

Pasteurellen im bebrüteten Hühnerei

1. Mitteilung: Prüfungen auf schädigende Wirkung und LD₅₀-Bestimmung

Dietrich Schimmel und Dung van Truong

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, D-Jena

Zusammenfassung

Virulenzprüfungen an der Maus sind zur Charakterisierung von *Pasteurella (P.) multocida* und *P. haemolytica* nicht mehr erforderlich. Beide Spezies führen zum Absterben von Kükenembryonen. Diese Eigenschaft könnte es ermöglichen, immunologische Prüfungen nicht mehr an der Maus, sondern im bebrüteten Hühnerei auszuführen.

Summary: *Pasteurellas* in the embryonated eggs.

1. Virulence checking

The virulence checking for *P. multocida* and *P. haemolytica* for characterisation the both species is furthermore not necessary. Both species caused death in embryonated eggs. This property can be used for immunological investigations.

Keywords: *P. multocida*, *P. haemolytica*, virulence checking, embryonated eggs

Einleitung

Zur Charakterisierung von Bakterien, so auch der Pasteurellen, wurden in älteren Beschreibungen stets auch Ergebnisse von Virulenztestungen an der Maus mit herangezogen. Dabei dienen diese Resultate mehr der Bakterienspeziesbeschreibung als dem Analogieschluß Mäusevirulenz – Virulenz bei anderen Tierarten oder dem Menschen. Stämme der Spezies *P. multocida* Serovar B und

D sind für Mäuse nach intraperitonealer Infektion hochvirulent, eine LD₅₀ läßt sich deshalb in der Regel nicht bestimmen. 10 Bakterien je Maus intraperitoneal führen zur Septikämie und zum Tod der Tiere. Serovar-A-Stämme weisen weniger virulente Eigenschaften auf, und *P. haemolytica*-Stämme sind für Mäuse avirulent. Diese Mäusevirulenzeigenschaften erlauben keine Schlußfolgerungen für die Tierarten, von denen diese Pasteurellen isoliert wurden. Die mäuseavirulenten *P. haemolytica*-Stämme haben große Bedeutung bei Kalb und Schaf, und die wenig mäusevirulenten *P. multocida*-Serovar-A-Stämme sind als Krankheitserreger bei verschiedenen Tierarten bekannt. Auch zur Unterscheidung der verschiedenen Pasteurellaspezies ist der Mäuseversuch unnötig, es stehen ausreichende und aussagefähigere *in vitro* Verfahren zur Verfügung.

Bedeutung besitzen hingegen auch heute noch die Ergebnisse des passiven oder auch aktiven Mäuseschutzversuches, wie sie von Roberts (1947) zur Serotypisierung mitgeteilt wurden. Mit typspezifischen Pasteurellaantiseren konnten Mäuse vor einer tödlichen homologen Infektion wirksam geschützt werden. Mit Kreuzversuchen konnte Roberts (1947) auf dieser Basis vier Serotypen charakterisieren, die später die Grundlage der Kapseltypisierung nach Carter (1955) bildeten. Damit bedeuteten die Kapseltypen auch Immuntypen. Dieses Ergebnis hat auch heute noch volle Gültigkeit, und die Kapseltypisierung ist neben

der Prüfung des Toxinbildungsvermögens ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl und Zusammenstellung von Impfstoffen gegen Pasteurelleninfektionen bei verschiedenen Tierarten.

Um auch die Immunisierungsversuche an Tieren möglicherweise durch das System – immunisierte Henne – Brutantikörper – Embryonenschutz – zu ersetzen oder einzuschränken, waren als erster Schritt in diese Richtung Untersuchungen zur embryoschädigenden Wirkung von Pasteurellen im bebrüteten Hühnerei notwendig.

Die eigenen Untersuchungen beschäftigten sich im ersten Abschnitt mit der LD₅₀-Bestimmung für verschiedene Pasteurellaspezies bzw. Serovarietäten nach Applikation der Pasteurellen in den Dottersack bzw. auf die Allantoismembran bebrüteter Hühnereier.

Eigene Untersuchungen

Bruteier, Material und Methoden

Herkunft der Eier:

Die Hühnereier wurden von der institutseigenen SPF-Hühnerhaltung bezogen. Sie wiesen ein Gewicht von 55–60 g auf und waren von normaler Größe.

Bebrütung:

Zur Bebrütung verwendeten wir einen Brutapparat der Fa. Artur Kaden, Thüringen, und bebrüteten die Eier nach der Vorschrift des Geräteherstellers.

Beimpfung der bebrüteten Eier Chorioallantoismembran:

Auf dem Ei wurde am 6. Bebrütungstag unter ausreichender Durchleuchtung die Lage von Luftkammer, Embryo und der großen Gefäße markiert. Danach wurde das Ei mit der oben liegenden Embryomarkierung waagrecht fixiert. Die Oberseite sowie der Bereich der Luftkammer wurden gründlich mit Alkohol betupft und abgeflammt. Mit Hilfe eines Zahnbohrers an biegsamer Welle wurde ein Dreieck von 0,6–0,9 mm Seitenlänge ausgefräst. Die unter der Schale liegende Schalenhaut durfte dabei nicht beschädigt werden. An dieser Stelle wurde die Schalenhaut durchstoßen und 0,1 ml des infektiösen Materials mit Mikropipette oder Spritze aufgetropft. Der Verschluss der Öffnung erfolgt mit Pergament und flüssigem Paraffin.

Dottersack:

Die Applikation in den Dottersack erfolgte am 6. Bebrütungstag nach Durchleuchtung, die Markierung der Luftkammer und des Embryos sowie die Vorbereitung der Injektions-

stelle erfolgten wie oben beschrieben durch die Luftkammer.

Kontrolle der bebrüteten Eier:

Die Eier wurden täglich 1mal durchleuchtet. Die abgestorbenen Embryonen wurden sofort unter sterilen Bedingungen geöffnet und mikrobiologisch untersucht. Jeder Versuch wurde bis zum 13. Bebrütungstag verfolgt.

Ergebnisse

Pasteurella multocida:

17 *P. multocida*-Stämme (Serovarietäten siehe Tabelle 1) wurden in die Prüfungen einbezogen. Jeder Stamm wurde in V696-Bouillon (Flobmann und Mitarb., 1974) angezüchtet, nach 24 h erfolgte die Keimzahlbestimmung. Die Bouillonkulturen wurden anschließend auf eine Keimzahl von 10^5 bis 10^1 eingestellt, und mit jeder Verdünnungsstufe (1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 und 10^1) beimpften wir drei bebrütete Hühnereier unter sterilen Bedingungen auf die Allantoismembran.

Die infizierten Eier wurden während einer 7tägigen Bebrütung täg-

lich auf Absterben untersucht. Die Ergebnisse im Vergleich zur Virulenzprüfung an Mäusen sowie Ferkel und Kalb sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Diese Ergebnisse stammen von länger zurückliegenden Arbeiten (Schimmel, 1987 a, b, Schimmel und Mitarbeiter, 1990). *P. multocida*-Stämme führen mit unterschiedlichen Keimzahlen zu Schädigungen von Kükenembryonen. Die LD_{50} lag nach unseren Ergebnissen zwischen 3 und $1,6 \times 10^3$ Bakterien je Kükenembryo. Der Vergleich zu den früher ausgeführten Virulenztestungen an der Maus zeigt, daß die Maus für *P. multocida* zwar empfindlicher ist, daß aber das embryonierete Hühnerei aufgrund der ermittelten LD_{50} durchaus als Testsystem für immunologische Fragestellungen eingesetzt werden könnte. Der Vergleich der schädigenden Wirkung von *P. multocida* gegenüber bebrütetem Hühnerei, Maus und Kalb bzw. Ferkel bestätigt, daß Aussagen zur Virulenz stets nur im Zusammenhang mit dem entsprechenden Wirtsorganismus getroffen werden können.

Pasteurella haemolytica:

15 *P. haemolytica*-Stämme wurden in gleicher Weise wie die *P. multocida*-Kulturen im bebrüteten Ei auf Virulenzeigenschaften untersucht. Diese Prüfungen waren besonders interessant, weil *P. haemolytica*-Stämme für Mäuse weitgehend avirulent sind. Die Ergebnisse zeigen, daß das bebrütete Hühnerei durchaus für Virulenzprüfungen von *P. haemolytica* geeignet ist (Tabelle 2).

Diskussion

Die Prüfung krankheitsverursachender Eigenschaften von Bakterien ist für die medizinisch tätigen Bakteriologen eine ständige Aufgabe. Für die wichtigsten Bakterienspezies sind die Pathogenitätseigenschaften bekannt und durch Erfüllung der Koch-Henleschen Postulate an Krankheitserregern hinreichend belegt. Die aktuelle Ausprägung der krankheitsverursachenden Eigenschaften bei ei-

Tabelle 1: Vergleichende Darstellung der Virulenzprüfung von *P. multocida* an Mäusen und im bebrüteten Hühnerei

Stamm-Nr.	Serovar	LD_{50} im bebrüteten Hühnerei	LD_{100} bei Mäusen	durchschnittl. Pneumoniegrad bei Ferkel oder Kalb
1726	D	$1,8 \times 10^1$	10^2	2,75
1778	A/D	$1,2 \times 10^2$	10^2	2,6
3363	D	$5,4 \times 10^1$	10^3	1,0
3701	D	4	10^1	1,2
3674	A/D	$3,4 \times 10^2$	10^2	2,3
4381	–	$1,1 \times 10^2$	10^1	2,0
3120	D	5×10^1	*	2,2
4461	D	100 % Eitod mit 7 Keimen	10^1	1,7
3174	D	$1,4 \times 10^1$	*	3,3
2285	D	$5,5 \times 10^1$	10^1	*
3606	A/D	$5,4 \times 10^1$	10^1	*
3607	D	$1,6 \times 10^3$	10^1	*
1906	–	$1,5 \times 10^2$	10^2	*
3605	D	3	10^1	*
3364	D	100 % Eitod mit 6 Keimen	10^2	*
2919	A/D	$8,2 \times 10^1$	10^1	*
2004	A	$8,8 \times 10^2$	10^5	*

Zeichenerklärung: * nicht geprüft

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung der Virulenzprüfung von *P. haemolytica* an Mäusen und im bebrüteten Hühnerei

Stamm-Nr.	LD ₅₀ im bebrüteten Hühnerei	LD ₁₀₀ bei Mäusen
2353	3,8 × 10 ³	10 ⁹
6169	6 × 10 ⁵	10 ⁸
6556	8,8 × 10 ⁵	10 ⁸
6554	1,4 × 10 ⁵	10 ⁷
6559	9,9 × 10 ⁴	10 ⁹
6558	9,3 × 10 ⁴	10 ⁸
6551	6,6 × 10 ⁴	10 ⁷
6546	6 × 10 ³	10 ⁷
6172	2,4 × 10 ⁴	10 ⁸
6180	7,5 × 10 ³	10 ⁷
6171	4,4 × 10 ⁵	10 ⁸
5714	1,5 × 10 ⁷	10 ⁹
5715	6,1 × 10 ⁶	10 ⁸
5674	7,2 × 10 ⁵	10 ⁸
6388	6,4 × 10 ⁵	10 ⁷

nem vorliegenden Stamm kann durch den Nachweis bekannter Virulenzfaktoren erbracht werden. Für viele Bakterienarten sind jedoch diese Faktoren ungenügend bekannt, zu ihrer Ermittlung verbleibt z.Z. nur das Infektionsexperiment am Tier. Durch Untersuchungen verschiedener Autoren wurde die Mäusevirulenz von *P.-multocida*-Stämmen eindeutig nachgewiesen. Die Mäuse erleiden dabei eine Septikämie, dadurch ist dieses Tiermodell nur für Infektionen des Carter-Typs B geeignet, nicht jedoch für Serovar-A- und D-Infektionen von *P. multocida* und für *P.-haemolytica*-Infektionen.

Stämme der Serotypen A und D verursachen bei der Maus ebenfalls akute septikämisch verlaufende Infektionen. Bei den Haustieren werden durch Vertreter dieser Serovarietäten hingegen vorwiegend lokale Infektionen am Atmungsapparat, nicht jedoch Septikämien hervorgerufen. Die Maus ist deshalb als Modell für diese Infektionen ungeeignet.

Durch eigene Untersuchungen an bebrüteten Hühnereiern wurde die LD₅₀ je Ei zwischen 3 und 1,6 × 10³ Keime bestimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse können Prüfungen, die eine Schädigung des Testsystems zur Voraussetzung haben, am bebrüteten Hühnerei ausgeführt werden.

Gleichzeitig wurden auch *P.-haemolytica*-Stämme in die Untersuchungen einbezogen. Diese Arbeiten waren vor allem deshalb interessant, weil für *P.-haemolytica*-Virulenzprüfungen kein geeignetes Tiermodell bekannt ist (Schimmel, 1987b). Die LD₅₀ bei bebrüteten Hühnereiern lag zwischen 3,8 × 10³ und 1,5 × 10⁷ Keimen und weist damit einen großen Schwankungsbereich auf. Die schädigende Wirkung nicht nur der *P.-multocida*- als vielmehr auch der *P.-haemolytica*-Stämme auf Kükenembryonen eröffnet erstmals die Möglichkeit der Wirksamkeitsprüfung von immunisierenden Antigenen bzw. auch Antiinfektiva mit dem System – immunisierte Henne – Brutantikörper – Embryonenschutz. In weiteren Untersuchungen soll die Eignung dieses Systems für die oben erwähnten Fragestellungen geprüft werden.

Literatur

- Carter, G. R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A Haemagglutination Test for the Identification of Serological Types. *Am. J. Vet. Res.* 16, 481–484.
- 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.

Roberts, R. S. (1947). An Immunological Study on *Pasteurella septica*. *J. Comp. Path.* 57, 261–278.

Schimmel, D. (1987a). Ergebnisse experimenteller Infektionen von SPF-Ferkeln mit *Pasteurella multocida* – Vorschlag eines reproduzierbaren Infektionsmodells. *Arch. exper. Vet. med.* 41, 455–462.

Schimmel, D. (1987b). Ergebnisse experimenteller Infektionen von Kälbern mit *Pasteurella multocida* und *Pasteurella haemolytica*. *Arch. exper. Vet. med.* 41, 463–472.

Schimmel, D., Fodor, L., Stein, I. und Putsche, R. (1990). Ergebnisse zur Typisierung und Virulenzprüfung von *Pasteurella haemolytica*-Feldstämmen. *Arch. exper. Vet. med.* 44, 295–300.

Korrespondenzadresse

Dietrich Schimmel
 Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
 Fachbereich Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen
 Naumburger Str. 96a
 D-07743 Jena-Zwätzen