

## Krankheitsvorsorge durch Impfen - ein Ausblick

Dr. Pieter Harmen Flore (Cuxhaven)

Das Impfen von Nutztieren gehört zu den erfolgreichsten Maßnahmen in der Tierhaltung. Natürlich darf man nicht außer Acht lassen, dass das Hygienemanagement eine sehr wichtige Komponente der Tierseuchenbekämpfung ist und bleibt. Daneben ist auch klar, dass der Verbraucherschutz und die Verbraucherakzeptanz immer mehr in den Vordergrund rücken und der Einsatz von Antibiotika und Kokzidiostatika immer kritischer betrachtet wird. Krankheiten werden auch zukünftig, trotz aller Anstrengungen bei der tierischen Produktion, nicht vermeidbar sein. Sie werden in Zukunft bei den unterschiedlichen Haltungsformen ideale Nährböden finden und deshalb dürfte ihre wirtschaftliche Bedeutung sogar steigen. Daneben birgt die Einfuhr von Tieren und tierischen Produkten aus Ländern, wo die Tierseuchenbekämpfung und Kontrolle nicht so straff organisiert ist wie in Westeuropa, Risiken durch die Einschleppungsgefahr. Eine Liste solcher Erkrankungen enthält die erste Tabelle (Tab. 1).

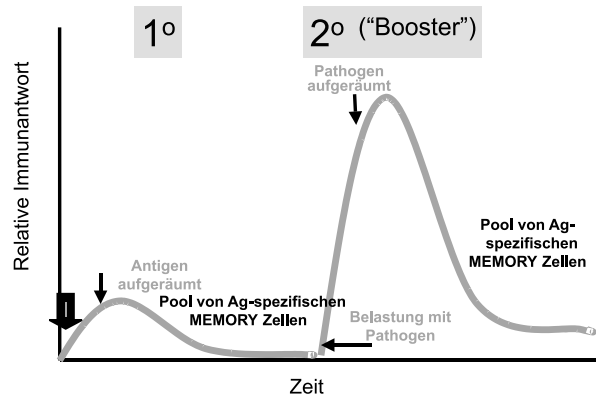
**Tabelle 1: „Neue“ Erreger und Krankheiten**

- Histomoniasis
- Ornithobacterium rhinotracheale
- Campylobacter jejuni
- Eimeria spp.
- Erysipelas spp.
- E. coli spp.
- Clostridium spp.
- Avian pneumovirus
- Chikken anaemia virus
- Avian leucosis virus-J
- Enteric reovirus strains
- Poxvirus
- vv+ Marek Disease virus

Auch weil es heute schon bei der Bekämpfung einiger Erreger an zugelassenen klassischen Tierarzneimitteln mangelt, sehen wir große Möglichkeiten für Impfstoffe. Impfstoffe sind biologische Produkte, die Antigene von Viren, Bakterien oder Parasiten in lebender oder abgetöteter Form enthalten. Es gibt natürlich noch andere Möglichkeiten Tierseuchen zu bekämpfen: natürliche Durchseuchung mit virulenten Erregern, was zur unkontrollierten Ausbreitung dieser Erreger führen kann; oder die Ausrottung der infizierten Bestände, was bei den Verbrauchern immer weniger auf Verständnis stößt.

Impfstoffe werden an Tieren appliziert, damit sie schon vor einer eventuellen Erkrankung mit virulenten Formen dieses Erregers eine Immunantwort vorbereiten können. Die geimpften Tiere bauen dann einen Schutz auf und sind damit vor diesen Erregern gefeit. Das ist der sogenannte „Booster“-Effekt (Abb. 1). Diese Antigene können mit immuno-stimulierenden Stoffen, sogenannten Adjuvantien, versetzt werden, um ihre immunologische Antwort im Tier zu steigern. Man soll übrigens immer prophylaktisch impfen und zwar flächendeckend den ganzen Bestand. Auch soll nochmals deutlich gesagt werden, dass man nicht allein auf die Impfstoffe setzen darf. Für den Herdenschutz muss die gesamte Hygiene auf einen hohen Stand gebracht werden, um hohe Leistungen zu erreichen.

**Abbildung 1: Immunantwort nach Impfung/Infektion**

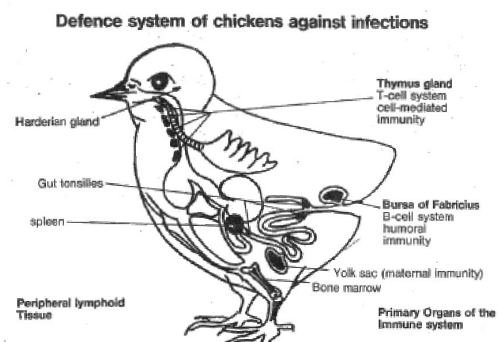


Das Prinzip „Schutz durch Impfung“ ist seit hundert Jahren bekannt, wurde aber in der Tierhaltung erst angewendet, als deutlich war, dass bestimmte virale Erreger nicht mit anderen Mitteln zu bekämpfen sind.

Die immunologische Kenntnis, die hinter einem Impfstoff steckt, ist mittlerweile für viele Tierarten sehr umfassend, aber das Immunsystem eines Huhnes ist noch vergleichsweise unbekannt. Die LAH arbeitet mit vielen Wissenschaftlern im In- und Ausland auf diesem interessanten Gebiet zusammen.

Die biologische Grundlage beim Huhn sind komplexe Zellsysteme und ihre Funktionen, das sogenannte B-Zell- und T-Zellsystem. Lymphozyten, die im Knochenmark entstehen, wandern in die Bursa Fabricius, bzw. die Thymusdrüse, und differenzieren dort zu B- bzw. zu T-Zellen. Von diesen Organen erfolgt eine Besiedlung anderer lymphatischer Zellsysteme im ganzen Körper. B-Lymphozyten reifen zu Plasmazellen, die Antikörper produzieren, und zu sogenannten Memory Zellen, die ihre Abwehrfunktion bei wiederholter Antigenwirkung („Boostering“) entfalten. T-Lymphozyten differenzieren zu Effektorzellen, die nach Sensibilisierung die Fähigkeit erlangen, infizierte Zellen zu eliminieren sowie zu T-Helferzellen, die mit den Plasmazellen die Immunkörperproduktion bewirken und zu T-Suppressorzellen, die die B- und T-Zellaktivität regulieren (Abb. 2) (VIELITZ, 1985).

**Abbildung 2: Schutzmechanismen des Huhnes**



Beim Huhn finden wir IgM Antikörper, die schnell nach einer Impfung oder Infektion entstehen; IgG Antikörper die davon später abgespalten worden sind und in großen Mengen im Huhn zirkulieren und oft einfach mittels serologischer Tests nachgewiesen werden können und IgA Antikörper, die sowohl systemisch als mukosal auf der Schleimhaut zu finden sind und eine große Bedeutung bei der ersten Abwehr gegen infizierende Erreger haben. Die T-Zell-vermittelte Immunität wird immer mehr als die wichtigste Komponente des Immunabwehrsystems angesehen, sie ist aber leider schwierig zu analysieren.

Es gibt mittlerweile viele Möglichkeiten, um unter Nutzung der oben kurz erwähnten immunologischen Kenntnisse, immer bessere Impfstoffe zu entwickeln. Man unterscheidet zwischen lebenden, d. h. vermehrungsfähigen und inaktivierten, d. h. toten Impfstoffen, und dies jeweils konventionell oder „modifiziert“, d. h. DNA-, Subunit- und Vektor-Impfstoffe. Man kann Impfstoffe, je nach Typ des Antigens in Zellen, Eiern, Pflanzen, Tieren, Insekten und in Fermentoren herstellen. Bei all diesen Impfstoffen und Produktionsvarianten gibt es Vor- und Nachteile, die in diesem Zusammenhang nicht ausführlich besprochen werden können.

Für die Anwender ist aber das Allerwichtigste, dass der Impfstoff sicher ist, einfach zu applizieren ist und wirkt. Die Qualität wird gewährleistet, indem die Produkte unter Good Manufacturing Practice (GMP) produziert und kontrolliert werden. Auch die Arbeiten, die für einen Zulassungsantrag erforderlich sind, werden immer umfangreicher geworden. In diesen Unterlagen legt der Entwickler genau fest, wie Impfstoffe sich im Labor und - was noch viel wichtiger ist - im Feld verhalten. Ist ein Impfstoff nicht gut verträglich, wird er meist nicht weiter entwickelt.

Die Wirksamkeit steht natürlich immer im Vordergrund und viel Zeit vergeht damit zu beweisen, wozu die entwickelten Impfstoffe in der Lage sind. Man kann nicht erwarten, dass ein Impfstoff in allen Fällen einen totalen Schutz erzeugt. Man ist gezwungen einen Kompromiss zu suchen zwischen der Verträglichkeit, der Wirksamkeit, der Applikationsart (Nadel, Spray, Wasser oder über das Futter), der Häufigkeit der Impfung und der Handhabung des Hygienestatus. Die Klärung dieser Zusammenhänge ist unter Laborbedingungen schwierig festzustellen. Deshalb sind im Nutztierbereich große, sehr teure Feldversuche unverzichtbar.

Trotz aller Bestrebungen der Impfstoff-Entwickler- und Hersteller, kann es passieren dass ein Impfstoff versagt. Die Ursachen können vielfältig sein:

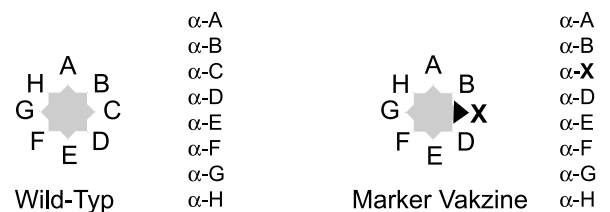
- zu hohe maternale Antikörper bei dem zu impfenden Küken,
- unsachgemäße Lagerung und/oder Applikation der Impfstoffe,
- Impfen bereits infizierter Bestände,
- Impfen supprimierter Tiere,
- das Auftreten von neuen Varianten oder Stämmen.

Es gibt nach wie vor viele Krankheiten, für die es keine Impfstoffe gibt, oft weil die dafür verantwortlichen Erreger vom Immunsystem schwer angreifbar sind. Wir sind sicher, dass die neuen biotechnologischen Kenntnisse uns Instrumente an die Hand geben, um kompliziertere Impfstoffe gegen solche Krankheiten zu entwickeln. Deshalb investieren wir seit einigen Jahren erhebliche Beträge in die

Entwicklung neuer Impfstoffe. Wir versuchen unseren Marktanteil über innovative Forschung auszubauen. Die LAH verfügt bereits heute über eine breite Palette von Geflügelimpfstoffen. Daneben haben wir uns besonders auf zoonotische Krankheiten wie Salmonella, Campylobacter und E. coli auf der einen Seite sowie auf Marker-Vakzine auf der anderen Seite konzentriert.

Bekanntlich wurden Marker-Impfstoffe schon gegen einige Krankheiten entwickelt (Abb. 3) (STEGEMAN, et al., 1994; Van OIRSCHOT, 1999). Sie ermöglichen eine Unterscheidung, ob ein Tier mit Antikörpern entweder geimpft ist, oder aber, ob es sich mit einem virulenten Stamm des Krankheitserregers infiziert hat. Dieses Prinzip hat sich beim Ausrottungsprogramm der Pseudorabies (PRV oder Aujeszksische Krankheit) bei Schweinen in den Niederlanden als sehr effektiv erwiesen. Marker-Impfstoffe gegen die Klassische Schweinepest und MKS sind auch schon entwickelt worden, dürfen aber - wie Sie wissen - in Europa (noch) nicht uneingeschränkt verimpft werden.

**Abbildung 3: Prinzip eines markierten Impfstoffes**



**Marker Test detektiert Antikörper gegen C**

Marker können auf vielen verschiedenen Wegen eingeführt werden. Unsere Forschungsarbeiten an dem Marker-Impfstoff gegen das Newcastle Disease Virus (NDV) sollen das illustrieren. Diesen haben wir zusammen mit ID-Lelystad (Herrn Dr. B. Peeters) entwickelt.

NDV oder Aviäres Paramyxovirus-1 (PMV-1) kann für die Geflügelwirtschaft hohe wirtschaftliche Verluste bedeuten. In den meisten Ländern ist die Krankheit meldepflichtig. Sie gilt dann auch als Liste A-Krankheit bei der OIE (Office International des Epizooties). Das Virus ist leicht auf Geflügelherden übertragbar. Einige Länder wie Dänemark und UK haben versucht, diese Krankheit auf Basis einer Nicht-Impfungs-Politik auszurotten, jedoch mit wechselndem Erfolg. Der Grund für die immer wiederkehrenden NDV-Durchbrüche ist wahrscheinlich das natürliche Reservoir des Virus in Wildvögeln. In anderen Ländern, wie z. B. in Deutschland, ist die Impfung Pflicht. Herr Dr. Vielitz hat schon 1985 auf der Lohmann Tagung auf die Bedeutung von NDV Impfstoffen für die Bekämpfung dieser Krankheit hingewiesen (VIELITZ, 1985). Der Impfstoff ist in konventioneller Form einer der ältesten am Markt und wird wahrscheinlich auch am meisten verkauft. Trotzdem glaube ich, dass man diesen Impfstoff noch verbessern kann im Hinblick auf Verträglichkeit, Wirksamkeit und Handling.

Es gibt 3 Kategorien der ND-Virus Stämme:

- lentogene (erkennbar an leichter Erkrankung der Atemwege),
- mesogene (erkennbar an Symptomen an den Atemwegen und Nervensystemen mit niedriger Mortalität),

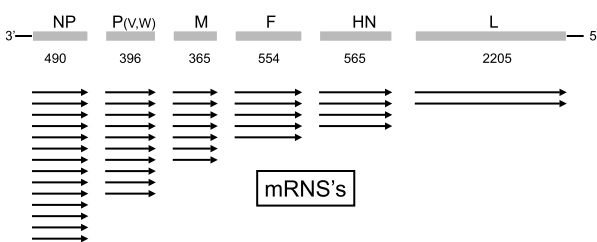
- viscerotrope oder neurotrope velogene (erkennbar an Erkrankung des Darms und Nervensystems mit hoher Mortalität, bis 100 %).

Die Pathogenität der verschiedenen Stämme wird mit Hilfe eines intrazerebralen Pathogenitätstests an 6 Wochen alten Küken gemessen. Der resultierende sogenannte ICPI-Wert (intracerebral pathogenicity index) charakterisiert das entsprechende Virus.

Das umhüllte ND-Virus hat eine pleomorphe Struktur mit zwei verschiedenen Glykoproteinen, die in der Virushülle, die aus der Wirtszelle stammt, eingebettet sind. Diese zwei Glykoproteine erscheinen als Spikes, die aus der äußeren Oberfläche der Membrane herausragen. Diese Proteine lösen nach der Verimpfung eine schützende Immunantwort aus.

Das Innere des Virus enthält ein Matrix Protein (M), das mit dem HN Protein und dem Nucleocapsid Protein in Wechselwirkung steht, welches wiederum das RNS Genom schützt. Für eine effiziente Transkription benötigt das Virus die Polymerase (L-Protein) und ein Phosphoprotein (P). Das RNS Genom enthält also sechs Hauptgene, die für strukturelle Proteine in folgender Reihenfolge kodieren: 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (Abb. 4) (LAMB und KOLAKOFSKY, 1996).

**Abbildung 4: Genetische Organisation des NDV Genoms**

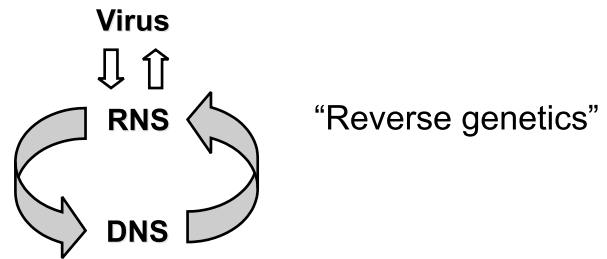


Die neuen ND-Viren mit integrierten Markern auf Basis des klonierten NDV Vakzine Stammes „La Sota“ sind wie folgt entwickelt worden. Als erstes hat Dr. P. Peeters, ID-Lelystad, das komplette Genom sequenziert (LEEuw, De und PEETERS, 1999). Die nahe Verwandtschaft mit anderen Geflügelparamyxoviren haben wir genutzt, indem wir einen Teil der HN Gene des PMV-1 mit dem korrespondierenden Teil der Gene ersetzt haben, die für das entsprechende HN Protein vom PMV-4 kodieren. Hierzu wurde die kürzlich entwickelte Methode der „reverse genetics“ benutzt (Abb. 5, 6) (PEETERS et al., 1999). PMV-4 wurde deswegen als Marker ausgewählt, da sie innerhalb der Geflügelpopulation nur gering verbreitet sind und daneben keine klinischen Erkrankungen verursachen. Die Aminosäure Sequenzen des HN Proteins des PMV-1 (NDV) und PMV-4 zeigen (nur) 35 % Homologie.

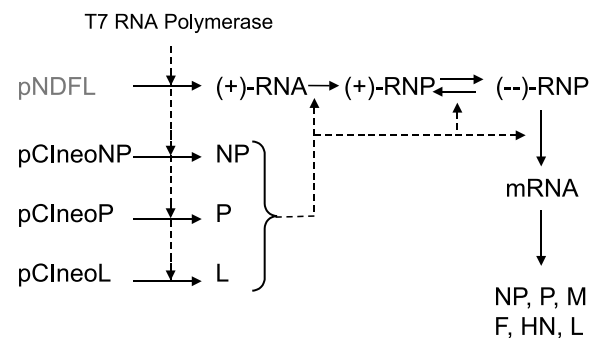
Diese PMV-4-Marker sind in den Impfstoff eingeführt worden. Gleichzeitig bleiben die eigentlichen Eigenschaften, die dieses HN Protein während des Lebenszyklus des Virus vollzieht, unverändert; d. h. das Protein unterstützt noch immer die Fusion des Virus mit der Wirtszelle zusammen mit dem F-Protein (Abb. 7).

Die Unterscheidung zwischen den Serotypen unseres Impfstoffes mit den anderen acht Geflügelparamyxoviren

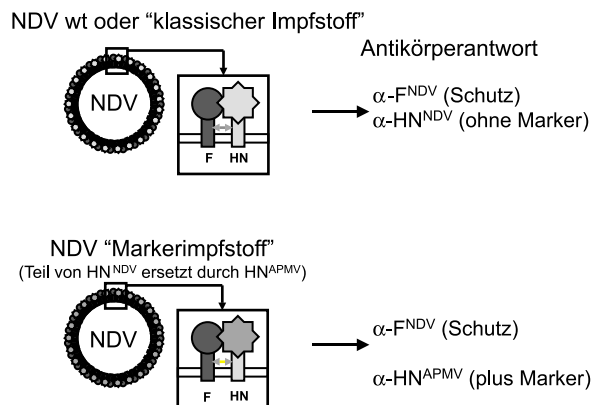
**Abbildung 5: Genetische Modifikation von NDV**



**Abbildung 6: „Rescue“ von infektiösem NDV von kloniertem cDNA**



**Abbildung 7: NDV Impfstoff Entwicklung**



basiert auf einem Hämagglutinationshemmtest (HI), der Antikörper gegen das HN Protein nachweist. Per Definition kann daher das HN Protein zur Differenzierung der einzelnen Serotypen verwendet werden. Wenn also ein Huhn mit dem markierten Impfstoff vakziniert ist, bildet das Tier **keine** Antikörper gegen das HN Protein von PMV-1, nur gegen das HN Protein von PMV-4, was mit einem normalen HI-Test schnell nachzuweisen ist. Außerdem bildet es Antikörper gegen das F-Protein von PMV-1, was mittels ELISA nachgewiesen werden kann, so dass der Nachweis, dass tatsächlich geimpft worden ist, eindeutig möglich ist. Wenn ein Tier mit einer Wildtype des NDV infiziert ist, bildet es natürlich schon Antikörper gegen das HN Protein (und gegen das F-Protein) von PMV-1! Wenn ein Tier vakziniert **und** infiziert ist, dann finden wir eine serologische Antwort auf die HN Proteine von PMV-1 **und** PMV-4 sowie auf das F-Protein.

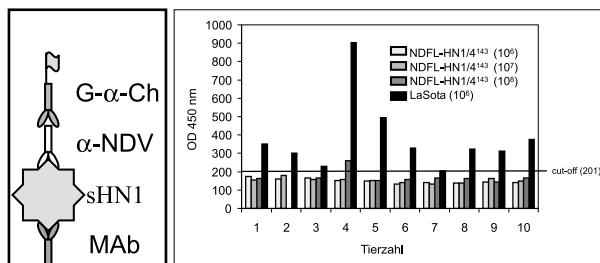
Während unserer weiteren Studien mit diesem Markerimpfstoff haben wir die Sicherheit und genetische Stabilität dieser neuen Chimären in Hühnern demonstriert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass geimpfte Hühner gut gegen Testinfektionen mit virulenten NDV geschützt sind (Tab. 2).

**Tabelle 2: Wirksamkeitsversuch mit 4-Wochen alten Hühnern**

Impfstoff	Dosis	Antikörperrespons	Klinik/Mortalität
NDFL-HN1/4	10 <sup>6</sup>	ja	nein
"	10 <sup>7</sup>	ja	nein
"	10 <sup>8</sup>	ja	nein
NDV LaSota	10 <sup>6</sup>	ja	nein
Kontrolle	--	nein	alle Tiere tot 3-4 dpc

Es konnte gezeigt werden, dass Sera von Tieren, die mit NDFL-HN1/4143 geimpft wurden, sich deutlich von Sera von Tieren, die mit nicht modifizierten NDV Stämmen geimpft wurden, in serologischen Tests unterscheiden. Dies war mit Hilfe eines neu entwickelten ELISA möglich, welcher speziell Antikörper gegen das HN Protein von PMV-1 nachweist (Abb. 8). Hiermit haben wir beweisen können, dass wir ungeimpfte, nicht-infizierte von ungeimpften, infizierten und von geimpften, infizierten Vögeln unterscheiden können. Dies macht sehr umständliche Laboruntersuchungen überflüssig, die sonst die Ausrottung dieser wirtschaftlich wichtigen Krankheit erschweren würden.

**Abbildung 8: Serologischer Markertest**

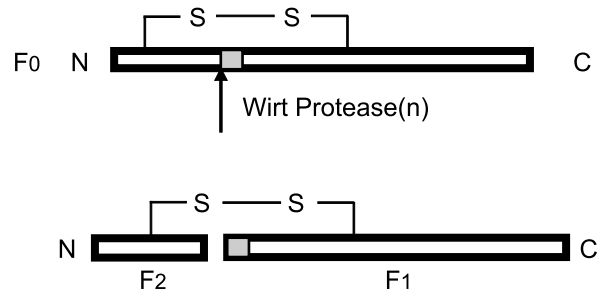


Natürlich müssen wir jetzt Feldversuche durchführen, um die Laborexperimente zu verifizieren. Wir sind aber davon überzeugt, dass diese Vakzine dazu beiträgt, in (hoffentlich naher) Zukunft die Newcastle Disease zu kontrollieren.

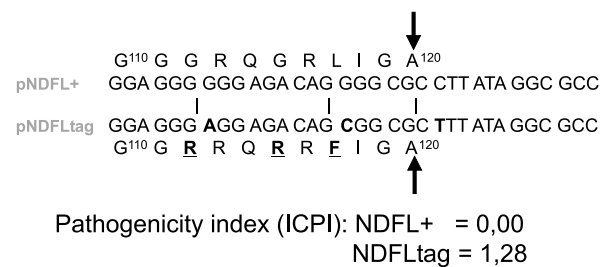
Ein ähnliches Verfahren bietet sich an, um die gefürchtete Aviäre Influenza zu bekämpfen, aber da sind die technischen Schwierigkeiten sicherlich noch größer. Sie werden sich vielleicht erinnern können, wie vor zwei Jahren diese Aviäre Influenza für große Aufregung und Schaden in Italien gesorgt hat. Mit diesem „reverse genetic“ System besteht eine reale Möglichkeit einen effektiven Impfstoff dagegen zu entwickeln.

Wir haben das „reverse genetic“ System übrigens auch benutzt, um weitere Mutanten mit differenzierten ICPIs zu kreieren, weil wir herausfanden, dass bestimmte Aminosäuren an der sogenannten Schnittstelle des F Proteins für die Erhöhung bzw. Reduktion der Pathogenität des NDV Stammes bei Küken oder Embryonen verantwortlich sind (Abb. 9, 10) (NAGAI et al., 1976).

**Abbildung 9: Spaltung des Fusionsproteins (F) ist notwendig für die Aktivierung der Fusionsfunktion**

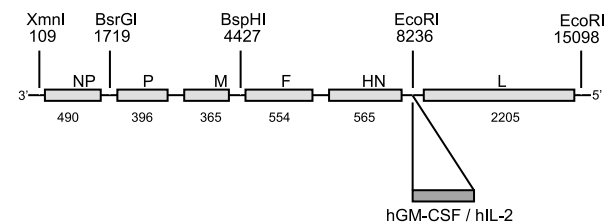


**Abbildung 10: Modifikation der Spaltungssequenz des Fusionsproteins von NDV LaSota**



Auch haben wir Stämme an Forscher weitergegeben, die diese beim Menschen als Anti-Krebs-Reagens nutzen, da NDV erstaunlicherweise in der Lage ist, Tumore abzutöten. Wir können unsere NDV Stämme auch noch anders markieren, nämlich mit einem Farbstoff (Green Fluorescent Protein ((E)GFP)), und können so den Transport des Virus in den Tumor unter dem Mikroskop verfolgen. Auch sind wir in der Lage, diese Anti-Tumor Wirkung zu verstärken, indem wir immunologisch-interessante Moleküle in die von NDV-infizierten Tumore zur Expression bringen lassen (Abb. 11).

**Abbildung 11: Einfügen des hGM-CSF und hIL-2 in das NDV Genom**



Die dargestellten Ergebnisse sollten die vielfältigen und viel versprechenden Möglichkeiten aufzeigen, mit denen wir heutzutage Impfstoffe für viele Zwecke entwickeln können. Die Entwicklung dieser Impfstoffe nimmt leider sehr viel Zeit in Anspruch und verursacht hohe Kosten. Das Ziel wird bleiben, wirksame und verträgliche Vakzine zum besseren Schutz für das Nutztier zu entwickeln, zu produzieren und zu vermarkten. Impfstoffe verhindern Rückstände und Resistenzen und werden in der Tierproduktion ganz allgemein an Bedeutung gewinnen.

## Literatur

- LAMB, R.A., D. KOLAKOFSKY (1996): Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, (ed. B.N. FIELDS), Verlag Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, 577-604
- LEEJW, O.S. De, B. PEETERS (1999): Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J. gen. Virology* 80, 131-136
- NAGAI, Y, H.-D. KLENK, R. ROTT (1976): Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 72, 494-508
- OIRSCHOT, J.T. Van (1999): Diva vaccines that reduce virus transmission. *J. Biotechnology* 73, 195-205
- PEETERS, B.P.H., O.S. De LEEJW, G. KOCH, A.L.J. GIELKENS (1999): Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virology* 73, 5001-5009
- STEGEMAN, A., M.J.M. THIELEN, T.G. KIMMAN, J.T. Van OIRSCHOT, W.A. HUNNEMAN, F.W. BERNDSEN (1994): Intensive regional vaccination with a gE-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine*, 12, 527-531
- VIELITZ, E (1985): Impfungen in der Geflügelproduktion - Rückblick und Ausblick. In: *Aktuelle Themen der Tierernährung und Veredelungswirtschaft*, Lohmann - LTE, Cuxhaven

Herzlichen Dank an Dr. B. Peeters, ID-Leystad, Niederlande