Serologische Testmethoden als Ersatz für Infektionsversuche an Ferkeln zur Wirksamkeitsprüfung von *E.coli*-Muttertierimpfstoffen

Marion Krug, Dorothea Hausleithner, Regine Taddey, Peter Volkers, Babett Kobe und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

Zusammenfassung
Escherichia coli (E.coli) bedingte Durchfallerkrankungen stellen ein großes Problem für Ferkelaufzuchtbetriebe dar. Durch Impfung der Muttertiere kann der Antikörpergehalt gegen die für die Erkrankung relevanten Haftantigene in der Muttermilch erhöht werden. Der Transfer der mütterlichen Antikörper kann die Saugferkel vor Erkrankung schützen. Die Zulassung dieser Tierimpfstoffe fordert noch immer Infektionsversuche an Ferkeln zum Wirksamkeitsnachweis. Um eine Ablösung dieser sehr belastenden Tierversuche durch in vitro Methoden zu erreichen, wurden verschiedene Enzymimmunoassays zur Untersuchung auf Antikörper gegen die für die Erkrankung relevanten Haftantigene F4ab, F4ac, F6 und F41 in Blutserum- und Kolostrumproben entwickelt. Insgesamt wurden 8 in Deutschland zugelassene Impfstoffe in die Untersuchungen einbezogen. Dabei zeigten sich bei den geimpften Sauen in Blut und Kolostrum signifikant höhere Antikörpertiter im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren. Damit erscheint der Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern gegen die vier entscheidenden Haftantigene zur Ablösung der belastenden Infektionsversuche an Ferkeln geeignet.

Summary: Serological test methods as replacement for infection trials in piglets to test the potency of E. coli vaccines for sows (dams)
Escherichia coli (E. coli) related diarrhoea poses a major problem in piglet production. Vaccination of dams increases the antibody titre in their milk against relevant adhesion antigens. Transfer of maternal antibodies via the milk can serve to protect the suckling piglets from the disease. However, a marketing authorisation for veterinary use of these vaccines requires potency determination as assayed in infection trials in piglets. Enzyme immunoassays testing the antibodies in blood serum and colostrum samples from vaccinated dams against the relevant adhesion antigens, F4ab, F4ac, F6 and F41, were developed to replace the very distressing infection experiments by in vitro methods. Eight vaccines authorised in Germany were included in the trials. Vaccinated sows showed significantly higher antibody titres in blood and colostrum than unvaccinated control animals. Thus the enzyme immunoassays appear to be suitable to detect antibodies against four important adhesion antigens, and can be used to replace the distressing infection trials in piglets.

Keywords: Escherichia coli, neonatal piglet colibacillosis, vaccination, colostral antibody, enzyme linked immunosorbent assay, replacement animal test

1 Einleitung

Escherichia coli (E.coli) sind ubiquitäre Keime. Bei den durch enterotoxische *E.coli* hervorgerufenen Infektionskrankheiten handelt es sich um verlustreiche Durchfallerkrankungen von neugeborenen oder nur wenige Tage alten Ferkeln, die erhebliche wirtschaftliche Verluste verursachen. Der pathogenetische Prozess der Colienterotoxämien ist gut bekannt. Nach oraler Aufnahme der Keime heften sich die Bakterien mit Hilfe ihrer Fimbrienantigene (Haftantigene) F4ab, F4ac, F5, F6 und F41 am Dünndarmepithel an. Es kommt zur massenhaften Vermehrung und zur Bildung von Toxinen, die zu gravierenden Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt führen. Die Muttertierimpfung zur Bekämpfung der Neugeborenendiarrhö hat in der Landwirtschaft aufgrund ihrer hohen Effizienz einen festen Platz im Prophylaxeprogramm zur Aufzucht von Ferkeln eingenommen. Hierdurch wird der spezifische Antikörpergehalt in der Milch und damit der natürliche passive Schutz der Neugeborenen erhöht. Gemäß den in der Monographie Nr. 962 (4.06) „*Neonatal piglet colibacillosis vaccine (inactivated)*“ des Europäischen Arzneibuchs *(Ph.Eur.)* festgelegten, rechtsverbindlichen Anforderungen muss für die Zulassung der Nachweis der Wirksamkeit in einem Belastungsversuch an Jungtieren erbracht werden. Bei diesem Tierversuch

Das Manuskript wurde am 8.3.2005 eingereicht; am 19.4.2005 wurde die revidierte Fassung zum Druck angenommen

handelt es sich um sehr belastende Experimente. Der Nachweis wird mit mehreren Bakterienstämmen durchgeführt, die jeweils den Antigentypus enthalten, gegen den der Impfstoff schützen soll (i.d.R. 4 verschiedene Antigene). Es müssen jeweils 15 geimpfte und 15 ungeimpfte Tiere je Belastungsstamm oral infiziert werden (d.h. i.d.R. 120 Tiere). Die Wirksamkeit des Impfstoffes ist nachgewiesen, wenn mindestens 40% der Kontrolltiere sterben und höchstens 15% keine Krankheitssymptome aufzeigen.

Ziel der Untersuchungen war es, diesen belastenden Tierversuch durch eine *in vitro* Methode abzulösen und nach erfolgter Impfung die Bildung spezifischer Antikörper gegen die relevanten Haftantigene im Blut und Kolostrum nachzuweisen. Diese spezifischen Nachweissysteme, mit denen die gebildeten Antikörper quantitativ bestimmt werden können, sollen eine Aussage über die zu erwartende Schutzwirkung der geimpften Muttertiere und ihrer Nachkommen erlauben und damit den Belastungsversuch als Nachweis der Wirksamkeit erübrigen. Die für die *in vitro* Methode notwendige Immunisierung und nachfolgende Blutentnahme kann dagegen als äußerst gering belastend eingestuft werden.

Es wurden 8 auf dem deutschen Markt zugelassene inaktivierte *Coli*-Impfstoffe für Muttersauen untersucht. Jeweils 10 Sauen wurden mit einem Impfstoff immunisiert. Bei entsprechenden ungeimpften Kontrolltieren sollten im Vergleichszeitraum keine Antikörper nachzuweisen sein. Ein Vergleich der Antikörperkonzentration in Blut und Kolostrum des jeweiligen Muttertieres sollte eine Einschätzung über den Grad des passiven Schutzes des Neugeborenen durch die Kolostrumaufnahme erlauben. Mit der Etablierung serologischer Verfahren (ELISA) geeigneter Empfindlichkeit und Spezifität (Snodgrass et al., 1982; Jäkel, 1995; Vazquez et al., 1996) sollen die belastenden Infektionsversuche an der Zieltierart Schwein während des Zulassungsverfahrens ersetzt werden. Zum Nachweis der Antikörper in Blut- und Kolostralseren wurde ein indirekter Sandwich-ELISA entwickelt. Hierzu mußten die relevanten Fimbrienantigene hergestellt und aufgereinigt werden (Nagy, 1984; Payne et al., 1993).

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere

Tragende weibliche Schweine werden mit zugelassenen *E.coli*-Muttertierimpfstoffen gegen die neonatale Colidiarrhö entsprechend der Gebrauchsinformationen geimpft. Es kommen 8 Schweineimpfstoffe zum Einsatz. Die Tiere waren zuvor noch nie mit einem Colibacillose-Muttertierimpfstoff geimpft worden. Es stehen insgesamt 100 Tiere in 2 Ferkelaufzuchtbetrieben in Deutschland (Südhessen) für die Immunisierungen zur Verfügung. Ein Impfstoff wird an jeweils 10 Tiere appliziert. In jedem Betrieb wird eine Kontrollgruppe aus 10 ungeimpften Tieren im Versuchszeitraum gebildet.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Impfstoffe

Die verwendeten Impfstoffe wurden anhand einer Nummer (1-8) verschlüsselt. Bei den Impfstoffen handelt es sich um 7 wäßrige Lösungen und eine ölige Suspension, die unterschiedliche Mengen der Haftantigene enthalten (Tab.1). Sechs Impfstoffe enthalten F4ab, F4ac, F5 und F6. Zwei Impfstoffe enthalten zusätzlich F41. Ein Teil der Vakzine enthält noch weitere Antigene (z.B. von *Clostridium perfringens*). Je nach Herstellerangabe werden die Impfstoffe subkutan oder intramuskulär verabreicht. In Betrieb 1 werden sechs Impfstoffe, in Betrieb 2 zwei weitere Impfstoffe eingesetzt.

2.2.2 Immunisierung und Probenentnahme

Der Zeitpunkt der ersten Immunisierung liegt bei allen Impfstoffen etwa 5-7 Wochen, die zweite Impfung nicht später als 2 Wochen vor der Geburt. Den Muttertieren wird vor der ersten Impfung (Nullblut) und nach der Geburt Blut entnommen. Zeitgleich erfolgen Blutentnahmen bei den ungeimpften Kontrolltieren. Kolostrum wird unmittelbar nach der Geburt (bis spätestens 24 Std. *post partum*) möglichst aus verschiedenen Zitzen des Muttertieres gewonnen. Die Proben werden bis zu ihrer Untersuchung bei –20°C aufbewahrt.

2.2.2.1 Herstellung eines Hyperimmunserums

Für die testinterne Kontrolle der serologischen Nachweissysteme wird ein Hyper-

Tab. 1: Eingesetzte Impfstoffe

Impfstoff-Nr.	*E.coli*-Haftantigene	Andere Antigene	Adjuvans	Darreichungsform/Applikationsart
1	F4; F5; F6	thermolabiles Enterotoxoid; *Cl. perfringens* Typ C ß-Toxoid	Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/s.c.[1]
2	F4ab+ac; F5; F6	thermolabiles Enterotoxoid	Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/s.c.
3	F4ab+ac; F5; F6	*Cl. perfringens* Typ B+C ß-Toxoid; *Cl. perfringens* Typ D ε-Toxoid	Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/s.c.; i.m.[2]
4	F4ab+ac; F5; F6		Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/s.c.; i.m.
5	F4ab+ac; F5; F6	thermolabiles Toxin B-Fragment	Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/s.c.
6	F4ab+ac; F5; F6; F41		Carbopol	wässrige Suspension/s.c.; i.m.
7	F4ab+ac; F5; F6; F41		Aluminium-hydroxid	wässrige Suspension/i.m.
8	F4ab+ac; F5; F6	thermolabiles Enterotoxoid	Öl-Adjuvans	ölige Emulsion/i.m.

[1] s.c.: subkutane Anwendung
[2] i.m.: intramuskuläre Anwendung

immunserum hergestellt. Hierzu werden 10 gesunde ungeimpfte Schweine mit 5 in den Untersuchungen eingesetzten *E.coli*-Muttertierimpfstoffen dreimal im Abstand von 3 Wochen mit je einer Impfstoffdosis immunisiert. Pro Impfstoff werden jeweils 2 Tiere verwendet. Zwei Wochen nach der letzten Impfung wird von jedem Tier eine entsprechende Menge Serum gewonnen. Die Proben werden gepoolt und aliquotiert bei –20°C gelagert.

2.2.2.2 Blutproben

Die Sauen werden zur Blutentnahme mit der Oberkieferschlinge fixiert. Mit sterilen Einmalkanülen (TSK-Supra^{R}) wird die *Vena jugularis* punktiert. Die Einzelblutproben werden mindestens 30 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend zentrifugiert (10 min, 2.000 g). Das gewonnene Serum wird abpipettiert, in Kryoröhrchen portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C tiefgefroren.

2.2.2.3 Kolostrumproben

Innerhalb von 24 Std. nach der Geburt wird von jedem Tier Kolostrum möglichst von verschiedenen Zitzen gewonnen und gepoolt. Die Kolostren werden bei 4°C 1 Std. bei 4.000 U/min zentrifugiert. Mittels Wasserstrahlpumpe wird das abgesetzte Fett abgesaugt und die Probe bis zur Messung bei –20°C gelagert.

2.2.3 Anzucht und Gewinnung der Fimbrienantigene

Die *E.coli*-Stämme mit dem Fimbrienantigenen F4ab, F4ac, F5, F6 und F41 (*Central Veterinary Laboratory* [CVL], Weybridge, UK) werden zunächst 24 Std. bei 37°C in Nährbouillon angezüchtet. Einzelkolonien werden mikroskopisch und biochemisch untersucht. Die Fimbrienausbildung wird mit einem Latex-Agglutinationstest (Fimbrex, CVL) für F4, F5 und F6 überprüft. Zum Nachweis von F41 Fimbrienantigen wird ein semiquantitativer Hämagglutinationstest (HAT) mit humanen Erythrozyten (Blutgruppe A) etabliert.

Zur Gewinnung von Fimbrienantigen in ausreichender Menge wird der entsprechende *E.coli*-Stamm im Fermentor (Biostat B 10, B. Braun, Biotech Int., Melsungen, Deutschland) angezüchtet. Für die Anzucht von F4ab, F4ac und F41 positiven Stämmen wird Minca-Bouillon, für F6 exprimierende Stämme Müller-Hinton-Bouillon verwendet. Während der Fermentation wird in zeitlichen Abständen die Fimbrienausbildung der Bakterien überprüft. Nach ca. 8 Std. wird die Anzucht im Fermentor beendet. Die Bakteriensuspension wird bei 10.000 rpm 25 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert. Die gewonnenen Pellets werden in 50 mM Posphatpuffer (PB) pH 7,2 resuspendiert und gepoolt. Diese beiden letzten Arbeitsschritte werden einmal wiederholt. Die zuletzt gewonnenen resuspendierten Pellets werden bei 15.000 rpm 45 min bei 4°C erneut zentrifugiert und dekantiert. Die Pellets werden bis zur weiteren Aufreinigung bei –80°C gelagert.

Mit einer Kombination aus Hitzeschockbehandlung und anschließender Ammoniumsulfatfällung werden die Fimbrien präzipitiert. Die resuspendierten Pellets werden dialysiert und bei –80°C gelagert.

Die Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese mit anschließender Färbung sowie der Proteintransfer und Blottingmethoden dienen zum Nachweis der erfolgreichen Anzucht und Aufreinigung der entsprechenden Fimbrien. Die Bestimmung der Fimbrienkonzentration erfolgt mittels Proteinbestimmung.

2.2.4 Nachweis der Fimbrienantikörper mittels ELISA

Zum Einsatz kommt ein indirekter Sandwich-ELISA. Im ersten Schritt werden monoklonale Antikörper (mAK, CVL, Weybridge, UK) an die feste Phase (ELISA-Platte) adsorbiert, die das Antigen spezifisch binden, das zur Messung der Immunantwort im zweiten Schritt benötigt wird. Nach Auftrag des antikörperhaltigen Serums werden nur diese spezifischen Antikörper gebunden, während die unspezifischen wieder herausgewaschen werden. Der Nachweis der erfolgten Bindung erfolgt dann wieder durch Zugabe eines spezifischen enzymmarkierten Anti-IgG.

2.2.4.1 Nachweis der Fimbrienantikörper im Serum mittels ELISA

Zum Einsatz kommt ein indirekter Sandwich-ELISA für die Antigene F4ab, F4ac, F6 und F41. Auf jeder Mikrotiterplatte werden ein positiver Serumpool (Hyperimmunserum) und ein negatives Kontrollserum von spezifisch pathogen freien Tieren als testinterne Kontrolle mitgeführt.

2.2.4.2 Nachweis der Fimbrienantikörper im Kolostrum mittels ELISA

Zum Einsatz kommt ein indirekter Sandwich-ELISA für die Antigene F4ab, F4ac und F6. Als testinterne Kontrolle (Negativkontrolle) dient das Kolostrum eines ungeimpften Tieres.

2.2.5 Auswertung und Statistik

Es werden die Daten aller in den Immunisierungsversuchen eingesetzten Tiere statistisch ausgewertet. Hierzu werden die Schweine einer Impfstoffgruppe zusammengefaßt und mit der Kontrollgruppe (ungeimpfte Tiere) des jeweiligen Betriebes verglichen. Mit einem Vorzeichen-Rangtest (Wilcoxon-Test) wird die Änderung der Antikörperkonzentrationen vor und nach der Immunisierung wiedergegeben. Im Folgenden wird für jede Gruppe das geometrische Mittel der relativen Änderung der OD-Werte durch die Impfung wiedergegeben. Ein Wert >1 bedeutet, daß der Wert nach der Impfung größer ist als der entsprechende Ausgangswert. Ein Vergleich der einzelnen Impfgruppen mit der stallinternen Kontrollgruppe soll den stärkeren Anstieg der OD-Werte bei den Impftieren gegenüber den Kontrolltieren aufzeigen (Test nach Dunett).

3 Ergebnisse

Es konnten insgesamt 8 Colibacillose-Muttertierimpfstoffe für Schweine in zwei verschiedenen Betrieben geprüft werden (siehe Tab. 1). In Betrieb 1 wurden die Impfstoffe 1-6, in Betrieb 2 die Impfstoffe 7 und 8 eingesetzt. Die Fimbrienantigene F4ab, F4ac, F6 und F41 konnten in ausreichender Menge produziert und aufgereinigt werden. Die Kultivierung von F5-Antigen bereitete erhebliche Schwierigkeiten und konnte nicht im erforderlichen Umfang realisiert werden. Die hergestellten Antigene wurden für die Etablierung der serologischen Nachweissysteme verwendet.

Für den Nachweis von Antikörpern gegen die Fimbrienantigene F4ab, F4ac, F6 und F41 im Blutserum wurden ELISAs entwickelt. Der serologische Ausgangsstatus aller Tiere wurde mit der ersten Blutentnahme erfasst. Die Änderung der OD-Werte vor der ersten und nach der zweiten Impfung wurde mit einem Vorzeichen-Rangtest (Wilcoxon) untersucht. In keiner Impfstoffgruppe ließen sich in den Blutproben vor der ersten Immunisierung (Nullblut) nennenswerte Antikörper gegen die Fimbrienantigene F4ab, F4ac, F6 und F41 detektieren. Innerhalb der einzelnen Impfstoffgruppen waren deutliche Unterschiede in der Höhe der zu messenden Antikörper nach erfolgter zweimaliger Impfung feststellbar. Der Vergleich der einzelnen Impfgruppen mit der stallinternen Kontrollgruppe zeigte im geometrischen Mittel den stärkeren Anstieg der OD-Werte bei den Impftieren gegenüber den Kontrolltieren (Tab. 2). Die deutlichsten Antikörperanstiege waren in den Impfstoffgruppen 3, 4, 6, 7 und 8 zu erkennen. Die Tiere der Gruppen 1 und 5 zeigten deutlich geringere Antikörperantworten auf die Immunisierung. Fimbrienantigen F41 war lediglich in zwei der 8 Impfstoffe als antigener Bestandteil enthalten (Gruppen 6 und 7). Der Anstieg der F41-Antikörperkonzentration fiel in beiden Impfstoffgruppen gering aus. In beiden Versuchsbetrieben zeigten die entsprechenden Kontrollgruppen innerhalb des Versuchszeitraumes keine Erhöhung der Antikörperkonzentrationen. Die Ergebnisse erlauben eine Bewertung der immunologischen Antwort auf die erfolgte Immunisierung spezifisch für jeden Betrieb.

Für den Nachweis von Antikörpern gegen F4ab, F4ac und F6 im Kolostrum wurden ebenfalls ELISAs etabliert. Ein Nachweissystem für F41 konnte aus zeitlichen Gründen und wegen des Ausscheidens einer Mitarbeiterin nicht mehr getestet werden. Durch die Probenart (Kolostrum) bedingt war im Versuchszeitraum ein Vergleich zwischen Kolostren im ungeimpften und geimpften Zustand desselben Tieres nicht möglich. Die Ergebnisse erbrachten den Nachweis, daß durch Impfung der Muttertiere erhöhte Antikörperkonzentrationen im Kolostrum nachweisbar sind. Auch hier zeigten die Tiere aus den Impfstoffgruppen 3, 4, 6, 7 und 8 relative höhere Antikörperkonzentrationen im Vergleich zu den übrigen Impfstoffgruppen (Tab. 3).

Der Vergleich der ELISA-Ergebnisse der 2. Blutprobe und des Kolostrums pro Impfstoffgruppe ergab eine Korrelation zwischen Antikörperkonzentration im Blutserum und der Kolostrumprobe des jeweiligen Tieres (Abb. 1). Hohe Kon-

Tab. 2: ELISA-Ergebnisse im Blutserum: Vergleich der Impfstoffgruppen mit der stallinternen Kontrolle

	F4ab		**F4ac**		**F41**		**F6**	
	Geometrisches Mittel*	p-Wert	Geometrisches Mittel*	p-Wert	Geometrisches Mittel*	p-Wert	Geometrisches Mittel*	p-Wert
Betrieb 1								
Impfstoff 1	2,157	<0,0001	3,352	<0,0001	n.u.		2,449	0,0071
Impfstoff 2	4,306	0,0080	5,460	<0,0001	n.u.		2,146	0,0284
Impfstoff 3	10,932	<0,0001	9,975	<0,0001	n.u.		3,059	0,0004
Impfstoff 4	8,546	<0,0001	6,772	<0,0001	n.u.		3,202	0,0005
Impfstoff 5	2,384	0,0021	3,166	0,002	n.u.		1,693	0,2151
Impfstoff 6	2,837	0,0003	3,710	0,0001	1,183	0,4770	2,712	0,0030
Betrieb 2								
Impfstoff 7	3,796	<0,0001	4,173	<0,0001	1,537	0,0131	1,028	0,9890
Impfstoff 8	7,930	<0,0001	5,988	<0,0001	n.u.		4,686	<0,0001

* -LSMEANS-Schätzer: Änderung relativ zur Kontrolle; n.u. = nicht untersucht

Tab. 3: ELISA-Ergebnisse im Kolostrum: Vergleich der Impfstoffgruppen mit der Stallkontrolle

	F4ab		**F4ac**		**F6**	
	Geometrisches Mittel*	p-Wert	Geometrisches Mittel*	p-Wert	Geometrisches Mittel*	p-Wert
Betrieb 1						
Impfstoff 1	0,160	0,0945	0,244	<0,0001	0,194	0,0007
Impfstoff 2	0,356	0,0002	0,474	<0,0001	0,148	0,0060
Impfstoff 3	1,119	<0,0001	0,688	<0,0001	0,427	<0,0001
Impfstoff 4	0,885	<0,0001	0,769	<0,0001	0,786	<0,0001
Impfstoff 5	0,232	0,0069	0,234	<0,0001	0,093	0,0947
Impfstoff 6	0,847	<0,0001	0,606	<0,0001	0,474	<0,0001
Betrieb 2						
Impfstoff 7	0,831	<0,0001	0,415	<0,0001	0,052	0,1488
Impfstoff 8	1,548	<0,0001	0,772	<0,0001	1,083	<0,0001

* -LSMEANS-Schätzer: Änderung relativ zur Kontrolle

zentrationen im Blut korrelierten mit hohen Kolostralspiegeln. In den Kontrollgruppen waren weder im Blutserum noch in der Muttermilch Antikörper messbar. Zur besseren Veranschaulichung werden die Kontrollgruppen in Abb. 1 in einer Säule zusammengefasst.

4 Diskussion

Durchfallerkrankungen bei Saugferkeln können in Aufzuchtbetrieben erhebliche Verluste verursachen. Für eine erfolgreiche Immunprophylaxe stehen verschiedene zugelassene Muttertier-Impfstoffe zur Verfügung. Für die Zulassung dieser immunologischen Arzneimittel sind zahlreiche gesetzliche Vorgaben zu erfüllen und u.a. auch umfangreiche Tierversuche durchzuführen.

Es war Ziel dieses Forschungsprojektes, durch eine Messung der Antikörper gegen die Impfantigene im Blutserum geimpfter Muttertiere und ungeimpfter Kontrolltiere Alternativmethoden zu den gesetzlich geforderten Infektionsversuchen an Ferkeln zu entwickeln. Da die Pathogenitäts- und Immunitätsmechanismen der Colibacillose bekannt sind, könnte der Belastungsversuch hier als Wirksamkeitskriterium in der Impfstoffprüfung durch *in vitro* Methoden ersetzt werden. Die beim Schwein für die Colibacillose verantwortlichen Fimbrienantigene F4ab, F4ac, F5, F6 und F41 sind von zahlreichen Autoren beschrieben und charakterisiert (Ørskov et al., 1977; Isaacson et al., 1980; Gaastra et al., 1982). Es konnten die Fimbrienantigene F4ab, F4ac und F6 durch Fermentation in großer Menge produziert werden. Durch die Beschichtung der ELISA-Platten mit den entsprechenden mAks wurde die Spezifität und Sensitivität der Nachweissysteme (ELISA) erhöht, um auch mögliche natürlich vorkommende Antikörper zu erfassen.

Die Fähigkeit zur Antikörpersteigerung im Blutserum und Kolostrum nach Immunisierung mit inaktivierten Fimbrienantigenen wurde bereits von Isaacson et al. (1980) und Wieda et al. (1987) untersucht. Die Bildung von Antikörpern weist auf die immunologische Auseinandersetzung des Organismus mit den entsprechenden Fimbrienantigenen aufgrund einer Infektion oder Immunisierung hin. Da bei unseren Immunisierungsversuchen in den Proben vor der ersten Impfung keine Antikörper detektierbar waren, sind die Antikörperanstiege nach erfolgter 2. Immunisierung

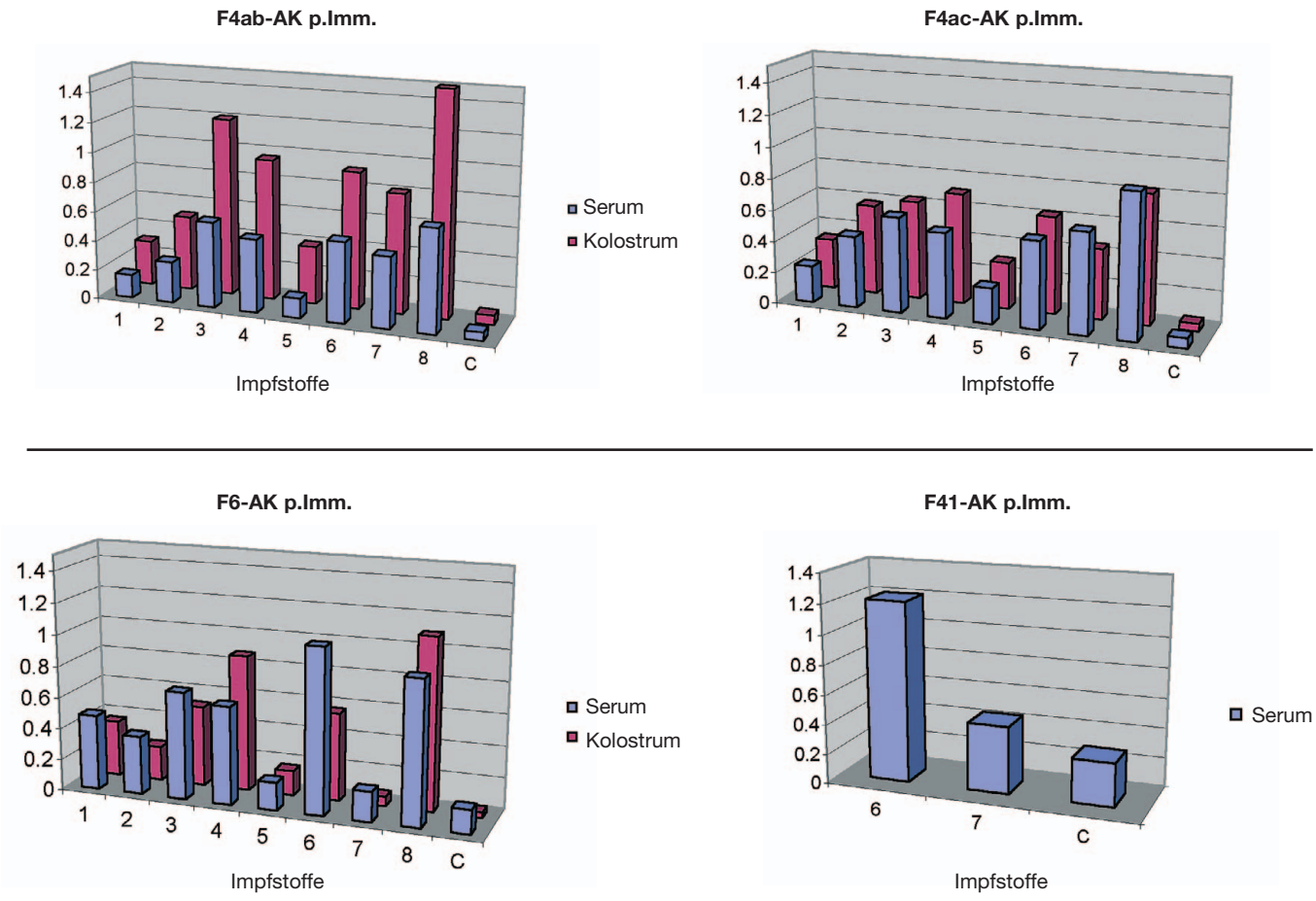

Abb.1: Korrelation der Antikörperkonzentrationen nach Immunisierung (AK p.Imm.) in Blutserum und Kolostrum der Impfgruppen (1-8) und der Kontrollgruppe (C).

auf die Applikation des Impfstoffes zurückzuführen. Die ungeimpften Kontrolltiere bildeten im Versuchszeitraum keine Antikörper. Statistisch signifikante Anstiege der Antikörpertiter zeigten sich gegen alle in den Impfstoffen enthaltenen Fimbrienantigene. Gegen F4ab und F4ac entwickelten die geimpften Tiere die höchsten Antikörperkonzentrationen. F41 wird allgemein als Adhäsin mit schwachen antigenen Eigenschaften bewertet und rief nur eine geringe Immunantwort hervor. Aufgrund der für jedes Fimbrienantigen sehr unterschiedlichen Höhe der Antikörperantworten in den verschiedenen Impfstoffgruppen konnte kein *cut-off*-Wert festgelegt werden. Da es sich um zugelassene Impfstoffe handelt, ist ihre Wirksamkeit im Belastungsversuch belegt worden. Die Verschiedenheit der einzelnen Impfstoffe in der Zusammensetzung der Antigenkomponenten, des Antigengehalts, der Natur des Adjuvans und der Art der Applikation muss hier berücksichtigt werden. Auch die individuelle Reaktion des Impftieres ist wesentlich für den Erfolg einer Immunisierung. Es ist bekannt, daß gelegentlich einzelne Tiere nach Impfungen keinen Immunschutz aufbauen können (sog. *non-responder*). Auch andere exogene (Fütterung und Futterzusammensetzung, Haltungsbedingungen) und endogene (Hormonstatus, hereditäre immunologische Aspekte) Faktoren können die Antikörperproduktion beeinflussen.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde die Möglichkeit eröffnet, Infektionsversuche an Ferkeln bei der Prüfung von Colibacillose-Muttertierimpfstoffen durch serologische Methoden zu ersetzen. Die entwickelten Ersatzmethoden könnten nach ihrer Validierung einen entscheidenden Beitrag zum *Refinement* eines Tierversuchs leisten, da die Immunisierung und die erforderlichen Blutentnahmen bei Sauen vergleichsweise gering belastende Maßnahmen darstellen. Ein weiterer Vorteil der *in vitro* Methode ist die Reduzierung der Tierzahlen für die Wirksamkeitsprüfung. Die gewonnenen Serumproben können zur Antikörperuntersuchung gegen alle Antigene benutzt und wiederholt im Testsystem ELISA ohne weiteren Tierversuch untersucht werden. Durch diese serologischen Verfahren kann zudem eine erhebliche Kostenreduktion erreicht werden.

Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich ein genereller *cut-off*-Wert zur Bewertung der Wirksamkeit für die einzelnen Antigene nicht definieren, da unsere Untersuchungen z.T. sehr unterschiedliche Ergebnisse in den Antikörpertitern der einzelnen Impfstoffgruppen ergaben. Stattdessen könnte für jeden einzelnen Impfstoff und seine enthaltenen Antigene ein solcher Wert festgelegt werden, um dann in eventuell folgenden Zulassungsverfahren (z.B. für Kombinations-Impfstoffe) Anwendung zu finden.

In den Allgemeinen Vorschriften des Europäischen Arzneibuchs (*Ph.Eur.*) wird die Möglichkeit aufgezeigt, mit Zustimmung der zuständigen Behörden alternative Methoden einzusetzen, wenn diese sicherstellen, dass die Substanz den Anforderungen entspricht. Die Impfstoffhersteller sollen ermutigt werden, die Zustimmung der zuständigen Behörden bei der Etablierung von alternativen Methoden einzuholen.

Literatur

Gaastra, W. and De Graaf, F. K. (1982). Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiological Reviews*, 129-161.

Isaacson, R. E., Dean, E. A., Morgan, R. L. and Moon, H. W. (1980). Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified K99 or 987P pili: antibody production in response to vaccination. *Infection and Immunity 29 (2)*, 824-826.

Jäkel, C. (1995). Entwicklung eines Sandwich-ELISA zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen die Fimbrienantigene K88, K99 und 987P von E.coli. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenzeitschr. 108*, 221-223.

Nagy, B. (1984). Bedeutung von Pilus-(Fimbria)-Vakzinen in der Human- und Veterinärmedizin. *Magyar Állatorvosok Lapja 39 (3)*, 131-136.

Monographie des Europäischen Arzneibuchs Nr. 962: Neonatal piglet colibacillosis vaccine (inactivated).

Ørskov, I., Ørskov, F., Jann, B. and Jann, K. (1977). Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. *Bact. Rev. Vol. 41 No.3*, 667-699.

Payne, D., Moore, N. and Lambert, P. (1993). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to measure the expression of the K88 fimbrial antigen by enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC). *Journal of Immunological Methods 159*, 283-289.

Snodgrass, D. R., Nagy, L. K., Sherwood, D. and Campbell, I. (1982). Passive immunity in calf diarrhoea: vaccination with K99 antigen of enterotoxigenic Escherichia coli and Rotavirus. *Infection and Immunity 37*, 586-591.

Vázquez, F., González, E. A., Garabal, J. I. et al. (1995). Development and evaluation of an ELISA to detect Escherichia coli K88 (F4): fimbrial antibody levels. *J. Med. Microbiol. 44*, 453-463.

Wieda, J., Bengelsdorf, H.-J., Bernhardt, D. and Hungerer, K.-D. (1987). Antibody levels in milk of vaccinated and unvaccinated cows against organisms of neonatal diarrhoea. *J. Vet. Med. B 34*, 495-503.

Danksagung

Dieses Forschungsprojekt wurde mit den Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0312234/5 gefördert. Weiterhin danken wir Frau Dr. Vollmer (Schweinegesundheitsdienst-Südhessen) für die Kontaktvermittlung mit den beiden Betrieben, in denen die Immunisierungsversuche durchgeführt wurden.

Korrespondenzadresse

Dr. Marion Krug
Paul-Ehrlich-Institut
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59
D-63225 Langen
Tel.: +49-61-03-77 3803
Fax: +49-61-03-77 1265
E-Mail: kruma@pei.de