

# Orale Vakzination von Ferkeln gegen Colienterotoxämie mit einer Streptomycin-Dependenz-Revertante von *Escherichia coli*

Autor(en): **Bertschinger, H.U. / Jucker, H. / Pfirter, H.P.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **126 (1984)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591200>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 497–509, 1984

Aus den Instituten für Veterinär bakteriologie und Veterinärphysiologie der Universität Zürich und aus dem Institut für Tierproduktion der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

## Orale Vakzination von Ferkeln gegen Colienterotoxämie mit einer Streptomycin-Dependenz-Revertante von *Escherichia coli*

von H. U. Bertschinger<sup>1</sup>, H. Jucker und H. P. Pfirter

### 1. Einleitung

Die auch als Ödemkrankheit bezeichnete Colienterotoxämie kommt weltweit vor, wobei die Häufigkeit ausgeprägten zeitlichen und geographischen Schwankungen unterliegt [15]. Trotz der Fortschritte in der Erforschung der Pathogenese kann die Prophylaxe immer noch nicht voll befriedigen [23]. An sich müsste die aktive Immunisierung möglich sein, denn im Experiment wurde beobachtet, dass sich Schweine nach durchgemachter Ödemkrankheit weder mit dem homologen noch mit einem heterologen Serotyp ein zweites Mal infizieren lassen [18]. Der Schutz wird sehr wahrscheinlich durch das lokale Immunsystem des Darmes vermittelt, das eng mit jenem der Milchdrüse verbunden ist [17]. Zu seiner Stimulation sind im Darmlumen grosse Mengen an Antigen erforderlich, wie sie bei einer lokalen Schleimhautinfektion gebildet werden [14].

Bei der Immunprophylaxe enteraler Coliinfektionen ist zwischen Saugferkeln und älteren Tieren zu unterscheiden. Die parenterale Vakzination der Mutter führt bestenfalls zu einer guten Immunität in der neonatalen Periode; ein Schutz in der späteren Säugezeit ist durch orale Immunisierung der Mutter mit Lebendkultur zu erzielen [7]. Mit dem Absetzen entfällt die laktogene Immunität [13]. Die aktive Immunisierung der abgesetzten Ferkel gegen Colidiarrhöe ist mit Totvakzinen für orale [1, 11, 16, 19] oder parenterale Anwendung [19, 24] mit unterschiedlichem Erfolg versucht worden. Im Gegensatz zur Colidiarrhöe ist die Colienterotoxämie bezüglich der Immunprophylaxe bisher wenig bearbeitet worden [5, 11, 23].

Nach den eigenen günstigen Erfahrungen bei der oralen Immunisierung mit lebenden, virulenten, stallspezifischen Kulturen in Verbindung mit Diätfutter [2, 3, 4] ging es in der vorliegenden Untersuchung um die Frage, ob die virulente, stallspezifische Lebendkultur durch einen attenuierten Colistamm ersetzt werden könne. Als Verfahren zur Attenuierung bot sich wegen ihrer Einfachheit die Selektion Streptomycin-dependenter Mutanten an [9]. Lebendvakzinen aus Streptomycin-dependenter *E. coli* wurden in Feldversuchen mit Erfolg gegen neonatale Colidiarrhöe eingesetzt [20]. Bei Absetzferkeln wurde nach oraler [22] und weniger deutlich nach parenteraler Anwendung [22, 23] eine Reduktion der Verluste an Colienterotoxämie festgestellt. Die Streptomycin-

<sup>1</sup> Adresse: Institut für Veterinär bakteriologie der Universität Zürich, Winterthurerstr. 270, 8057 Zürich

dependenten Mutanten sind allerdings wenig stabil und neigen zum Verlust der Streptomycin-Dependenz, was als Reversion bezeichnet wird [10]. Dabei wird die erste Mutation nicht rückgängig gemacht, sondern durch eine zweite Mutation in einem anderen Genlocus supprimiert [6]. In nicht veröffentlichten Vorversuchen hatten wir beobachtet, dass sich Streptomycin-dependente Mutanten von schweinepathogenen *E. coli* im Darm schlecht vermehren, und dass häufig Revertanten auftreten. Streptomycin-Dependenz-Revertanten können in der Virulenz ebenfalls reduziert sein [21] und gelten als sehr stabil [8], weshalb wir uns für diese Form der Attenuierung entschieden.

Im folgenden berichten wir über die Verträglichkeit und die Immunogenität einer Streptomycin-Dependenz-Revertante im kontrollierten Experiment sowie unter Praxisbedingungen.

## 2. Gewinnung einer Mutante und Prüfung ihrer Virulenz

### 2.1. Material und Methode

Bei der Gewinnung des Vakzinestammes wurde von einem frisch isolierten, Streptomycin-empfindlichen Feldstamm von hämolysierenden *Escherichia coli* der Serogruppe O 139 ausgegangen. Nach der von Linde und Mitarb. [9] beschriebenen Technik wurden Streptomycin-dependente Mutanten isoliert: Trypticase Soy Agar-Platten (BBL, BioQuest, Cockeysville, Md. 21030) mit Zusatz von 400 ppm Streptomycin (Streptomycinsulfat NOVO, Copenhagen) wurden massiv mit dem Feldstamm beimpft. Die in geringer Zahl wachsenden, gegen Streptomycin hoch resistenten Kolonien wurden durch parallele Subkultur auf dem gleichen Medium mit und ohne Streptomycin auf Streptomycin-Dependenz untersucht. Als Streptomycin-dependente Mutanten werden Keime bezeichnet, die sich nur noch in Gegenwart des Antibiotikums vermehren. Solche Streptomycin-dependente Kolonien wurden nun massiv auf das Medium ohne Streptomycin überimpft. Die spärlichen wieder ohne Streptomycin wachsenden Mutanten werden als Streptomycin-Dependenz-Revertanten bezeichnet. Für die Herstellung der Vakzine wurde eine Revertante selektioniert, die gegen 1000 ppm Streptomycin resistent war. Sie wurde in der Internationalen Escherichia-Zentrale in Kopenhagen serologisch als *E. coli* O 139 : K 12(B) : H 1 typisiert<sup>2</sup>.

Zur Prüfung der Virulenz wurden in 3 Wiederholungen je 16 Ferkel aus dem Versuchsbetrieb (sh. 3.1.) mit  $8 \times 10^8$  KBE einer 18 Stunden bei 37 °C angezüchteten Bouillonkultur des Vakzinestammes individuell oral inokuliert. Als Kontrolle erhielt die gleiche Zahl von Wurfgeschwistern dieselbe Dosis eines Wildstammes des Serotyps O 139 : K 12(B) : H 1. Die Ferkel wurden in sorgfältig abgeschirmten Isolierställen auf Flatdecks gehalten und mit Ferkelfutter II (Tabelle 1) gefüttert.

Mastdarmpuffer wurden vor dem Absetzen, am Tag der Inokulation sowie 3, 5, 7 und 10 Tage danach entnommen. Die bakteriologische Untersuchung, die Schätzung der Zahl der pathogenen *E. coli* und die Bewertung mit 0 bis 8 Punkten erfolgten wie in früheren Versuchen [2]. Zur Identifikation des Vakzinestammes wurden von jeder Probe eine Blutagarplatte mit 400 ppm Streptomycin und eine Platte ohne Zusatz beimpft. Als maximale Ausscheidung wurde der bei jedem Einzeltier beobachtete Höchstwert bezeichnet. Die verendeten oder notgeschlachteten Ferkel wurden mit den gleichen pathologisch-anatomischen und bakteriologischen Methoden untersucht wie in früheren Experimenten [2].

### 2.2. Ergebnisse

Keines der mit dem Vakzinestamm inokulierten Ferkel entwickelte Ödemkrankheit. Der Vakzinestamm wurde von allen Ferkeln ausgeschieden. Das Maximum der

<sup>2</sup> Frau Dr. Ida Ørskov, Kopenhagen, danken wir für die serologischen Typisierungen.

Tabelle 1: Gehalt der Futtermischungen\*

	Ferkelfutter		Diätfutter		
	I	II	I	II	III
Rohprotein %	19	19	7	9	8
Rohfaser %	4	4	16	10	11
Verdauliche Energie (berechnet) in MJ/kg	14	14	7	10	9
Antimikrobieller Zusatz ppm	50**	–	–	–	–

\* Der Gehalt an Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen aller Mischungen war einheitlich.

\*\* Carbadox (PFIZER)

Ausscheidung schwankte von 1 bis 6, mit einem Durchschnitt von 3,4 (Tabelle 2). 10 Tage p.i. erwiesen sich noch 25 (52%) der 48 Ferkel als Ausscheider. Die Inokulation mit dem Wildstamm von *E. coli* führte zu 17 (35%) Verlusten an Colienterotoxämie. Bei 15 dieser Ferkel, die 4 bis 7 Tage p.i. starben oder getötet wurden, lagen Veränderungen wie bei klassischer Colienterotoxämie vor. Zwei weitere Ferkel, die 39 bzw. 45 Tage p.i. notgeschlachtet werden mussten, wiesen nur histologisch<sup>3</sup> erkennbare Läsionen von cerebrospongaler Angiopathie auf. Der Wildstamm wurde in höherer Zahl und deutlich länger ausgeschieden als der Vakzinestamm. Das Maximum der Ausscheidung schwankte zwischen 3 und 7, mit einem Durchschnitt bei 5,0. 10 Tage p.i. waren noch 25 (76%) der 33 Überlebenden Träger der Infektion. Die mittlere Tageszunahme der überlebenden Ferkel lag in 2 der 3 Wiederholungen bei den mit dem Vakzinestamm inokulierten Ferkeln deutlich höher als beim Wildstamm.

### 3. Schutzversuche unter Versuchsbedingungen

#### 3.1. Material und Methode

Die Versuche wurden im gleichen SPF-Zucht- und -Mastbetrieb durchgeführt wie die früher publizierten Experimente [2, 3, 4]. Die Schweine gehörten teils der Rasse Veredeltes Landschwein an, teils handelte es sich um Kreuzungen. Die Saugferkel wurden mit ihren Müttern in konventionellen Buchten mit Einstreue und betoniertem Auslauf gehalten. Sie wurden mit 4–6 Wochen abgesetzt und sogleich in den Versuch genommen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Ferkel jedes Wurfs gleichmässig auf die verschiedenen Versuchsverfahren verteilt wurden, und dass die Gesamtgewichte der Ferkel in den einzelnen Verfahren möglichst übereinstimmten. Die Ferkel jedes Absetzschubes wurden einheitlich entweder in konventionellen Buchten mit automatischen Tränken oder in Flatdecks mit partiell perforierten Böden, Nippeltränken und automatisch gesteuerter Belüftung gehalten.

Die Anzüchtung der Vakzine erfolgte als Oberflächenkultur auf Trypticase Soy Agar während 24 Stunden bei 37 °C, als Bouillonkultur in Trypticase Soy Broth während 16 Stunden bei 37 °C auf einer Schüttelmaschine oder chargenweise in einem belüfteten Fermenter mit anschliessender Gefrier-trocknung<sup>4</sup>. Bei den 2 erstgenannten Herstellungsarten konnte die Vakzine im Kühlschrank während

<sup>3</sup> Herrn Prof. Dr. J. Pohlenz, damals im Institut für Veterinärpathologie (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Stünzi) danken wir für die zahlreichen histologischen Untersuchungen.

<sup>4</sup> Herrn Dr. F. Roos c/o ufa-med, 6210 Sursee, danken wir für die Herstellung der Versuchschargen.

Tabelle 2: Prüfung der Unschädlichkeit durch orale Inokulation von Absetzferkeln mit dem Vakzinstamm und zum Vergleich mit einem Wildstamm von *Escherichia coli* des gleichen Serotyps. Die Tiere erhielten Ferkelfutter II und  $8 \times 10^8$  KBE des Inokulums

Wieder- holung	Inokulum	Anzahl Ferkel	Verluste an Colientero- toxämie	Fäkale Erregerausscheidung		Gewicht bei Inokulation kg	Mittlere Tageszunahme 1.-14. Tag p. inoc. g
				Maximum der Ausscheidung $\bar{x}$ (Min.-Max.)	Anteil Ausscheider am 10. Tag p. inoc. %		
1	Wildstamm	16	3	4,6 (3-6)	69	12,6	294
	Vakzine	16	0	2,7 (1-5)	50	13,0	299
2	Wildstamm	16	11	5,1 (4-7)	100	12,6	251
	Vakzine	16	0	4,1 (2-6)	63	12,2	310
3	Wildstamm	16	3	5,3 (4-7)	69	7,9	290
	Vakzine	16	0	3,4 (1-6)	44	7,9	348
1-3	Wildstamm	48	17	5,0 (3-7)	76	11,0	271
	Vakzine	48	0	3,4 (1-6)	52	11,0	319

3 Monaten, bei der dritten bei Zimmertemperatur während 6 Monaten ohne Keimzahlverlust aufbewahrt werden. Nachdem sich die Vakzinen in ihrer Wirksamkeit nicht unterschieden, werden die Ergebnisse gemeinsam dargestellt.

Zu Beginn der Versuche gaben wir den Ferkeln die Vakzine mit einer Injektionsspritze individuell ins Maul, und zwar kurze Zeit nach der Futteraufnahme. In der Mehrzahl der Versuche gingen wir dazu über, die Vakzine im Futter zu applizieren. Hiefür befeuchteten wir eine Futtermenge, die innerhalb weniger Stunden konsumiert wurde, gleichmässig mit der Vakzine. Diese wurde bei Bedarf mit Leitungswasser weiter verdünnt. Zu Vergleichszwecken wurde die Vakzine auch im Trinkwasser verabreicht, wobei die Kultur der gesamten Trinkwasserration des betreffenden Tages zugemischt wurde.

Die Vakzine wurde erstmals einen Tag nach dem Absetzen gegeben. Die einmalige Gabe wurde verglichen mit der Gabe an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, an 2 Tagen mit 1 Woche Abstand und mit der täglichen Gabe an 10 aufeinanderfolgenden Tagen (Tabelle 5). Die Gesamtdosis der Vakzine wurde über einen weiten Bereich ( $3,4 \times 10^6$  bis  $9,2 \times 10^{11}$  KBE) variiert (Tabelle 3).

Um während der Immunisierung die Einschleppung von anderen pathogenen *E. coli* zu vermeiden, wurden die Ferkel schon vor dem Absetzen bakteriologisch untersucht. Würfe mit Erregerausscheidung wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Im weiteren wurde Spontaninfektionen durch Einsatz eines nährstoffarmen, rohfaserreichen Diätfutters entgegengewirkt. Nach dem Absetzen erhielten die Ferkel während 12 bis 14 Tagen Diätfutter der Varianten I oder II (Tabelle 1). Die Ergebnisse werden für die Futtertypen nicht gesondert dargestellt, weil sich diese in früheren Versuchen als gleich wirksam erwiesen hatten [2, 4].

Nach dieser Diätphase wurde abrupt umgestellt auf Ferkelfutter I (Tabelle 1), das einem handelsüblichen Alleinfutter für Ferkel entsprach. Einen Tag nach der Futterumstellung erfolgte die Belastungsinfektion mit einem aus der Versuchsherde isolierten hämolysierenden Stamm von *E. coli* des Serotyps O 139 : K 12(B) : H 1. Für jedes Ferkel wurden gegen Ende der Morgenfütterung 10 ml einer 6 Stunden bei 37 °C angezüchteten Bouillonkultur ins Futter gemischt, was einer Dosis von  $2,0 \times 10^9$  KBE entsprach.

Bei der Ermittlung der maximalen Coliausscheidung nach der Belastungsinfektion wurden nur die Werte ab 3. Tag nach der Belastung berücksichtigt, um Verfälschungen durch das Inokulum selbst zu vermeiden.

Tabelle 3: Schutzversuch mit oraler Belastungsinfektion. Abhängigkeit des Schutzes von der für die Vakzination verwendeten Gesamtkeimzahl ohne Rücksicht auf Applikationsart und Aufteilung der Vakzinegesamtdosis.

Vakzine Gesamt- keimzahl KBE $\times 10^9$	Anzahl Wieder- holungen des Versuches	Ferkel- zahl	Verluste an Colienterotoxämie		Anteil Ferkel mit starker Ausscheidung des Wild- stammes ( $\geq 4$ ) nach Belastung (%)
			Während Immunisierung	nach Belastung	
-	14	120	0	11 (9,2%)	76
<1	7	53	0	4 (7,5%)	77
1- 4	5	43	0	0	40
5- 9	5	39	0	0	26
10- 19	5	42	0	2 (4,8%)	64
20- 39	3	28	0	0	32
40- 79	8	72	0	1 (1,4%)	19
80-159	6	49	0	0	20
160-319	9	75	0	0	7
320-639	4	35	0	0	14
> 640	4	30	0	0	3
	70	586	0	18 (3,1%)	

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Vakzinegabe im Trinkwasser und im Futter. Während 10 Tagen erhielten die Ferkel täglich  $1,4 \text{ bis } 2,7 \times 10^{10}$  KBE der Vakzine und das Diätfutter II.

Vakzination	Anzahl Wiederholungen des Versuches	Ferkelzahl	Mittlere maximale Ausscheidung des Vakzinstammes	Ergebnis der Belastungsinfektion Ausscheidung des Wildstammes		Verluste an Colienterotoxämie
				Mittlere maximale Ausscheidung	Anteil Ferkel mit maximaler Ausscheidung $\geq 4$	
Keine	2	13	1,4 (0-3)*	4,8 (2-7)	85%	0
Trinkwasser	2	13	4,5 (3-6)	2,3 (2-3)	0%	0
Futter	2	12	4,4 (3-7)	2,1 (2-3)	0%	0

\* Spontane Infektion infolge ungenügender Abschirmung gegenüber vakzinierten Buchten



## 3.2 Ergebnisse

Störungen der Versuche durch Spontaninfektionen vor Abschluss der Immunisierung konnten weitgehend vermieden werden. Allerdings mussten einige Würfe wegen positiver bakteriologischer Befunde ausgeschlossen werden. Von 1061 Ferkeln aus 125 Würfen, die vor dem Absetzen untersucht wurden, waren 44 Ferkel (4,1%) aus 11 Würfen (8,8%) infiziert, doch starben nur 4 Ferkel aus diesen Würfen während der Säugezeit an Colienterotoxämie.

Während der Immunisierungsphase kam es weder bei vakzinierten Ferkeln noch bei den Kontrollen zu Erkrankungen an Colienterotoxämie. Nach der Belastungsinfektion betrug die mittlere Mortalität bei den nicht immunisierten Kontrollgruppen 9,2% (Tabelle 3), wobei die Werte in den 14 Wiederholungen zwischen 0 und 25% schwankten. 76% der nicht vakzinierten Kontrollferkel erreichten eine maximale Ausscheidungszahl von 4 oder mehr.

Bei den vakzinierten Ferkeln war der Impfschutz in hohem Masse von der Impfdosis abhängig. Wenn man alle Ergebnisse zusammenfasst, ohne die Anzahl Impftage oder die Art der Applikation zu berücksichtigen, entsprachen die Ausfälle und die Coliausscheidung bei den 53 Ferkeln mit einer Vakzine-Gesamtdosis unter  $1 \times 10^9$  KBE etwa den Werten bei den nicht vakzinierten Kontrollen (Tabelle 3). Mit zunehmender Vakzinedosis reduzierte sich die Verlustquote. Bei Keimzahlen über  $8 \times 10^{10}$  KBE pro Ferkel kam es nicht mehr zu Ausfällen. Der Anteil der Tiere mit maximaler Ausscheidung des Wildstammes von 4 und mehr lag bei 20% oder darunter. In den auf die Vakzinengaben folgenden Tagen erschienen hohe Keimzahlen des Vakzinestammes im Kot. Nach der Futterumstellung und der Belastungsinfektion wurde der Vakzinestamm auch von schlecht immunisierten Tieren wesentlich schwächer ausgeschieden als der Wildstamm.

Ein Vergleich der Vakzineapplikation im Futter und im Trinkwasser ergab eine gleich starke Ausscheidung des Vakzinestammes und einen gleich guten Schutz vor der Belastungsinfektion (Tabelle 4). Wurde die Vakzine-Gesamtdosis auf 10 aufeinanderfolgende Tage verteilt, so resultierte eine schlechtere Immunität als bei Gabe an einem Tag, an 2 aufeinanderfolgenden oder an 2 Tagen mit einer Woche Abstand (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich zwischen ein- und mehrmaliger Vakzination bei Verwendung einer Gesamtdosis von  $3,2$  bis  $11,0 \times 10^9$  KBE im Trinkwasser und Verwendung von Diätfutter II.

Anzahl Impfungen	Abstand zwischen Impfungen Tage	Anzahl Wieder- holungen des Versuches	Ferkel- zahl	Ergebnis der Belastungsinfektion	
				Anteil Ferkel mit maximaler Aus- scheidung des Wildstammes $\geq 4$	Verluste an Coli- enterotoxämie
0	—	6	50	84%	4 (8%)
1	—	3	27	33%	0
2	1	2	13	23%	0
2	7	3	26	19%	0
10	1	2	13	46%	0



Das letztgenannte Verfahren verhinderte die Ansiedlung des Wildstammes am wirksamsten.

#### 4. Praxismässiger Einsatz der Vakzine

##### 4.1. Material und Methode

Zur Erzielung einer lückenlosen Bestandesimmunität wurden sowohl die trächtigen Sauen als auch die Absetzferkel oral immunisiert. Die Impfung der Sauen erfolgte frühestens 6 Wochen und spätestens 1 Woche vor der Geburt. Ohne die Fütterung zu ändern, wurden an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 20 ml Vakzine mit einer Keimzahl von  $1,5 \times 10^9$  KBE pro ml über das Futter gegossen.

Die Ferkel erhielten während der Säugeperiode ein betriebsübliches Alleinfutter für Ferkel. Nach dem Absetzen folgte während der Immunisierungsphase das Diätfutter III, das danach allmählich durch das betriebsübliche Ferkelfutter ersetzt wurde. Es wurde nach 3 Impfprogrammen gearbeitet (Tabelle 6), die sich in der Zahl der Impfungen und/oder in der Impfstoffdosis unterschieden. Die Besitzer erhielten die Anweisung, die Vakzine gründlich mit dem Futter zu vermischen. Sie hatten über die Durchführung der Impfung, den Zeitpunkt der Futterumstellung und über die Tierverluste Protokoll zu führen. Rund  $\frac{1}{3}$  der Tierabgänge wurden zur pathologisch-anatomischen Untersuchung an unser Institut eingesandt. Bei den nicht untersuchten Ferkeln wurde die gleiche Diagnose angenommen wie bei den seziierten Ferkeln des gleichen Betriebes mit analogem klinischem Vorbericht. Beim praxismässigen Einsatz der Vakzine erfolgte keine Belastungsinfektion. Auch musste auf nicht vakzinierter Kontrolltiere verzichtet werden.

In dem im Abschnitt 3.1. erwähnten Versuchsbetrieb wurden über 9 Monate hinweg alle trächtigen Sauen und alle Absetzferkel gemäss Impfprogramm A (Tabelle 6) vakziniert. Das Diätfutter III kam während 12 Tagen zur Anwendung. Im Sinne einer Kontrolle wurden hier die Verluste unmittelbar vor und nach dem Vakzinationsversuch ermittelt. Hierzu wurden 33 bzw. 43 Absetzferkel bei Ernährung mit dem Ferkelfutter II analog zur Belastungsinfektion im Abschnitt 3.1. mit virulenter Colikultur inokuliert.

Für die Felderprobung der Vakzine wählten wir 13 Betriebe mit laut Vorbericht hohen Verlusten an Colienterotoxämie aus. Eine exakte Ermittlung der Tierverluste vor und nach dem Vakzinationsversuch war nicht möglich, weil ständig vorbeugende Massnahmen verschiedenster Art zur Anwendung kamen.

##### 4.2. Ergebnisse

Im Versuchsbetrieb wurden bei den vakzinierten Sauen keine gesundheitlichen Störungen beobachtet; Trächtigkeit und Geburt verliefen normal. 1598 Absetzferkel

Tabelle 6: Impfprogramme für den praxismässigen Einsatz der Vakzine bei trächtigen Sauen und bei Absetzferkeln.

Programm	Vakzine-Tagesdosis für Sau* KBE $\times 10^9$	Vakzine-Tagesdosis für Absetzferkel KBE $\times 10^9$	Impftermine für Absetzferkel Tag nach Absetzen #		Dauer der Diätfütterung Tage
			Während Diätfütterung	Nach Umstellung auf Ferkelfutter	
A	30	30	2, 9	16	12
B	30	15	2, 3, 4, 5, 9	16	12
C	30	15	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	17, 18	15

\* Impfung frühestens 6, spätestens 1 Woche vor der Geburt an 2 aufeinanderfolgenden Tagen

# Der Absetztag wird als Tag 1 bezeichnet

wurden vakziniert. Davon verendeten 11 in den ersten 4 Wochen nach dem Absetzen. 6 dieser Ferkel kamen zur Sektion, und bei 2 wurde Colienterotoxämie diagnostiziert. In einem Fall liess sich nur der Vakzinestamm nachweisen, im anderen ein *E. coli* der Sero-Gruppe 0 141 : K 85 a, b(B). Somit können die Verluste an Colienterotoxämie höchstens 7 Ferkel (0,4%) betragen haben. Von den nicht vakzinierten Kontrollferkeln erlitten der Belastungsinfektion vor Versuchsbeginn 21 von 33 (64%) und nach Versuchs-ende 16 von 43 Ferkeln (37%). Die Mütter dieser Ferkel waren ebenfalls vakziniert worden.

Aus den Feldbetrieben erhielt das Institut Versuchsprotokolle über die Vakzination von insgesamt 14 063 Ferkeln. Die Verluste an Colienterotoxämie schwankten nicht nur zwischen den Betrieben, sondern im Laufe der Zeit auch innerhalb mancher Betriebe. Die Gesamtverluste betragen im Durchschnitt 1,36% (Tabelle 7); in 4 Betrieben blieben sie unter 0,5% und in 2 Beständen überstiegen sie 3%. Der höchste Verlust von 6,2% wurde in einem Betrieb registriert, in dem nur 2 Absetzschübe in den Versuch einbezogen werden konnten.

Durch den Vakzinestamm bedingte Fälle von Colienterotoxämie waren in 10 der 13 Betriebe schon während der Diätphase zu beobachten (Tabelle 7). Wo sie ein besonderes Problem darstellten, wurde die Vakzinedosis pro Tier und Tag von  $30 \times 10^9$  KBE reduziert und dafür die Zahl der Impfungen verdoppelt (Tabelle 6, Programm B). Die Verteilung der Gesamtdosis auf eine längere Zeit vermochte diese Verluste um zwei Drittel zu senken. Für 2 Betriebe, in denen die immunisierende Wirkung nicht ausreichte, wurde eine weitere Erhöhung der Zahl der Impfungen mit verlängerter Diätfütterung (Programm C) eingeführt. Todesfälle durch den Vakzinestamm nach Abschluss der Immunisierung waren bei jedem der 3 Impfprogramme etwa gleich häufig zu beobachten. Die höhere Zahl von Immunitätsdurchbrüchen durch den Wildstamm in den Programmen B und C ist wohl durch die erhöhte Krankheitsbereitschaft in den betreffenden Betrieben zu erklären. In diesem Sinne ergab Programm C neben dem höchsten Aufwand auch die grössten Gesamtverluste.

In 3 Betrieben bestanden Infektionen mit anderen als dem in der Vakzine enthaltenen Colityp. In 4 weiteren Betrieben kam der gleiche Typ wie in der Vakzine zusammen

Tabelle 7: Praxisgemässer Einsatz der Vakzine in Problembetrieben. Orale Impfung der trächtigen Sauen und der Absetzferkel, bei diesen kombiniert mit Diätfutter III. Keine ungeimpften Kontrollen.

Impf- programm °	Anzahl Betriebe	Anzahl Ferkel	Verluste nach dem Absetzen infolge Infektion mit				Total %
			Vakzinestamm		Wildstämmen		
			während Diät %	nach Diät %	während Diät %	nach Diät %	
A	6	3 517	0,48	0,54	0,03	0,11	1,16
B	8	7 322	0,15	0,49	0,11	0,66	1,41
C	2	3 224	0,09	0,68	0,03	0,71	1,51
A, B, C	13*	14 063	0,22	0,54	0,07	0,53	1,36

° Siehe Tabelle 6.

\* Einzelne Betriebe erscheinen bei mehr als einem Programm.

mit anderen Typen vor. Dabei handelte es sich um die Serogruppen 0 141 : K 85 a, c(B) und 0 141 : K 85 a, b(B), seltener auch um die Serogruppe 0 149 : K 91(B) 88(L). Dennoch lag in 4 dieser 7 Betriebe die Häufigkeit von Impfversagern unter dem Gesamtdurchschnitt. In den 3 Betrieben mit überdurchschnittlichen Verlusten hielten sich die durch den heterologen Wildstamm und die durch die Vakzine bedingten Verluste etwa die Waage. Nachträgliche Krankheitsausbrüche durch heterologe Colitypen wurden in keinem Fall registriert.

In 4 Betrieben, wo das hier vorgestellte Immunisierungsprogramm nur bei einem Teil der Tiere angewandt wurde, ergaben sich bei Absetzferkeln, die selbst keine Vakzine erhalten hatten, durch den Vakzinestamm bedingte Todesfälle. In einem dieser Fälle betrug der Verlust 23 von 159 Ferkeln.

## 5. Diskussion

Bei bakteriellen Vakzinen besteht die Tendenz, jene Antigene anzureichern, welche die Bildung schützender Antikörper anregen. Bei der Colienterotoxämie wird an Impfstoffen gearbeitet, die neutralisierende Antikörper gegen das Vasotoxin (Neurotoxin) induzieren [5]. Die entsprechenden Vakzinen sind jedoch für die Praxis bisher nicht verfügbar. Demgegenüber erzeugt der von uns geprüfte Impfstoff eine Immunität gegen die Besiedlung des Darmtraktes. Bei der neonatalen Colidiarrhöe ist diese Form der Immunität von den Antigenen der Bakterienzellwand und allfälliger Kapseln weitgehend unabhängig; sie wird auf eine Immunität gegen die adhäsiven Pili zurückgeführt [12]. Die in unseren Versuchen beobachtete Kreuzimmunität gegen heterologe Serogruppen kann als Hinweis auf das Vorkommen gemeinsamer adhäsiver Antigene bei Erregern von Colienterotoxämie gedeutet werden.

Soweit unsere Experimente auf die Schweineherde des Versuchsbetriebs beschränkt blieben, liessen sie auf völlige Unschädlichkeit und gute Immunogenität des Vakzinestammes schliessen. Für eine verlässliche Immunisierung waren allerdings verhältnismässig hohe Keimzahlen erforderlich, weil das zum Schutz vor Spontanerkrankungen verwendete Diätfutter die Proliferation des Lebendimpfstoffes beeinträchtigte [2]. Die Produktion der nötigen Impfstoffmenge in Fermentern wäre sowohl technisch als auch wirtschaftlich durchaus machbar.

Die orale Vakzination der trächtigen Sauen führte in unseren Versuchen nie zu erkennbaren Schädigungen. Colienterotoxämie bei Saugferkeln und in den allerersten Tagen nach dem Absetzen wurde offensichtlich verhindert. Die Resultate aus dem Versuchsbetrieb belegen, dass der Effekt der Sauenvakzination auf die Säugezeit beschränkt blieb; bei Ferkeln vakzinierter Sauen betragen die Verluste nach dem Absetzen bis zu 64%.

Ein deutlich anderes Bild ergab sich in einem Teil der Feldbetriebe. Hier zeigten sich einerseits zu hohe Restvirulenz und andererseits ungenügende Immunisierung. Dabei dürfte es sich kaum um eine Veränderung der Virulenz des Vakzinestammes handeln. Zeitweise fand Vakzine der gleichen HerstellungschARGE im Versuchsbetrieb und in Feldbetrieben mit unbefriedigenden Ergebnissen Anwendung. Ausserdem fiel

auf, dass es mit wenigen Ausnahmen dieselben Feldbetriebe waren, die erhöhte Verluste durch den Vakzinestamm und durch ungenügende Immunisierung erlitten. Diese Beobachtungen legen es nahe, die unterschiedliche Empfänglichkeit der Schweine in den einzelnen Betrieben als Ursache der abweichenden Resultate zu betrachten. Die Einführung der hier beschriebenen attenuierten Lebendvakzine in die Praxis stösst vorläufig auf grosse Schwierigkeiten, weil die Prüfung der Unschädlichkeit und der Wirksamkeit durch den Hersteller und durch die Behörden ein kostspieliges und unüberschaubares Vorhaben darstellt, solange die Empfänglichkeit der Versuchstiere nicht gesteuert werden kann. Die Einführung einer solchen Vakzine in die Praxis würde aber entsprechende Prüfmöglichkeiten voraussetzen.

Selbst wenn die hier vorgestellte Bakterienmutante die Anforderungen an eine praxisreife Lebendvakzine nicht voll erfüllt, haben die Experimente doch bestätigt, dass oral angewandte Lebendimpfstoffe einen guten Schutz gegen Colienterotoxämie ergeben, und dass sich das Diätfutter mit tiefem Nährstoff- und hohem Rohfasergehalt zur Reduktion der Verluste an Ödemkrankheit eignet. In Kombination mit der aktiven Immunisierung mit virulenten stallspezifischen Kulturen ist dieses Futter ein wertvolles Verfahren zur Beherrschung der Colienterotoxämie in Problembeständen [4].

#### Zusammenfassung

Es wurden Vakzinationsversuche gegen Colienterotoxämie mit einem Lebendimpfstoff durchgeführt, der aus einer von Streptomycin-Dependenz revertierten Mutante von *E. coli* 0 139 : K 12(B) : H 1 hergestellt worden war. Bei der Unschädlichkeitsprüfung blieben die 48 mit dem Vakzinestamm inokulierten Ferkel gesund, während 17 von 48 mit einem Wildstamm inokulierten Wurfgeschwistern an Colienterotoxämie erkrankten.

In Schutzversuchen wurden 466 Absetzferkel oral mit abgestuften Keimzahlen immunisiert. Zur Verhinderung von Spontanerkrankungen erhielten sie während der Immunisierung ein nährstoffarmes, rohfaserreiches Diätfutter. Nach Belastungsinfektion mit einem virulenten Stamm desselben Serotyps waren alle 189 Ferkel geschützt, die mit einer Gesamtdosis über  $8 \times 10^{10}$  KBE vakziniert worden waren. Bei den 120 Kontrollferkeln betrug der Verlust 9,2%. Die Anwendung der Vakzine im Futter und die Gabe im Trinkwasser erwiesen sich als gleichwertig. Die Aufteilung der Vakzinedosis auf Tag 2 und Tag 9 nach dem Absetzen ergab den besten Schutz.

In Feldversuchen wurden in 13 Betrieben über 14 000 Ferkel vakziniert. Zur Verhinderung von Erkrankungen während der Säugezeit wurde die Vakzine auch den trächtigen Sauen verabreicht. In einem Teil der Betriebe wurden ebensogute Ergebnisse wie in den Schutzversuchen erzielt. Der Schutz erstreckte sich auch auf heterologe Serogruppen. In anderen Betrieben jedoch traten vakzinebedingte Verluste während der Immunisierung auf. Auch war hier der Impfschutz teilweise ungenügend.

#### Résumé

Nous avons procédé à des essais de vaccination contre l'entérotaxémie colibacillaire en employant un vaccin atténué vivant, obtenu à partir d'une souche d'*Escherichia coli* 0 139 : K 12(B) : H 1 révertante d'une mutation qui l'avait rendue dépendante de la streptomycine. Lors des tests d'inocuité aucune maladie ne se déclara chez 48 porcelets inoculés avec la souche vaccinale. En revanche, 17 porcelets sur 48 provenant des mêmes portées succombèrent à l'entérotaxémie colibacillaire après inoculation avec une souche virulente.

Lors des essais de protection 466 porcelets furent immunisés par voie orale après le sevrage avec une quantité croissante de germes. Pour empêcher que la maladie ne se déclare spontanément, ils furent nourris pendant la période d'immunisation avec un aliment pauvre en substances nutritives, mais riche en cellulose brute. 189 porcs ayant reçu une dose de plus de  $8 \times 10^{10}$  germes résistèrent à une infection expérimentale avec une souche virulente du même sérotype. En revanche 9,2% des 120 ani-

maux de contrôle succombèrent. La protection fut la même, que le vaccin soit mélangé à l'aliment ou qu'il soit administré dans l'eau. La meilleure protection fut enregistrée lorsque la dose totale fut répartie en deux fois, le 2<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour après le sevrage.

Dans une série d'essais en pratique, 14 000 porcelets provenant de 13 exploitations furent vaccinés. Les truies portantes furent aussi vaccinées pour éviter que la maladie ne se déclare pendant la période d'allaitement. Dans une partie de ces exploitations, on enregistra de bons résultats, analogues à ceux cités plus haut, le vaccin protégeant aussi bien contre une infection par des souches homologues qu'hétérologues. En revanche, dans l'autre partie de ces exploitations, on observa des pertes dues à la souche vaccinale ainsi qu'une protection souvent insuffisante contre la maladie de l'œdème.

### Riassunto

*E. coli* 0 139 : K 12(B) : H 1 isolata sul terreno è stata resa dipendente dalla streptomycina. Di questa una retromutante è stata impiegata per la produzione di un vaccino con germi vivi attenuati. Nessuno dei 48 suinetti svezzati inoculati con questo stipite vaccino ha sviluppato una enterotossemia da coli. 48 suinetti della stessa figliata sono stati inoculati con uno stipite selvaggio; di questi 17 si sono ammalati di enterotossemia da coli.

466 suinetti da svezzare sono stati immunizzati per via orale con quantità di germi scalate. Per evitare eventuali malattie spontanee hanno ricevuto durante l'immunizzazione una dieta povera di sostanze nutritive ma ricca in fibra bruta. Infettati con uno stipite virulento dello stesso sierotipo sono risultati protetti i 189 suinetti vaccinati con una dose superiore a  $8 \times 10^{10}$ . Nei 120 suinetti di controllo le perdite sono state del 9,2%. L'impiego del vaccino nel mangime o la somministrazione con l'acqua sono risultati equivalenti. La ripartizione della dose di vaccino fra il secondo e il nono giorno dopo lo svezzamento ha fornito la miglior protezione.

Nel corso di esperimenti sul terreno, in 13 aziende sono stati vaccinati più di 14 000 suinetti. Inoltre il vaccino è stato somministrato anche alle scrofe gravide per evitare malattie durante l'allattamento. In una parte degli allevamenti si sono ottenuti risultati paragonabili ai primi esperimenti di immunizzazione. In altre aziende si sono avute delle perdite causate dal vaccino stesso. In questi casi anche l'immunità da vaccinazione era in parte insufficiente.

### Summary

Experiments were conducted to prevent *E. coli* enterotoxaemia by oral vaccination. A revertant from a streptomycin-dependent strain of *E. coli* 0 139 : K 12(B) : H 1 was selected for the production of a live vaccine. 48 weaners inoculated with the vaccine remained healthy, whereas 17 out of 48 litter mates inoculated with the same dose of a wild strain succumbed to enterotoxaemia.

466 weaners were vaccinated orally with graded doses of the vaccine. To protect against spontaneous disease during the period of immunization they were fed a diet low in nutrients and high in fibre. 189 pigs vaccinated with a total dose exceeding  $8 \times 10^{10}$  CFU were immune to a challenge inoculation using a homologous virulent strain; by contrast losses with the 120 controls amounted to 9,2%. Feed and drinking water were equally effective as vehicles for the vaccine. The best protection was obtained when the dose was given in two halves on days 2 and 9 after weaning.

In field trials over 14 000 piglets in 13 herds were vaccinated. Enterotoxaemia in the nursing piglets was prevented by oral vaccination of the pregnant sows. In some herds the results were as good as under experimental conditions; in addition the vaccine protected against heterologous serogroups. In other herds however, vaccine-related losses occurred during the period of immunization and protection was sometimes insufficient.

### Literatur

- [1] Barfod K.: Peroral vaccination against neonatal and post-weaning *E. coli* infection. Proceed. IPVS Congress, Copenhagen, 164 (1980). – [2] Bertschinger H. U., Eggenberger E., Jucker H., Pfirter H. P.: Evaluation of low nutrient, high fibre diets for the prevention of porcine *Escherichia coli* enterotoxaemia. Vet. Microbiol 3, 281–290 (1978/79). – [3] Bertschinger H. U., Jucker H., Pfirter H. P.: Control of *Escherichia coli* infection in weaned pigs by use of oral immunization combined with a diet low in nutrients. Adv. Vet. Med. (Fortschr. Vet. Med., Beiheft zu Zbl. Vet. Med.) 29, 73–81 (1979). – [4]



Bertschinger H. U., Jucker H., Halter H.-M., Pfirter H. P.: Zur Prophylaxe der Colienterotoxämie des Schweines: Dauer der oralen Immunisierung mit virulenten Erregern unter dem Schutz eines Diätfutters. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 123, 61–68 (1981). – [5] Dobrescu L.: Immunological studies in pigs using edema disease principle (*E. coli* neurotoxin). *Proceed. Int. Pig Vet. Congr. Mexiko*, 23, (1982). – [6] Hashimoto K.: Streptomycin resistance in *Escherichia coli* analyzed by transduction. *Genetics* 45, 49–62 (1960). – [7] Kohler E. M.: Neonatal enteric colibacillosis of pigs and current research on immunization. *JAVMA* 173, 588–591 (1978). – [8] Likhoded F. G., Shuster B. Yu.: Genetische Grundlagen der Selektion stabiler attenuierter Enterobacteriaceae-Stämme. *Z. ges. Hyg.* 22, Beiheft 1, 6–12 (1976). – [9] Linde K., Koch H., Kittlick M., Kapell J.: Untersuchungen zur oralen Immunisierung gegen Coli-Enteritis mit Streptomycin-abhängigen Keimen. I. Mitteilung: Charakterisierung der Streptomycin-abhängigen Impfstämme. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 211, 453–465 (1969). – [10] Linde K., Keller H.-P., Neuparth V., Rendhagen B.: Stabilität und Sicherheit von Sm-d *E. coli*-Impfstämmen mit Auxotrophie-Marker oder zusätzlicher Ts-Mutation. *Z. ges. Hyg.* 22, Beiheft 1 (1976). – [11] Mochmann H., Zwierzchowski J., Hering L., Molenda J., Ocklitz H. W., Bocianowski M., Austenat L., Walachowski W., Janas Z.: Die Schutzwirkung von EDTA-Na-Extraktimpfstoffen aus schweinepathogenen *E. coli*-Bakterien im Feldversuch. 2. Mitteilung: Immunisierung von Absetzferkeln. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* A 247, 208–220 (1980). – [12] Moon H. W.: Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: Evidence for pili as protective antigens. *Am J. Vet. Res.* 42, 173–177 (1981). – [13] Nagy L. K., Bhogal B. S., Mackenzie T.: Duration of anti-adhesive and bactericidal activities of milk from vaccinated sows on *Escherichia coli* 0 149 in the digestive tract of piglets during the nursing period. *Res. Vet. Sci.* 27, 289–296 (1979). – [14] Newby T. J., Stokes C. R., Evans P. A., Bourne F. J.: The immune response following oral vaccination with *E. coli*. *Curr. Topics Vet. Med. Anim. Sci.* 12, 377–388 (1981). – [15] Nielsen N. O.: Edema disease. In: A. D. Leman et al. (eds.) *Diseases of Swine*, 5th ed., 478–490. Iowa State University Press, Ames, Iowa (1981). – [16] Porter P., Kenworthy R., Allen W. D.: Effect of oral immunisation with *E. coli* antigens on post weaning enteric infection in the young pig. *Vet. Rec.* 95, 99–104 (1974). – [17] Porter P., Parry S. H., Allen W. D.: Significance of immune mechanisms in relation to enteric infections of the gastrointestinal tract in animals. In: *Immunology of the gut. Ciba Foundation Symposium* 46, (new series), 55–67 (1977). – [18] Smith H. W., Halls S.: The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: Factors that influence the course of the experimental disease. *J. med. Microbiol.* 1, 45–59 (1968). [19] Svendsen J.: Enteric *Escherichia coli* infections in suckling pigs and in pigs at weaning. Aspects of pathogenesis, prevention and control. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala (1979). – [20] Schimmel D., Schulze F., Bathke W., Kittlick M., Koch H., Linde K., Lutter K., Schmidt S.: Zur Immunprophylaxe der Koliinfektionen bei Schweinen mit Lebendimpfstoff. 1. Mitteilung: Anwendung bei Koliinfektionen der ersten Lebensstage. *Arch. Exp. Vet. Med.* 26, 335–348 (1975). – [21] Schimmel D., Schimmel I.: Probleme bei der Anwendung von Smd-*E. coli*-Lebendvakzine. *Z. ges. Hyg.* 22, Beiheft 1 (1976). – [22] Schimmel D., Schulze F., Anders U., Bochmann H., Gottschalk F., Lutter K., Streibhardt K.-H., Streibhardt U., Udluft K., Uhlemann J., Walter A., Wenzel R., Westphal B., Zabke J.: Zur Immunprophylaxe der Koliinfektionen der Schweine mit einem Sm-d-Lebendimpfstoff. *Mh. Vet. Med.* 33, 253–256 (1978). – [23] Schöll W., Fischer K., Barysch G.: Zu den Ergebnissen des klinischen Einsatzes und den Wirkungsmöglichkeiten eines Lebendimpfstoffes aus Streptomycin-abhängigen *E. coli*-Stämmen gegen die Koliinfektion der Schweine – kritische Betrachtung anhand einer Praxisumfrage. *Mh. Vet. Med.* 37, 81–84 (1982). – [24] Storm P. K., Baars J. C., Pennings A.: Impfversuche gegen *E. coli*-Enterotoxikose bei Absetzferkeln. *Fortschr. Vet.-Med.* Heft 30, 212–215 (1980).

#### Verdankungen

Einen grossen Teil der bakteriologischen Arbeiten hat unsere verstorbene Mitarbeiterin, Fräulein Ingeborg Hemlep, ausgeführt. Wir möchten ihrer an dieser Stelle besonders gedenken. Unser weiterer Dank gilt Herrn F. Bühlmann für die sorgfältige Wartung der Versuchstiere, den praktizierenden Kollegen und den Tierbesitzern für die Mithilfe bei den Feldversuchen sowie der Genossenschaft UFA in Winterthur für die grosszügige Unterstützung der vorliegenden Untersuchungen.

Manuskripteingang: 4. Februar 1984