibt sich zunehmend die Problematik, dass häufig *E. coli*-Stämme anderer Serotypen bzw. nicht typisierbare Stämme in das Infektionsgeschehen der Kolibakteriose involviert sind. Dies bestätigen aktuelle Untersuchungen, wonach sich aviäre pathogene *E. coli*-Isolate nur durch zusätzliche diagnostische Untersuchungsmethoden charakterisieren lassen (JANSSEN, 2002). EWERS et al., 2004 bestätigten mit ihren Ergebnissen die Multiplex PCR als ein Kosten sparendes und effektives Verfahren zur Detektion virulenzassoziiertes Faktoren von APEC-Stämmen und damit zur Identifizierung von APEC-Stämmen verschiedener Serogruppen sowie deren Unterscheidung von kommensalen Stämmen und anderen *E. coli*-Pathotypen.

### **5.3. Diskussion zu Teil 3**

#### **5.3.1. Belastungstest an den Versuchstieren**

Mit dem Ende der Legeperiode in der 73. Lebenswoche wurden je 50 Tiere pro Versuchsgruppe in eine abgeschlossene Versuchsstallung verbracht. Anschließend wurde je eine Hälfte der Tiere pro Versuchsgruppe mit  $5 \times 10^8$  KbE, die andere mit  $5 \times 10^7$  KbE pro Tier in 0,5 ml mit einem *E. coli*-Stamm (Serotyp O1) intratracheal infiziert. Der Challenge-Stamm wurde bereits in der bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzine verwendet. Die gewählte Infektionsdosis deckt sich mit Beschreibungen aus der Literatur. So verwendeten HELLER et al. (1990) und MELAMED et al. (1991)  $4 \times 10^8$  bzw.  $5 \times 10^8$  KbE und ROLAND et al. (2004) beispielsweise  $5,4 \times 10^7$ - $7,5 \times 10^7$  KbE pro Tier für den Challenge von Geflügel nach einer *E.*

*coli*-Impfung. Im Ergebnis des Belastungstestes kann festgehalten werden, dass die Gruppen mit der höheren Challenge-Dosis unabhängig von der Versuchsgruppe auch die höheren Verlustraten zeigten, wobei die Mortalität bei den Gruppen, welche die höhere Infektionsdosis erhielten, zwischen 68-80 % schwankte. In den Gruppen mit der niedrigen Infektionsdosis variiert sie hingegen zwischen 48 und 68 %. Auffallend ist, dass die ungeimpfte Kontrollgruppe verhältnismäßig niedrige bzw. den geimpften Gruppen ähnliche Verlustraten zeigt. Der Challenge-Stamm konnte aus den klinisch stark erkrankten, euthanasierten, bakteriologisch untersuchten Tieren reisoliert werden. Zusätzlich wurde dies mittels Makrorestriktionsanalyse verifiziert. Von einem Einfluss der *E. coli*-Impfung auf den Verlauf der Mortalität bzw. einem Impfschutz bis zum Nutzungsende der Legehennen, kann nicht ausgegangen werden. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen sollte jedoch geklärt werden, inwieweit ein belastbarer Impfschutz zu einem früheren Zeitpunkt nach der *E. coli*-Impfung ausgebildet wird.