

Pasteurellen im bebrüteten Hühnerei

2. Mitteilung: Immunitätsprüfungen*

D. Schimmel und D. van Truong

BGVV – Fachbereich Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen, D-Jena

Zusammenfassung

Die Immunisierung von Legehennen mit *Pasteurella*-Antigenen führte zur Bildung von Eiantikörpern mit geringem Titer. Diese Antikörper weisen im bebrüteten Hühnerei keine Schutzwirkung auf.

Summary: *Pasteurellas* in the embryonated eggs. 2. Immunity tests

The immunisation of laying hens caused low titer egg antibodies. These antibodies are not protective in the embryonated eggs.

Keywords: *P. multocida*, *P. haemolytica*, embryonated eggs, immunity testing

1 Einleitung

Zur Prüfung immunogener Eigenschaften von *Pasteurella* (*P.*)-*multocida*- und *P. haemolytica*-Antigenen ist die Immunisierung von Tieren sowie der sich anschließende Infektionsbelastungsversuch z.Z. noch nicht ersetzbar. Begründet wird dies durch noch nicht ausreichend gesicherte Beziehungen zwischen dem Ausfall von *in vitro* Reaktionen zur Immunantwort und dem Ergebnis des Belastungsinfektionsversuches. Eine Ursache dafür sind die nicht ausreichenden Kenntnisse zu den Virulenzeigenschaften der Pasteurellen.

Bei Pasteurellen sind in den letzten Jahren Virulenzfaktoren, für *P. multocida* ein Dermonekrotoxin und für

P. haemolytica ein Leukotoxin, nachgewiesen worden. Antikörper gegen diese Toxine sind protektiv. Tiere, die mit entsprechenden Toxoidantigenen immunisiert worden waren, wiesen einen Schutz gegen die Belastung mit den Toxinen, nicht aber gegen die Belastung mit den toxinbildenden Bakterien auf. Für die Induktion eines vollständigen Immunschutzes sind demnach noch weitere Antigene verantwortlich. Solange nicht die an der Pathogenese beteiligten Virulenzfaktoren aufgeklärt sind und nicht Korrelationen zwischen den *in vitro* Untersuchungsergebnissen zu Immunantwortreaktionen einerseits und den Resultaten des Infektionsbelastungsversuches andererseits nachgewiesen wurden, sind Versuche an Tieren nicht zu ersetzen.

Um die Belastungsversuche an der Maus bzw. auch an anderen Tierarten zu reduzieren, sollte die Möglichkeit der Immunisierung von Hühnern und die Prüfung der Immunantwortreaktion an embryonierten Eiern der immunisierten Hühner geprüft werden. In der 1. Mitteilung (Schimmel und van Truong, 1995) haben wir einleitend auch auf die Bedeutung des passiven Mäuseschutzversuches hingewiesen. Es war deshalb naheliegend, auch die Schutzwirkung von Antisera auf das bebrütete Hühnerei zu prüfen. Dazu sollte die direkte Verabfolgung der Antisera in den Dottersack vor der Applikation der Pasteurellen in den Dottersack des bebrüteten Hühnereies dienen.

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Material und Methoden

Herkunft, Bebrütung und Beimpfung der Eier entsprachen den Angaben der 1. Mitteilung (Schimmel und van Truong, 1995).

Bakterienstämme:

1 Stamm *P. multocida* ssp. *multocida* Serovar A

1 Stamm *P. multocida* ssp. *multocida* Serovar B

1 Stamm *P. multocida* ssp. *multocida* Serovar D

1 Stamm *P. haemolytica* Serovar A1

Die Stämme wurden in teildefiniertem Medium nach Floßmann et al. (1974) gezüchtet, die Keimzahlen betragen $1-3 \times 10^9$ /ml. Diese Bouillonkultur wurde nach entsprechender Verdünnung zur Ermittlung der LD₅₀ in 6 Tage bebrütete, embryonierte, von nicht immunisierten Hühnern stammende Eier injiziert.

Antigenherstellung zur Immunisierung der Hühner:

Bewachsene Bouillonkulturen der jeweiligen Stämme wurden nach 18stündiger Bebrütung (Keimzahl, 3×10^9 /ml) mit 0,5 % Formaldehyd inaktiviert und Legehennen zur Immunisierung verabreicht.

Immunisierung der Legehennen:

Dreimalige intramuskuläre Injektion von 3 ml Antigen im Abstand von 3 Wochen.

* Autoren und Redaktion sind sich einig darüber, daß die hier geschilderten Versuchsergebnisse keinen Erfolg bei der Umstellung des Nachweises der protektiven Wirksamkeit von Antikörpern von der Maus

auf das bebrütete Hühnerei gebracht haben. Wir stellen diese Ergebnisse trotzdem zur Diskussion. Die Autoren wollen ihre Bemühungen, zu einem Ersatz dieser Tierversuche zu gelangen, auf alle Fälle fortsetzen

und sind für Hinweise dankbar. Wir hoffen, daß aus dem Kreis der Leser, die teilweise ja sehr große Erfahrungen mit aviären Antikörpern haben, wertvolle Anregungen kommen werden. Die Redaktion

Aufarbeitung der Eier zur Antikörperbestimmung:

Die von einer Woche je immunisierter Henne nach Abschluß der Immunisierung gesammelten Eier wurden wie folgt zur Gewinnung von Eiantikörpern aufgearbeitet:

- nach Abtrennen des Eiklars, Anstechen der Eidotter, Gewinnung von 10 ml Eidotterflüssigkeit und Verdünnung mit 15 ml PBS (pH 7,0)
- Homogenisierung mit Magnet-rührer
- 20minütige Zentrifugation bei 4500 U/min
- Gewinnung des Überstandes
- 3malige Fällung mit 30%igem Ammoniumsulfat
- Aufnahme des letzten Präzipitates in 5 ml *aqua dest.*
- 24stündige Dialyse gegen PBS
- Prüfung des Antikörpertiters mit indirekter Hämagglutinationsreaktion.

Kontrolle der immunogenen Wirksamkeit:

Zur Kontrolle der Schutzfunktion nachgewiesener Antikörper wurden mindestens drei befruchtete Eier von Hennen mit positivem Antikörperbefund im Ei am 6. Bebrütungstag mit dem homologen Stamm auf die Allantoismembran und mindestens drei Eier in den Dottersack infiziert (Dosis LD₅₀, jeweils aktuell ermittelt). Mindestens drei Eier nicht immunisierter Hennen dienten zur Kontrolle.

Tabelle 1: Reziproke Titer der Eiantikörper

Eiantikörper gegen	Antigen			
	<i>P. multocida</i> Serovar A	<i>P. multocida</i> Serovar B	<i>P. multocida</i> Serovar D	<i>P. haemolytica</i> A1
<i>P. multocida</i> Serovar A	64	–	8	8
<i>P. multocida</i> Serovar B	–	64	–	–
<i>P. multocida</i> Serovar D	8	–	128	–
<i>P. haemolytica</i> A1	–	–	–	64

Prüfung von Antiseren auf Wirksamkeit:

Zur Prüfung der immunologischen Wirksamkeit im indirekten Haemagglutinationstest hochtitriger Antiseren von Kaninchen, Kälbern und Ferkeln wurden 0,5 ml Antiserum am 5. Bebrütungstag in den Dottersack befruchteter, von nicht immunisierten Hennen stammender Eier injiziert. Die Eier wurden am 6. Bebrütungstag in den Dottersack mit dem homologen Stamm infiziert (Dosis LD₅₀). Wir verwendeten ein Antiserum vom Kaninchen gegen *P. multocida ssp. multocida* Serovar A, ein Antiserum vom SPF-Ferkel gegen *P. multocida ssp. multocida* Serovar D und ein Antiserum vom Kalb gegen *P. haemolytica* Serovar 1, Biovar A. Die Titer aller geprüften Seren lagen im indirekten Haemagglutinationstest bei 1:1280.

3 Ergebnisse und Diskussion

Antikörpernachweis im Eidotter:

Die aus 4–5 Eiern gewonnenen Antikörper wurden mit dem indirekten Haemagglutinationstest auf Titerhöhe und Spezifität geprüft. Die Titer

lagen zwischen 1:64 und 1:128. Kreuzreaktionen wurden nur in den Verdünnungen bis 1:8 nachgewiesen (Tabelle 1).

Schutzwirkung im bebrüteten Ei:

Unmittelbar nach der Entnahme der Eier zur Antikörperbestimmung wurden die Eier für den Schutzversuch gesammelt. Je immunisierter Henne wurden sechs in den Brutapparat eingelegte Eier am 6. Bebrütungstag in den Dottersack und sechs weitere eingelegte Eier ebenfalls am 6. Bebrütungstag auf die Allantoismembran mit dem zur Immunisierung verwendeten Stamm infiziert (Dosis: die LD₅₀ des jeweils zuvor geprüften Stammes). Es konnte mit dieser Versuchsanstellung für keinen Stamm eine Schutzwirkung gefunden werden (Tabelle 2).

Die Immunisierung von Legehennen führte zur Eiantikörperbildung gegen Pasteurellen. Diese wiesen jedoch mit der angegebenen Prüfmethode keine Schutzwirkung im bebrüteten Hühnerei auf.

Die erzielten Ergebnisse stehen in gewisser Übereinstimmung mit Resultaten zur Bakterizidie von Voll-

Tabelle 2: Ergebnisse nach Infektion bebrüteter Eier von immunisierten Hennen

Serovar der zur Immunisierung und Infektion verwendeten Pasteurella-Stämme	Infektion Dottersack		Infektion Allantoismembran	
	Anzahl infizierter Eier	Anzahl abgestorbener Embryonen	Anzahl infizierter Eier	Anzahl abgestorbener Embryonen
<i>P. multocida</i> A - A	4	3	5	3
nicht immunisierte Kontrolle - A	3	2	4	2
<i>P. multocida</i> B - B	5	3	4	3
nicht immunisierte Kontrolle - B	4	2	3	2
<i>P. multocida</i> D - D	4	2	4	2
nicht immunisierte Kontrolle - D	3	1	3	2
<i>P. haem.</i> A1 - A1	5	3	5	3
nicht immunisierte Kontrolle - A1	4	2	3	2

blut und Plasma von Ferkeln und Kälbern nach Immunisierung mit Pasteurellen. Bakterizide Eigenschaften konnten bei diesen Tieren nicht nach Immunisierung allein, sondern nur nach Immunisierung und anschließend ausgeführter Belastungsinfektion nachgewiesen werden (Müller et al. 1990). Auch Antiseren von Kaninchen, Ferkel und Kalb mit hohem Titer im indirekten Haemagglutinationstest wiesen nach Applikation in den Dottersack weder nach Infektion bebrüteter Hühnereier in den Dottersack noch auf die Allantoismembran mit dem homologen Stamm einen Schutz auf. Diese Ergebnisse stehen in gewissem Widerspruch zu den Resultaten des passiven Mäuseschutzversuches.

Mit den bisher geprüften Methoden können die Immunitätsprüfungen von Pasteurella-Antigenen an Tieren nicht ersetzt werden. Für die Gewinnung von Antikörpern gegen Pasteurellen ist die Immunisierung von Legehennen nur bedingt geeignet, weil die bisher erreichten Titerhöhen nicht befriedigen können.

Literatur

- Floßmann, K. D., Feist, H., Höfer, M. und Erler, W. (1974). Untersuchungen über chemisch definierte Nährmedien für *Pasteurella multocida* und *Pasteurella haemolytica*. *Z. Allg. Mikrobiol.* 14, 29–38.
- Müller, G., Erler, W., Schimmel, D., Schönherr, W. und Putsche, R.

(1990). Bakterizidie gegen *Pasteurella multocida* im Vollblut, Plasma und der Lungenspülflüssigkeit unbehandelter und immunisierter Läufer-schweine und Kälber. *Arch. exper. Vet. med.* 44, 65–73.

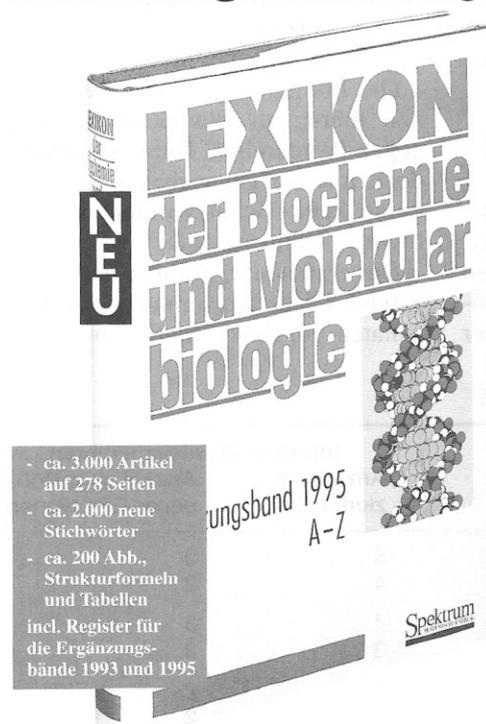
Schimmel, D. und van Truong, D. (1995). Pasteurellen im bebrüteten Hühnerei. 1. Mitteilung: Prüfung auf schädigende Wirkung und LD50 Bestimmung. *ALTEX* 12, 31–33.

Korrespondenzadresse

Dietrich Schimmel
BGVV – Fachbereich Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen
Naumburger Str. 96a
D-07743 Jena

Jetzt erschienen:

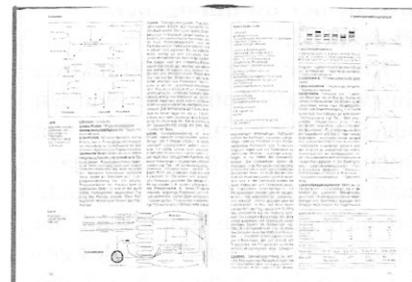
Ihr Ergänzungsband 1995



- ca. 3.000 Artikel auf 278 Seiten
 - ca. 2.000 neue Stichwörter
 - ca. 200 Abb., Strukturformeln und Tabellen
- incl. Register für die Ergänzungsbände 1993 und 1995

zum

Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie



Der Ergänzungsband 1995

aktualisiert und ergänzt das zur Zeit weltweit größte einschlägige Fachlexikon. Annähernd 3.000 Sachstichwörter und zahlreiche ausführliche Artikel aus den Bereichen Zellbiologie, Molekular- und Humangenetik sowie Tumor- und Immunbiologie weisen auf die besondere Aktualität dieser Fachbereiche und ihre Bedeutung für die Entwicklung der modernen Biowissenschaften hin. Das Werk ist mit über 200 Abbildungen, Strukturformeln und Tabellen reichhaltig illustriert.

Nutzen Sie die Gelegenheit, Ihr Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie zu aktualisieren.

278 Seiten, geb., im Schuber
DM 168,-/öS 1.311,-/sFr 152,-
ISBN 3-86025-157-0

Zeit sparen - bequem bestellen

Eine Bestellkarte finden Sie im Heft.

Telefon 07071-935360

Fax 07071-935393

Spektrum
AKADEMISCHER VERLAG

Vangerowstr. 20, D-69115 Heidelberg