

Was wissen wir über Coli-Infektionen bei Legehennen?

Dr. Hans-C. Philipp und Dr. Matthias Voß (Cuxhaven)

Einleitung

Escherichia coli ist ein gramnegatives Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae, dem als Krankheitserreger in der Human- und Veterinärmedizin eine erhebliche Bedeutung zukommt. Die Keime sind Bestandteil der normalen Darmflora und in der belebten und unbelebten Umwelt weit verbreitet. Es gibt eine große Vielzahl von Stämmen, die sich in ihrer Wirtsspezifität und Pathogenität, d. h. ihrem Potential, Krankheitszustände zu verursachen, stark unterscheiden. Mit verschiedenen Methoden werden aus diesem Grund in der bakteriologischen Diagnostik Pathogenitätsfaktoren identifiziert. Erst dies macht neben der eigentlichen Keimidentifizierung auf Speziesebene den Befund vollständig (GYLES, 1994).

Die Wechselbeziehungen zwischen Erreger und Wirt sind für Säugetiere schon intensiv bearbeitet worden, so dass eine Reihe relevanter Pathogenitätsfaktoren routinemäßig erfasst werden können, etwa bestimmte Toxine, die Lebensmittelvergiftungen des Menschen verursachen können (BOCKEMÜHL et al., 1997). Weitere bedeutende Pathogenitätsfaktoren sind Oberflächenstrukturen der Bakterien, welche die Anheftung an Wirtszellen vermitteln (Adhäsine, Fimbrien) oder eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber im Blutstrom vorhandenen antimikrobiellen Proteinen vermitteln (Serumresistenz). Für Stämme mit humanpathogenem Potenzial (z. B. EHEC) stellt das Wirtschaftsgeflügel kein Reservoir dar (WASTLHUBER et al., 1998).

Der aktuelle Kenntnisstand über durch *E. coli* vermittelte Krankheitszustände bei Legehennen ist vergleichsweise gering. Im Unterschied zu den Verhältnissen beim Säuger stehen hier verlustreiche Krankheitsausbrüche bei erwachsenen Tieren im Mittelpunkt des Interesses. Als Erkrankung bei Küken kommen Dottersack- und Nabelentzündungen vor. Diese können erfolgreich durch gute Hygienepaxis bei der Bruteigewinnung und der Brut zurückgedrängt werden (BARNES und GROSS, 1997). Da die Verabreichung von Antibiotika an Küken unter Einhaltung der vorgeschriebenen Wartezeiten wirtschaftlich tragbar ist, besteht hier auch die Möglichkeit der Behandlung. Während der Junghennenaufzucht werden klinische Erkrankungen durch *E. coli* selten beobachtet.

Bei Legehennen kommt es hingegen häufig zu generalisierten, fibrinös-exsudativen Entzündungen von Luftsäcken, Bauchfell und Legeorganen. Das Sektionsbild wird allgemein als „Colibazillose“ oder „Eileiter-Bauchfell-Entzündung“ (Peritonitis) bezeichnet. Fibrinöse Bauchfell- und Luftsackentzündungen sind wenig spezifisch, sondern sind eher Ausdruck einer generalisierten bakteriellen Entzündung, die auch durch Pasteurellen, Salmonellen oder Rotlaufferreger bedingt sein können. Daher sind Laboruntersuchungen unerlässlich.

Sofern die Widerstandskraft der Hennen durch weitere Infektionen (IB, TRT, Mycoplasmen), Impfreaktionen oder Stress geschwächt ist, können Coliinfektionen sich in stärkerer Ausprägung bemerkbar machen. Als bedeutende Stressfaktoren sind schlechte Umweltbedingungen (Schadgase, Staub, Temperaturschwankungen) und sozialer Stress (Federpicken, Kannibalismus) zu nennen. Durch gegenseitiges Bepicken beigefügte Hautverlet-

zungen dienen darüber hinaus als direkte Eintrittspforte für Infektionen.

Unter den mitteleuropäischen Bedingungen der Legehennenhaltung sind „*E. coli*-Verluste“ besonders schwierig zu kontrollieren:

- In der Käfighaltung kommt es seltener zu gehäuften Verlusten durch *E.-coli*-Peritonitis als bei der Boden-, Volieren- und Freilandhaltung (BÖHLAND, 1999). Folglich nehmen insgesamt auch die Probleme gerade bei den letztgenannten Haltungsformen zu.
- Tiere mit gekürztem Schnabel fügen sich weniger Verletzungen zu, die als Eintrittspforten von Infektionen dienen können. Der Verzicht auf das Schnabelkürzen ist daher mit der Inkaufnahme eines erhöhten *E. coli*-Risikos verbunden.
- Der Verbraucherschutz erfordert die Gewinnung von Lebensmitteln, die frei von Arzneimittelrückständen sind. Konsequenterweise kommt daher aufgrund der einzuhaltenden Wartezeiten die Verordnung systemisch wirkender Antibiotika in der Praxis der Eierzeugung nicht in Frage.

Welche Möglichkeiten bieten sich den Hennenhaltern und ihren betreuenden Tierärzten zur Vorbeugung und Behandlung?

- Primärinfektionen müssen durch angemessene Hygienebedingungen, die regelmäßige Gesundheitsüberwachung und abgestimmte Impfprogramme so weit wie möglich eingedämmt werden. Eine besondere Rolle kommt der Gestaltung des Stallklimas zu.
- Akute Ausbrüche können mit Antibiotika behandelt werden. Von praktischer Bedeutung sind nur Colistin und Neomycin, da bei diesen Wirkstoffen keine Wartezeit auf Eier eingehalten werden muss.
- Bestandsspezifische Impfstoffe gegen Colibazillose stehen zur Verfügung. Seit einigen Jahren werden besonders Herden in Boden- und Freilandhaltung zunehmend geimpft.

Die Umsetzung der oben genannten Maßnahmen bereitet in der Praxis häufig Schwierigkeiten. Eine zuverlässige Abschirmung von Infektionserregern ist bei der Auslaufhaltung ebensowenig möglich wie bei der Bodenhaltung die Reduzierung der Staubbelastung der Luft auf das Niveau einer Käfiganlage (STEIN, 1997). Daher konzentrieren sich die Erwartungen auf den Erfolg von Impfprogrammen.

Das Veterinär-Labor der Lohmann Tierzucht GmbH stellt seit einigen Jahren inaktivierte bestandsspezifische Impfstoffe her. Dazu werden *E. coli*-Stämme von erkrankten oder verendeten Tieren isoliert vermehrt, inaktiviert (abgetötet) und als Suspension zur Injektion aufbereitet. Junghennen sollten damit vor dem Beginn der Produktionsphase nach Möglichkeit zweimalig im Abstand von vier bis sechs Wochen geimpft werden. Die zunehmende Verbreitung solcher Impfstoffe spricht für ihre Wirksamkeit, obwohl selten präzise Daten über das Ausmaß des vermittelten Impfschutzes erhoben wurden. Experimentelle Daten belegen eine gute Wirksamkeit, die sich aber nur auf homologe Stämme beschränkt (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999).

Eigene Untersuchungen

Seit 1999 werden in unserem Labor bei isolierten *E. coli* verschiedene phänotypische Parameter bestimmt mit dem Ziel, mögliche Zusammenhänge zwischen diesen und der Pathogenität der Stämme zu ermitteln. Es sollen bei der Zusammenstellung von Impfstoffchargen die jeweils „schlimmsten“ Keime eines Bestandes erkannt werden, um dann als Impfantigen gezielt zum Einsatz zu kommen.

Material und Methoden

Isolate

In den Jahren 1999 und 2000 wurden 442 *E. coli*-Stämme von Legehennen, Eltern- und Großelterntieren gewonnen oder uns als Reinkulturen übergeben. Das Material stammte von 53 Einsendern aus 11 Ländern. Nur Isolate aus dem Herzen oder dem Knochenmark wurden berücksichtigt. Alle Stämme wurden über das API 20 E-System (Bio Mérieux, Nürtingen) identifiziert. Die Hämolyse wurde auf Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut (Oxid, Wesel) beurteilt, die Beweglichkeit mikroskopisch in frischen Bouillonkulturen.

Serotypisierung

Von 339 Isolaten wurde der Serotyp der somatischen Antigene (O-Antigen) bestimmt. Dazu wurden koagglutinierende Reagenzien gegen die O-Antigene 1, 2 und 78 verwendet (BioVac, Beaucozè, Frankreich). Sofern keine positive Reaktion beobachtet wurde, wurden die Stämme zur weiteren Untersuchung an das Central Veterinary Laboratory in Weybridge, Surrey, UK versandt.

Antibiogramme

Von 278 Stämmen wurden Antibiogramme im Mikro-Dilutionsverfahren angefertigt. Dazu wurden kommerzielle Testkits verwendet (Merlin, Bornheim-Hersel, Deutschland).

Embryo-Letalitätsindex

In Anlehnung an die von WOOLEY et al. (2000) beschriebene Methode wurde von 31 Stämmen ein Embryo-Letalitätsindex ermittelt. Dazu wurden ca. 300 koloniebildende Einheiten (KbE) des Teststammes in die Allantoishöhle von jeweils 11 neun Tage lang vorgebrüteten SPF-Hühnerembryonen injiziert (VALO, Lohmann Tierzucht, Cuxhaven). Die infizierten Eier wurden weiter bebrütet und durchleuchtet, um die Absterberate während einer Beobachtungszeit von sechs Tagen täglich zu erfassen. Die Ergebnisse wurden als Index angegeben. Dazu wurde an jedem Beobachtungstag die Zahl der abgestorbenen Embryonen ermittelt. Die Addition der Werte aller Beobachtungstage ergibt den Embryo-Letalitätsindex. Sofern alle Eier bereits am 1. Beobachtungstag absterben, wird der Maximalwert von 66 erreicht.

Ergebnisse

Alle 442 Stämme wurden auf Hämolyse untersucht. Positiv reagierten zwei Stämme einer Einsendung, die serologisch nicht typisiert werden konnten. Die Beweglichkeitsprüfung von 315 Isolaten ergab 213 positive und 84 negative Resultate (Tab.1).

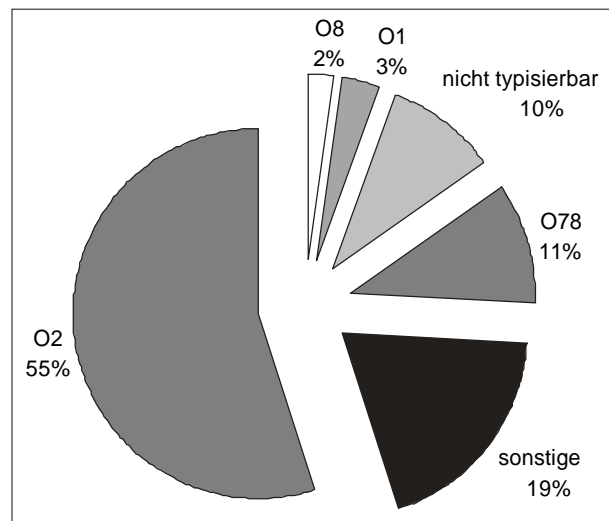
Von den 339 der Serotypisierung unterzogenen Stämmen konnte in 303 Fällen der O-Antigentyp ermittelt werden, die übrigen 33 Stämme waren nicht typisierbar. In-

Tabelle 1: Kultureigenschaften von E. coli-Stämmen der Legehennen

	Positiv	Negativ
Hämolyse	0,45 %	99,55 %
Beweglichkeit	67,6 %	32,4 %

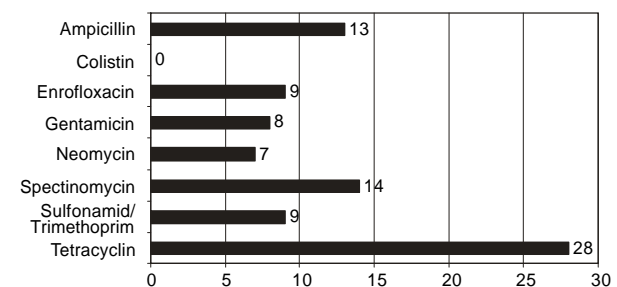
samt wurden 40 verschiedene O-Antigene nachgewiesen, am häufigsten traten die Serotypen O2, O78, O1 und O8 auf (Abb.1).

Abbildung 1: Nachweishäufigkeit verschiedener O-Serotypen



Die Resistenzlage von 278 untersuchten Stämmen gegenüber einigen in der Geflügelpraxis verwendeten Antibiotika ist in der Abbildung 2 wiedergegeben. Drei Isolate waren gegen alle in der Tabelle genannten Antibiotika mit Ausnahme von Colistin resistent. Je ein Isolat wies Empfindlichkeit nur gegen Colistin und Ampicillin bzw. Colistin und Gentamicin auf. Acht weitere Stämme waren nur gegen Colistin sowie zwei weitere Antibiotika empfindlich.

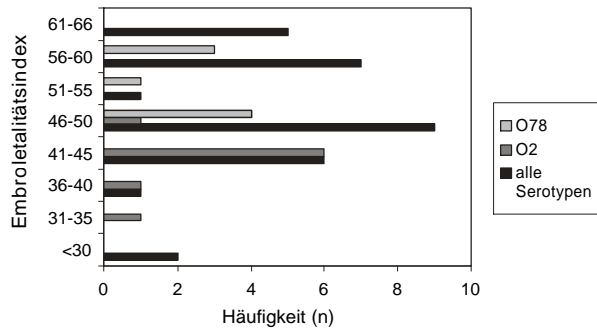
Abbildung 2: Resistenzrate gegenüber ausgewählten Antibiotika in %



Die Embryo-Letalitätsindizes wurden von 31 *E. coli*-Isolaten ermittelt, darunter waren 9 der Serogruppe O2 und 8 der Serogruppe O78 zugehörig. Von fünf Stämmen war der Serotyp nicht bekannt. Die Mittelwerte der Embryo-

Letalitätsindizes betragen 51 für alle getesteten Stämme, 42 für die *E. coli* O2 und 53 für die *E. coli* O78. In Form eines Histogrammes sind die Resultate in der Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Embryoletalitäts-Indices verschiedener O-Serotypen



Diskussion

Im täglichen Routinebetrieb unseres auf Geflügel spezialisierten Diagnostiklabors nimmt *Escherichia coli* eine besondere Rolle ein. Dies betrifft sowohl den Sektionsraum, wo typische Veränderungen sehr häufig beobachtet werden, als auch das Bakteriologielabor, wo zahlreiche Stämme isoliert, nach Möglichkeit charakterisiert und archiviert werden. Die Vielzahl der Einsender aus zahlreichen Ländern beweist, dass *E. coli*-Infektionen bei Legehennen ein großes Problem von internationaler Bedeutung sind. Soweit wie möglich wird durch serologische und virologische Laboruntersuchungen versucht, Primärinfektionen bei betroffenen Beständen zu identifizieren. So werden in manchen Fällen zurückliegende Infektionen durch angestiegene Serumtiter gegen das infektiöse Bronchitis- oder das Aviäre Pneumovirus nachgewiesen. Häufig aber treten verlustreiche *E. coli*-Infektionen in ansonsten aus Sicht des Labors unauffälligen Herden auf, auch in Betrieben, die negativ für *Mycoplasma gallisepticum*- und *Mycoplasma synoviae*-Antikörper sind.

Dies lenkt das Interesse auf die Frage, in welchem Maße bestimmte *E. coli*-Stämme auch ohne infektiöse Vorschädigung der Wirte Krankheiten verursachen können. Derartige Stämme müssten mit Pathogenitätsfaktoren ausgestattet sein, die in besonderer Weise die produzierende Legehenne als Wirt schädigen. Die Erfassung einiger zur Stammcharakterisierung von *E. coli* üblicher Parameter diene dem Ziel, mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen.

Darüber hinaus sollte die systematische Erfassung von Resistenzen relevanter Stämme helfen, die Grenzen und Möglichkeiten der Antibiotikatherapie abzuschätzen. Bei den Wirkstoffen Colistin und Neomycin, die ohne Wartezeit auf Eier angewandt werden dürfen, ist die Lage günstig. Sofern andere Produkte mit systemischer Wirkung eingesetzt werden sollen, z. B. bei Eltern- oder Masttieren, ist eine Überprüfung der Wirksamkeit dringend zu empfehlen, da Resistenzen in verschiedenen Kombinationen weit verbreitet sind.

Aus den von uns erhobenen Befunden geht hervor, dass die Hämolyse als Pathogenitätsfaktor bei Legehennen keine Rolle spielt. Ungefähr zwei Drittel der Stämme sind be-

weglich. Unter den mit Hilfe des Embryo-Letalitätstests als besonders pathogen eingestuften Isolaten befinden sich aber gleichermaßen solche mit und ohne Bewegungsaktivität.

Die Serotypen O1, O2 und O78 werden allgemein als besonders verbreitet bei Geflügel beschrieben (DHO-MOULIN und FAIRBROTHER, 1999). Unsere Ergebnisse bestätigen dies besonders für O2 und O78. Ein gehäuftes Auftreten von O1 konnten wir in dem von uns bearbeiteten Material nicht feststellen.

Der Embryo-Letalitätstest wurde von WOOLEY et al. (2000) beschrieben und von uns in abgewandelter Form übernommen. Mit diesem Test kann die Wechselwirkung eines definierten Erregers mit dem Hühnerembryo beobachtet werden, ohne dass ein Tierversuch erforderlich ist. Nachteile sind der erhebliche Materialaufwand sowie eine relativ geringe Wiederholbarkeit. Diese erklärt sich teilweise dadurch, dass Bruteier definierter Qualität in Bezug auf *E. coli*-Antikörper schlecht verfügbar sind. Daher sind die Testergebnisse nur als Trends zu interpretieren. Für die Praxis ist die Beobachtung wichtig, dass die Pathogenität innerhalb einer Serogruppe stark schwanken kann. Deshalb führen wir bei jedem Testansatz je einen stark und schwach embryoletal wirkenden *E. coli*-Stamm der Serogruppe als Kontrollen mit. Weiterhin fällt auf, dass die zur O2-Serogruppe gehörenden Isolate trotz ihrer zahlenmäßig überragenden Verbreitung in Legehennen geringer embryoletal wirken als O78-Stämme. Gerade „exotische“ oder nicht typisierbare Isolate ergaben bei der Indexermittlung oft sehr hohe Werte von 60 und darüber. Die Bestimmung des Serotyps allein erlaubt also keinen Rückschluss auf die Pathogenität eines Stammes.

Ausblick

Präzise molekularbiologische Methoden sollten zukünftig auch in der Veterinärmedizin zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren eingesetzt werden. Dies setzt aber voraus, dass solche Pathogenitätsfaktoren für das Wirtstier „Legehenne“ identifiziert und charakterisiert werden. Diese Thematik wird von einigen Arbeitsgruppen intensiv untersucht und erste Ergebnisse liegen vor (CHAFFER et al., 1999; FOLEY et al., 2000; POURBAKSH et al., 1997). Mithilfe dieser Erkenntnisse werden dann die Grundlagen für eine verbesserte Diagnostik und für die Entwicklung neuer Impfstoffe geschaffen, im Idealfall von Lebendimpfstoffen.

Der Embryo-Letalitätstest hat zurzeit mangels besserer Alternative durchaus eine Bedeutung etwa zur Abschätzung des pathogenen Potenzials von *E. coli*-Stämmen, die als Antigene zur Impfstoffherstellung dienen sollen. Labor- und Feldversuche sollen zukünftig die Wirksamkeit verschiedener Impfstoffe und Impfprogramme objektiv beurteilbar machen.

Zusammenfassung

Die Pathogenitätsbestimmung von *E. coli*-Isolaten anhand einfacher ermittelnder Eigenschaften wie Hämolyse und Beweglichkeit ist unergiebig. Bei der Serotypisierung wird ein gehäuftes Auftreten bestimmter Serotypen, besonders von O2, festgestellt. Ein Rückschluss auf die Pathogenität ist über den Serotyp im Einzelfall nicht möglich. In der Tendenz waren *E. coli* O78 stärker pathogen als *E. coli* O2. Eine praktische Bedeutung kommt der hier beschrie-

benen Erfassung phänotypischer Parameter insbesondere bei der Herstellung bestandsspezifischer Impfstoffe zu, wenn aus zahlreichen verfügbaren Isolaten eines Bestandes eine sinnvolle Auswahl zu treffen ist. Dabei empfehlen wir, Stämme verschiedener Serotypen mit dem jeweils höchsten Embryo-Letalitätsindex zu berücksichtigen.

Literatur

- BARNES, H. J., W. B. GROSS (1997): Colibacillosis. In: CALNEK (ed.): Diseases of Poultry, 10 th ed. Iowa State University Press
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH, H. TSCHÄPE (1997): Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundheitsbl. 6/97, 194-197
- BÖHLAND, K. (1999): Aktuelle Geflügelkrankheiten im Zusammenhang mit alternativen Haltungssystemen: Praxiserfahrungen. 57. Fachgespräch „Geflügelkrankheiten“, Hannover.
- CHAFFER, M., E. D. HELLER, B. SCHWARTSBUND (1999): Relationship between resistance to complement, virulence and outer membrane Veterinary Microbiology 64, 323-332
- DHO-MOULIN, M., J. M. FAIRBROTHER (1999): Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet. Res. 30, 299-316
- FOLEY, S. L., S. M. HORNE, C. W. GIDDINGS, M. ROBINSON, L. K. NOLAN (2000): Iss from a Virulent Avian *Escherichia coli*. Avian Diseases 44, 185-191
- GYLES, C. L. (ed.) (1994): *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Cab International, UK
- POURBAKSH, S. A., M. DHO-MOULIN, A. BREE, B. MARTINEU-DIOZE, J. M. FAIRBROTHER (1997): Localization of in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*
- STEIN, M. (1997): Mogelpackung „Öko-Ei“: Eine ernüchternde Bilanz. Vet-Impulse 5/97
- WASTLHUBER, U., C. SPLEISS, J. E. LOHR (1998): Verotoxinbildungs- und Anheftungsgene bei *E. coli*-Isolaten aus Wirtschaftsgeflügel und Psittaciformes: Nachweis mittels PCR. Tierärztl. Praxis 26, 49-52
- WOOLEY, R. E., P. S. GIBBS, T. P. BROWN, J. J. Maurer (2000): Chicken Embryo Lethality Assay for Determining the Virulence of Avian *Escherichia coli* Isolates. Avian Diseases 44, 318-324