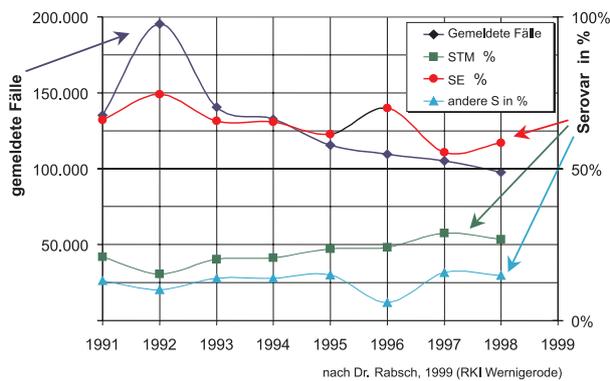


Ein Beitrag für den Verbraucherschutz: TAD Salmonella vac[®] E- ein neuer Lebendimpfstoff für Hühner gegen Salmonella Enteritidis

Dr. Ilka Hahn (Cuxhaven)

Obwohl die Salmonella-Befundhäufigkeit beim Menschen in Deutschland rückläufig ist und 1998 erstmalig unter 100.000 registrierten Fällen lag, ist Salmonella Enteritidis (S.E.) mit 58 % die am häufigsten nachgewiesene Serovar (Rabsch, 1999).

Abbildung 1: Inzidenz von Salmonella-Isolaten beim Menschen in Deutschland



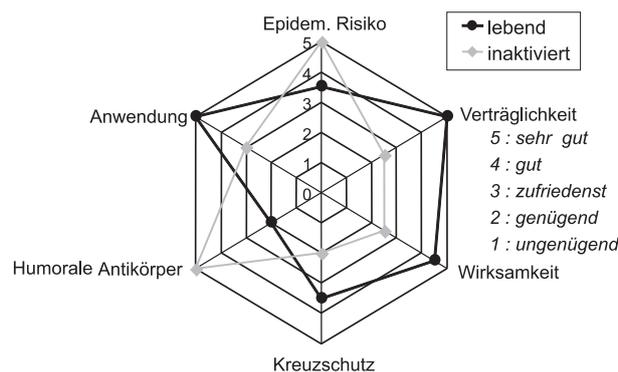
Nach wie vor werden menschliche Infektionen mit dem Verzehr von unsachgemäß zubereiteten, zu lange und mangelhaft gelagerten Rohfleischspeisen in Verbindung gebracht.

In der Hühner-Salmonellen-VO vom 11. April 1994 (BGBl. I. S. 770) ist in § 2 vorgeschrieben, alle Junghennen in Aufzuchtbetrieben mit mehr als 250 Tieren gegen Salmonellen zu impfen.

Vergleich Lebend-/Inaktivat-Impfstoff

Für die Salmonellen-Impfung stehen dem Anwender Lebend- und Inaktivat-Impfstoffe zur Verfügung. Nachfolgende Grafik zeigt einen Vergleich beider Vakzinen nach Kriterien des Praxiseinsatzes.

Abbildung 2: Vergleichs-Diagramm Lebend- und Inaktivat SE-Impfstoffe



Somit hat ein Inaktivat-Impfstoff, der abgetötetes Antigen und ein die Immunantwort verstärkendes Adjuvans enthält, gegenüber Lebendimpfstoffen ein geringeres epidemiologisches Risiko und besitzt die Potenz zur Ausbildung hoher humoraler Antikörper-Titer. Letztere stehen aber bei Salmonella-Infektionen nur bedingt in Korrelation mit der Wirksamkeit. In Folge des intrazellulären Parasitismus des Erregers müssen effektive Vakzinen zu einer nachhaltigen Stimulierung zellvermittelter Immunreaktionen führen, was nachweislich am besten mit Lebendimpfstoffen gelingt (Selbitz et al., 1995).

Diese Aussage wurde in einem Wirksamkeitsversuch, in dem vergleichend verschiedene Inaktivatimpfstoffe und der Lebendimpfstoff geprüft wurden, bewiesen.

Die Ergebnisse belegen, daß nur der Lebendimpfstoff eine Organmanifestation und Ausscheidung des Infektionsstammes verhindert bzw. im Vergleich mit ungeimpften Kontrollen reduziert (s. Tab. 1, Abb. 3, 4, 5).

Tabelle 1: Vergleichende Wirksamkeit von S.E. Lebend- und Inaktivat Impfstoffen

Gruppe	SE-Vakzine	Typ	Dosis	Applikation
1	inakt. 1	kommerziell	0,1 ml	i.m.
2	inakt. 2	kommerziell	0,1 ml	s.c.
3	inakt. 3	experimentell	0,1 ml	s.c.
4	inakt. 4	stallspez.	0,1 ml	s.c.
5	lebend	registriert	1 x 10 ⁸ cfu	oral
Kontrolle	-	-	-	-

Tiere: SPF Eintagsküken, 20 je Gruppe
Challenge: 15. Tag post vaccinationem, oral SE, 5 x 10⁹ cfu*

* SE Nal^{res} (K285/94) zur Verfügung gestellt von Dr. U. Methner, Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin 184

Abbildung 3: Persistenz des Challenge-Stammes in der Leber, 5 Tage post infectionem

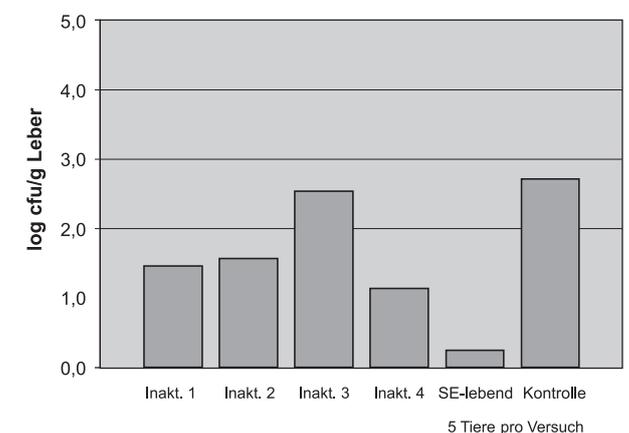


Abbildung 4: Ausscheidung des Challenge-Stammes (Kloakentupfer)

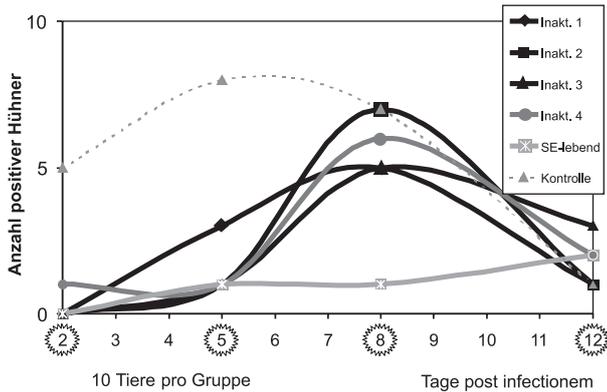
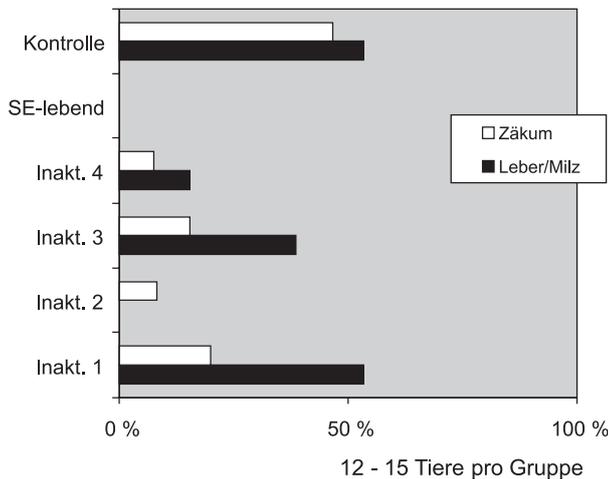


Abbildung 5: Persistenz des Challenge-Stammes in Organen (2 Wochen post infectionem)



Ein weiterer Vorteil von Lebendimpfstoffen ist die Möglichkeit der Applikation über das Trinkwasser, was zum einen ohne Streß für die Tiere und mit einem geringen Arbeitsaufwand für das Impfpersonal verbunden ist. Zum anderen wird über den oralen Applikationsweg die natürliche Infektionspforte nachvollzogen.

Durch die Persistenz des Impfstammes im Organismus werden mehrere Abwehrmechanismen induziert, so daß Lebendimpfstoffe auch in der Lage sind, Kreuzimmunitäten zu erzeugen. So wird von einem *S. Typhimurium* (*S. Tm.*)-Lebendimpfstoff aus den USA berichtet, der neben *S. Tm.* auch gegen *S. Heidelberg* und *S. E.* schützt (Hassan und Curtiss III, 1994). Eigene Experimente mit TAD *Salmonella vac*[®] T (*S. Tm.*-Lebendimpfstoff) weisen ebenfalls einen Kreuzschutz gegen *S. E.* aus, der aber mit zunehmenden Lebensalter der Impflinge abnimmt und unter dem homologen Schutz liegt.

TAD *Salmonella vac*[®] E

Grundlage jedes *Salmonella*-Lebendimpfstoffes ist ein Bakterienstamm, bei dem sich bei erhaltener Vermehrungsfähigkeit ein weitgehender Virulenzverlust mit guter Immunogenität verbindet.

Stoffwechselflucht-Mutation

TAD *Salmonella vac*[®] E wurde auf der Basis des von Linde et al. (1993) beschriebenen Prinzips der Stoffwechselflucht-Mutation entwickelt. Hier handelt es sich um Minus-Mutationen in essentiellen Enzymen und Stoffwechselschaltzentralen des Bakteriums, in deren Folge die daraus resultierenden Stoffwechselabläufe zu verlängerten Generationszeiten und entsprechenden Virulenzreduktionen führen. Im konkreten Fall von TAD *Salmonella vac*[®] E verlängert sich die Generationszeit von 22 min. beim Ausgangsstamm auf 28 min. beim Impfstamm.

Da Stoffwechsel-Kompartimente bekanntlich Angriffspunkte für Antibiotika sind, leitet sich daraus auch deren therapeutische Nutzung ab. Die Folge der mutativen Strukturveränderungen ist nicht nur die Attenuierung, sondern als gleichzeitige Nebenwirkung eine mit dem Bindungsverlust für Antibiotika einhergehende, therapeutisch unbedenkliche und nur zur Impfstamm-Erkennung genutzte Antibiotika-Resistenz (Linde et al., 1996).

Zusätzlich zur Stoffwechselflucht-Mutation besitzt der Impfstamm eine Zellmembran-Mutation, welche deren Permeabilität für Erythromycin sowie für andere Antibiotika und Noxen erhöht.

Diagnostik

Die Abgrenzung von Impfstämmen gegenüber Wildstämmen ist anhand der eingebauten Marker denkbar einfach. Der Impfstamm wächst infolge seiner Stoffwechselflucht-Marker (Resistenz-Marker) auf Nährböden mit Rifampicin und Streptomycin und zeigt kein Wachstum auf Medien mit Erythromycin. Die Wildstämme ohne genetische Veränderungen verhalten sich in ihrem Wachstum genau umgekehrt.

Tabelle 2: Differenzierung zwischen TAD *Salmonella vac*[®] E und S.E.-Feldstämmen

Antibiotikum	Konzentration	Impfstamm	Feldstamm
Streptomycin	200µg/ml	resistent	sensitiv
Rifampicin	200µg/ml	resistent	sensitiv
Erythromycin	15µg/ml	sensitiv	resistent

Einschränkend muß erwähnt werden, daß - bedingt durch die Zellmembran-Mutation - der Impfstamm auf nicht allen in der *Salmonella*-Diagnostik gebräuchlichen Selektivnährmedien wächst. Auf den in der Veterinärmedizin üblichen Nährböden wie BPLS-, Gaßner- und XLD-Agar besteht jedoch keine Hemmung des Wachstums.

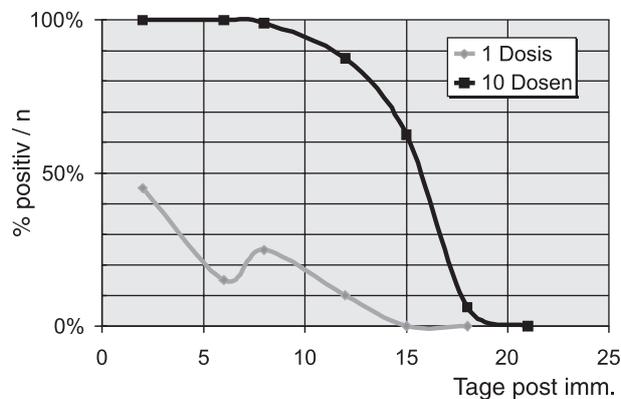
Sicherheit

TAD *Salmonella vac*[®] E besitzt durch drei voneinander unabhängigen Mutationen eine nach statistischer Treffersicherheit absolute Stabilität gegen die Gefahr der Rückmutation zum Wildstamm unter Praxisbedingungen. Da die Gesamtstabilität aller drei Marker als das Produkt der Stabilitäten der einzelnen Marker (wenigstens 10⁻⁸, Kaplan, 1969) ermittelt werden kann, beträgt diese somit 10⁻²⁴.

Um die entscheidenden Vorteile eines Lebendimpfstoffes voll zur Wirkung zu bringen, muß sich ein Impfstamm eine gewisse Zeit im Organismus des geimpften Tieres vermehren. Diese manchmal etwas mißverständlich als Restvirulenz bezeichnete Eigenschaft steht in enger Wechselbeziehung zur Immunität. Vom richtigen Verhältnis dieser beiden Eigenschaften zueinander hängt nicht nur die Wirksamkeit, sondern auch die Sicherheit eines Impfstoffes ab.

Die Dauer der Ausscheidung des Impfstammes wurde mittels bakteriologischer Untersuchung von Kloakentupfern geprüft. In Abhängigkeit von der Dosis wurde 2 Wochen post imm. nur bei Tieren, die die 10 fache Immunisierungsdosis erhalten haben, der Impfstamm noch nachgewiesen. Nach 21 Tagen betrug die Ausscheidung in dieser Gruppe ebenfalls 0 %.

Abbildung 6: Ausscheidung des Impfstammes (Kloakentupfer)



Tiere: SPF Eintagsküken
 Impfung: 1. Tag, oral, eine Dosis bzw. 10 Dosen

Im Mittelpunkt einer weiteren Studie stand die Prüfung der Frage, ob der Impfstamm auf das Ei übertragen wird. Dazu wurden 40 bereits legende SPF-Hennen oral mit der einfachen und 10 fachen Dosis TAD Salmonella vac® E immunisiert.

Über einen Zeitraum von 3 Wochen post imm. wurden 641 Eier bakteriologisch (getrennte Anreicherung von Eischale, Eiweiß und Eigelb) untersucht. Es wurde in keiner Probe der Impfstamm nachgewiesen. Die vorgeschriebene Wartezeit zwischen Immunisierung und Schlachtung bzw. Eiabgabe beträgt inklusive einer Sicherheitsspanne 21 Tage.

Verträglichkeit

TAD Salmonella vac® E erwies sich nach oraler Applikation über das Tränkwasser in Feldversuchen an 795 000 Hühnern als unbedenklich. Darüber hinaus wird jede Charge in der 10 fachen Dosis an Eintagsküken, als die für Salmonellen empfindlichsten Spezies, geprüft.

Vor allem unter dem Aspekt, daß TAD Salmonella vac® E versehentlich von anderen Tierarten aufgenommen werden kann, wurden Verträglichkeitsstudien an Enten, Puten, Kälbern und Schweinen durchgeführt. Dabei führte der Impfstoff zu keinen Störungen des Allgemeinbefindens bei diesen Tieren.

Wirksamkeit und Dauer der Immunität

Da die Impfung die Tiere über die gesamte Legeperiode vor einer Ansiedlung von S.E.-Stämmen schützen soll, wurde die Dauer der Immunität in folgendem Versuch geprüft (s. Tab 3, Abb. 7 - 9).

Tabelle 3: Wirksamkeit und Dauer der Immunität von TAD Salmonella vac® E

Impfschema:

Gruppe	1. Tag	6. Woche	16. Woche
1	SE-lebend oral	SE-lebend oral	SE-lebend s.c.
2	SE-lebend oral	SE-lebend oral	SE-lebend i.m.
Kontrollen	-	-	-

* SE Na^{res} (K285/94) zur Verfügung gestellt von Dr. U. Methner, Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin 184

Tiere: Mastelertiere, 18 pro Gruppe
 Challenge: mit 60 Wochen (= 44 Wochen nach der 3. Impfung); oral SE, 1 x 10¹⁰ cfu*

Die Ergebnisse weisen aus, daß die Impflinge am Ende der Legeperiode (60. Lebenswoche) vor einer experimentellen S.E.-Infektion dahingehend geschützt waren, daß eine Persistenz des Infektionsstammes in der Leber weitgehend verhindert und die Ausscheidung um ca. zwei Zehnerpotenzen im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert ist. Nach

Abbildung 7: Persistenz des Challenge-Stammes in der Leber 5 Tage post infectionem

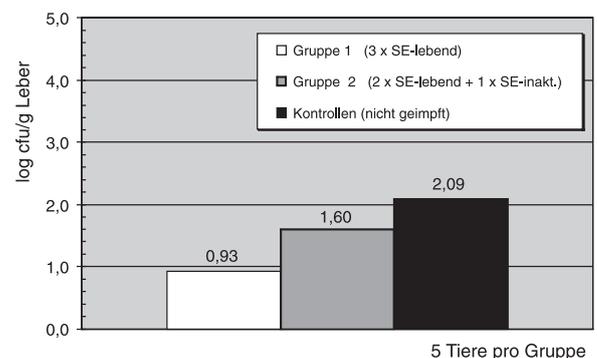


Abbildung 8: Ausscheidung des Challenge-Stammes im Kot

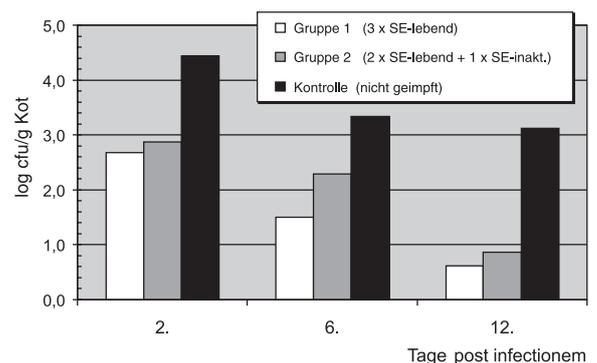
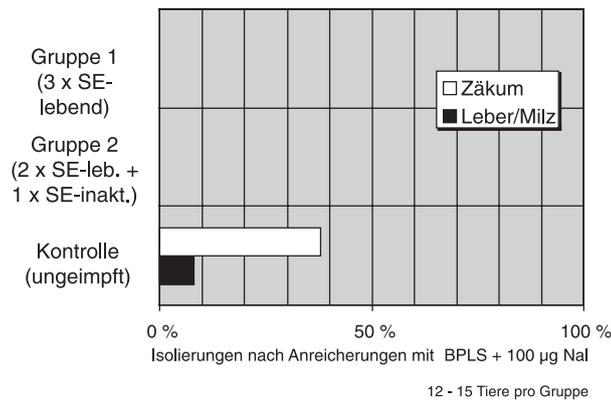


Abbildung 9: Persistenz des Challenge-Stammes in Organen, 2 Wochen post infectionem



Dorn ist damit eine Forderung erfüllt, die an die Effektivität von Maßnahmen zur Salmonella-Bekämpfung gestellt wird. Durch eine reduzierte Persistenz und Erregerausscheidung in einem immunisierten Bestand kommt es letztendlich zu einem Abriß der Infektketten und damit zu einer Minimierung des Eintrages von Salmonellen in Lebensmittel tierischen Ursprungs.

Die in der Geflügelproduktion hauptsächlich bei Elterntieren weit verbreitete kombinierte Anwendung von Lebend- und Inaktivimpfstoffen ist daher auch bei Salmonella-Impfungen effektiv (Vielitz et al., 1995).

Impfprogramm

Anhand der durchgeführten Versuche läßt sich nachfolgend dargestelltes Impfschema ableiten und empfehlen. Dabei wird besonders auf die Anwendung zum frühestmöglichen Zeitpunkt nach dem Schlupf hingewiesen, um eine Ansiedlung von Feldstämmen zu verhindern.

Tabelle 4: Impfschema - Empfehlungen für Impfungen gegen SE

Alter	Legehennen	Elterntiere
1. Tag	TAD Salmonella vac® E oral	TAD Salmonella vac® E oral
6.-8. Woche	TAD Salmonella vac® E oral	TAD Salmonella vac® E oral
16.-18. Woche	TAD Salmonella vac® E oral	Inaktivat-SE-Vakzine i.m.

Schlußfolgerungen

In den durchgeführten Versuchen erwies sich TAD Salmonella vac® E als genetisch stabil, verträglich und wirksam. So wurde basierend auf diesen Ergebnissen vom Paul-Ehrlich-Institut im Juli 1999 die Zulassung in der BRD erteilt.

Damit steht der Geflügelwirtschaft ein weiteres wichtiges Instrument zur Salmonella-Bekämpfung zur Verfügung. Besonders ist dabei der homologe Schutz gegen S. Enteritidis als die beim Menschen dominierende Serovar hervorzuheben.

Generell ist aber jeder Impferfolg nur in einem engen Zu-

sammenhang mit der Optimierung der Haltungsbedingungen und der Einhaltung aller hygienischen Voraussetzungen zu sehen.

Weiterhin läßt sich die Gesamtbelastung eines Hühnerbestandes mit Salmonellen nur durch längerfristige lückenlose Impfung der Herden senken, was letztendlich zu einer Minimierung des Eintrages von Salmonellen in Lebensmittel tierischen Ursprungs führt. Damit leistet TAD Salmonella vac® E gleichzeitig einen wirksamen Beitrag zum Verbraucherschutz.

Literatur

Dorn, persönliche Mitteilung

Hassan, J.O. and Curtiss III, R. (1994): Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent S.typhimurium strain to protect chickens against challenge with homologous and heterologous Salmonella serotypes. *Inf. Imm.*, 62, 5519-5527

Linde, K., Beer, J. und Randhagen, B. (1993): Salmonella Lebendimpfstoffe für Hühner. Europäische Patentanmeldung No 93, 114221.0

Kaplan, 1969: Molekulare Mechanismen in: Wieland, Th. Pfeleiderer, G.: Molekularbiologie, Umschau Verlag III, Auflage 1, Frankfurt/Main, S. 69-81

Linde, K., Hahn, I. und Vielitz, E. (1996): Entwicklung von optimal für das Huhn attenuierte Salmonella-Lebendimpfstoffe. *TU Hannover*, 51, 23-31

Rabsch, 1999: persönliche Mitteilung

Selbitz, H.-J., Sinell, H.-J. und Sziegoleit, A. (1995): Das Salmonellen-Problem. *Vet. Special, Gustav-Fischer-Verlag*

Vielitz, E., Hahn, I., Conrad, C. und Voß, M. (1995): Weitere Erfahrungen bei der Anwendung von Salmonella-Impfprogrammen. *Lohmann Information*, Mai-August 1995, 3-5