

# Poultry News

LOHMANN TIERZUCHT Sonderausgabe

## Das neue Impfstoffwerk Durchgeplant bis ins letzte Detail



**Das Veterinär-Labor von Lohmann Tierzucht hat eine lange Tradition in der Entwicklung und Herstellung von Impfstoffen. Die Wurzeln vieler heute zugelassener Impfstoffe für das Geflügel liegen im Veterinär-Labor. Seit 1987 hat sich Lohmann Tierzucht auf die Produktion von stall- oder bestandsspezifischen Impfstoffen spezialisiert. Heute zählt Lohmann Tierzucht zu den führenden Anbietern bestandsspezifischer Impfstoffe – Tendenz steigend.**

**Titelstory** 1-2  
Das neue Impfstoffwerk

**Events** 3  
Eröffnung des neuen Impfstoffwerks

**Aus F+E** 4-5  
Bestandsspezifische Impfstoffe  
Produktion Impfstoffe

**Praxis** 6-7  
Produktion im neuen Impfstoffwerk

**Fachpublikation** 8-9-10  
Grundlagenforschung

**Rückblick** 11-12  
50 Jahre Veterinär-Labor  
Meilensteine

**Impressum** 12

Um der gestiegenen Nachfrage einerseits und den technischen Anforderungen andererseits nachzukommen, gab es für Lohmann Tierzucht nur eine Alternative: den Neubau einer Impfstoff-Produktion in der Anton-Flettner-Straße in Cuxhaven.



Ständige Überwachung der Lüftungstechnik

## LOHMANN ... Editorial

50 Jahre Legehennenzüchtung und 50 Jahre Veterinär-Labor sind ein Grund zum Feiern. Und um danke zu sagen.



Unser Dank geht zum einen an unser kompetentes, erfahrenes Team und zum anderen an unsere langjährigen Kunden und Geschäftspartner. Beide Seiten haben in den zurückliegenden Jahren eng und sehr erfolgreich zusammengearbeitet.

Legehennenzüchtung und der Verkauf von Elterntieren sind und bleiben unser Kerngeschäft. Beides werden wir konsequent weiterentwickeln, um unseren Marktanteil weltweit kontinuierlich auszubauen. Daneben werden wir neue Produkte für Wachstumsmärkte einführen und bestehende Arbeitsgebiete wie VALO, unser Geschäft mit SPF-Bruteiern und Clean Eggs stärken.

Das Veterinär-Labor mit seinem einzigartigen Dienstleistungsangebot „Tierärztlicher Service“, „Diagnostik“ und „Produktion bestandsspezifischer Impfstoffe“ wird weltweit von unseren Kunden geschätzt. Dies ist der dritte Bereich, den wir nachhaltig stärken und dazu neu ausrichten.

Das neue Impfstoffwerk wird in Kürze den GMP-Status erhalten. Über unser angestammtes Marktsegment Geflügel werden wir bestandsspezifische Impfstoffe auch für andere Nutztierarten wie z. B. Fisch und Schwein entwickeln.

Mit diesen drei Unternehmensbereichen – Legehennenzüchtung, Impfstoffeier und bestandsspezifischen Impfstoffen ist Lohmann Tierzucht für die Zukunft gut aufgestellt.

Dr. Hans-Friedrich Finck

Fortsetzung von Seite 1

## Durchgeplant bis ins letzte Detail



Das neue Impfstoffwerk – ein Zweckbau, der es aber in sich hat

Drei wesentliche Aspekte standen bei der Planung im Mittelpunkt: die Erhöhung der Kapazität, eine zukunftsweisende technische Ausstattung und eine Optimierung des Produktionsprozesses. Und da in Zukunft in diesem neuen Werk auch MUMS-Impfstoffe (Minor Use/Minor Species) hergestellt werden sollen, muss die Produktion zudem dem Leitfaden der Guten Herstellpraxis (GMP-Guideline) entsprechen. Diese Richtlinie beschreibt im Detail die baulichen und organisatorischen Maßnahmen, die für eine erfolgreiche, sichere und reproduzierbare Produktion von Veterinärimpfstoffen getroffen werden müssen.

### Behörden früh in Planung einbezogen

Deshalb hat Lohmann Tierzucht bereits frühzeitig den engen Kontakt zu den zuständigen Behörden gesucht und diese mit in die Planungen einbezogen.

Besonderes Augenmerk lag dabei auf einem genau geplanten und dokumentierten Qualitätsmanagement. Außerdem wurden das Gebäude sowie die Personal- und Materialflüsse im Detail geplant und mit den Behörden abgestimmt.

Hauptanforderungen für einen Impfstoff, unabhängig davon, ob zugelassen oder bestandsspezifisch, sind Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit. Und das möglichst zu einem erschwinglichen Preis.

Für eine optimale Wirksamkeit sollte die Virusoberfläche möglichst genau mit der des natürlichen Erregers übereinstimmen. Diese Vorgabe ist durch bestandsspezifische Impfstoffe in höchstem Maße erfüllt. Allerdings sind die dafür benutzten Erreger ‚pathogen‘ für die jeweilige Spezies, da sie ja in der Regel aus kranken Tieren isoliert werden. Darum müssen die Erreger nach der Vermehrung inaktiviert werden, die

Methode muss jedoch so abgestimmt sein, dass eine Veränderung der Oberflächenantigene weitestgehend vermieden wird.

Um eine gute Verträglichkeit sicherzustellen, sind zunächst die Antigene aufzureinigen und hochgereinigte Ausgangsstoffe und Adjuvantien zu verwenden. Der Impfstoff sollte zudem möglichst wenige Begleitproteine enthalten.

### Sicherheit durch Qualitätssicherung

Die Sicherheit wird durch einen validierten Inaktivierungsprozess sowie durch qualitätssichernde Maßnahmen erreicht. Priorität hat die Vermeidung von Kontaminationsrisiken. Im neuen Impfstoffwerk wird dies durch hocheffiziente Lüftungsanlagen mit endständigen HEPA-Filtern sowie durch eine entsprechende Raumanordnung sichergestellt.

Anlässlich der Vermehrertagung 2008

# Wissenschafts-Minister eröffnet Impfstoffwerk

**„Top modern“, „technologisch führend“, „in dieser Form einzigartig“ – das waren die Kommentare der Besucher anlässlich der Einweihung des neuen Impfstoffwerks im Rahmen der Vermehrertagung 2008. Und auch Niedersachsens Wissenschaftsminister Lutz Stratmann fand nur lobende Worte.**

In einer Festrede hob der Minister insbesondere die Bedeutung des Labors für den Hochtechnologie-Standort Deutschland und die langjährige Zusammenarbeit von Lohmann Tierzucht mit nds. Institutionen wie mit dem Friedrich-Löffler-Institut, Standort Mariensee, der Universität Göttingen und der Tierärztlichen Hochschule in Hannover hervor. Landrat Kai-Uwe Bielefeld unterstrich in seinem Grußwort die Rolle von Lohmann Tierzucht als weltweit größtem Zuchtbetrieb für Elterntiere. Lohmann sei ein wichtiges Aushängeschild für den Agrarstandort Niedersachsen und insbesondere für den Standort Cuxhaven. Vor über 280 Vermehrern und Partnern aus

28 Ländern hob Dr. Hans-Friedrich Finck, Geschäftsführer der Lohmann Tierzucht GmbH, die Bedeutung des neuen Impfstoff-Werkes für das Unternehmen hervor: „Bestandsspezifische Impfstoffe sind bereits heute eine tragende Säule in der Gesundheitsprophylaxe, und ihre Bedeutung wird weiter zunehmen. Dem tragen wir mit dem Bau des neuen Werkes Rechnung und bauen gleichzeitig unsere führende Stellung in diesem Segment weiter aus.“

In ihren Fachvorträgen gingen Dr. Matthias Voß, Leiter des Veterinär-Labors, und Dr. Rainer Theil, Produktionsleiter im neuen Impfstoffwerk auf die Gesund-

heitsprophylaxe durch stallspezifische Impfstoffe sowie auf die Produktion von stallspezifischen Impfstoffen ein.

## Auch MUMS-Impfstoffe können im neuen Werk hergestellt werden

Voß unterstrich in seinem Vortrag die Kompetenz von Lohmann Tierzucht in der Entwicklung und Produktion von Geflügelimpfstoffen und hob hervor, dass es jetzt auch möglich sei, Impfstoffe wie MUMS-Impfstoffe herzustellen, die der GMP-Verordnung unterliegen. Theil erläuterte den interessierten Besuchern den Produktionsablauf im neuen Werk. Dabei ging er besonders auf den hohen technischen Standard ein und verdeutlichte, welche Anstrengungen unternommen wurden, um einerseits Impfstoffe höchster Qualität zu produzieren und andererseits Umwelt und Mitarbeiter zu schützen.

Besonderes Highlight war die einmalige Gelegenheit, das neue Werk zu besichtigen. Denn wegen der hohen Reinraumbedingungen ist das Betreten des Impfstoffwerks nur autorisierten Mitarbeitern vorbehalten.



v. r. n. l.: Erich Wesjohann, EW Group, Nds. Wissenschafts- und Kulturminister Lutz Stratmann, Dr. Hans-Friedrich Fink und Prof. Dr. Rudolf Preisinger, Geschäftsführung Lohmann Tierzucht

Hochwirksam und schnell verfügbar:

# Bestandsspezifische Impfstoffe sind wichtige Säulen in der Gesundheitsprophylaxe

**Bestandsspezifische Impfstoffe sind eine wichtige Säule in der Gesundheitsprophylaxe. Sie sind hochwirksam, unterliegen aber nicht einem so aufwendigen Zulassungsverfahren, wie allgemein zugelassene Impfstoffe. Im Idealfall können sie bereits nach vier bis sechs Wochen zur Verfügung stehen. Deshalb ist sich Dr. Matthias Voß, Leiter des Lohmann Tierzucht Veterinär-Labors, sicher: „In der kommerziellen Tierzucht sind bestandsspezifische Impfstoffe bereits heute sehr wichtig. Und sie werden in Zukunft noch viel wichtiger.“**

Die Gesundheitsprophylaxe in der Tierzucht basiert auf zwei großen Säulen: Die erste Säule ist die generelle Prophylaxe mit ihren allgemeinen Management-Maßnahmen, wie etwa der Auswahl von Haltungssystemen, Lüftung, Fütterung und Tierbetreuung.

Die zweite Säule ist die spezifische Gesundheitsprophylaxe, bestehend aus den Bio-Sicherheitsmaßnahmen und der Immun-Prophylaxe. Während die Bio-Prophylaxe mit Maßnahmen wie „all in – all out“ in der Regel nur eine Alternative, die nicht

immer durchführbar ist, darstellt, werden in der Immunprophylaxe die Erkrankungen mit zugelassenen Impfstoffen bekämpft. Allerdings stößt diese Behandlung schnell an ihre Grenzen - nämlich immer dann, wenn zugelassene Impfstoffe entweder nicht zur Verfügung stehen oder nicht wirksam genug sind.

## Zulassung von Tierimpfstoffen langwierig und teuer

Die Gründe dafür, dass zugelassene Impfstoffe nicht zur Verfügung stehen, sind

vielfältig. Das kann daran liegen, dass neue Varianten eines Erregers oder nicht bekannte oder nicht erkannte Krankheiten auftreten.

Aber es gibt auch andere Gründe – nämlich wirtschaftliche: Das Zulassungsverfahren für Impfstoffe ist aufwendig, langwierig und teuer.

Für Tierimpfstoffe gibt es einen rechtlichen Rahmen. Auf EU-Ebene ist dies die Richtlinie 2001/82/EG. In der deutschen Rechtsprechung gibt es darüber hinaus das Tierseuchengesetz und die Tierimpfstoff-Verordnung. Für zugelassene Impfstoffe gelten darüber hinaus noch die Vorgaben des Europäischen Arzneibuches sowie die GMP-Richtlinie.

Um eine Zulassung als Impfstoff zu erhalten, können drei bis fünf Jahre



vergehen. Wird aber nur wenig Impfstoff benötigt, weil nur eine kleine Spezies (minor species) betroffen ist oder nur eine geringe Tierzahl einer Spezies (minor use), ist ein solches Verfahren unwirtschaftlich.

Die Lösung heißt hier: MUMS-Impfstoffe (Minor Use/Minor Species). Das hat auch die European Medicines Agency (EMA) erkannt und Richtlinien für MUMS-Impfstoffe entwickelt. Diese Richtlinie soll ein erleichtertes Zulassungsverfahren ermöglichen. Im Idealfall soll sich das Zulassungsverfahren auf einige Monate reduzieren.

Da für bestandsspezifische Impfstoffe keine Zulassungsverfahren notwendig sind, ist im Gegenzug auch deren Anwendung eingeschränkt. Die EU-Richtlinie besagt, dass bestandsspezifische Impfstoffe nur für das bestimmte Tier oder den bestimmten Tierbestand und an dem Ort eingesetzt werden dürfen, aus dem die isolierten pathogenen Organismen hergestellt worden sind.

## Viele Anwendungsgebiete für Impfstoffe

Die Tierimpfstoff-Verordnung lässt noch einen weiteren Einsatz zu. Sie gestattet die Anwendung auch an den Tieren, die in den Herkunftsbestand des Erregers verbracht werden oder wenn die Impfung dazu dient, Antikörper in Tieren zu induzieren, die in den Herkunftsbestand des

Erregers verbracht werden. Das kann etwa durch Impfen von Küken oder Junghennen erfolgen. Grundlage ist dabei stets, dass der Impfstoff aus den Erregern des Legebstands gewonnen wurde.

Hauptanwendungsgebiete für bestandsspezifische Impfstoffe sind bakterielle Erreger, wie z. B. E. coli, Rotlauf, Pasteurellen, Haemophilus, ORT, Salmonellen (besonders der Gruppe C) und Enterokokken sowie virale Erreger wie z. B. Aviäre Reo- und Adenoviren, schwach pathogene Influenzaviren (z. B. H6 oder H9), Bronchitis (z. B. China QX) oder Entenhepatitis.

Bestandsspezifische Impfstoffe ergänzen damit ganz entscheidend die Immunprophylaxe bei der Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen – nicht nur beim Geflügel, sondern auch bei anderen Tierarten, wie etwa Schwein, Fisch oder Kaninchen.

„Mit bestandsspezifischen Impfstoffen kann schnell auf neue Erreger oder Erregertypen reagiert werden, für die keine zugelassenen Impfstoffe zu Verfügung stehen“, resümiert Matthias Voß. „Grundvoraussetzung für die Herstellung bestandsspezifischer Impfstoffe ist ein diagnostisches Labor. Es muss über Methoden der Erreger-Anzucht verfügen und zusätzlich auch innovative Methoden zur weiteren Charakterisierung der Isolate wie PCR, Sequenzierung und Pathogenitäts-Nachweise anwenden können“, so Voß weiter.

Das Veterinär-Labor von Lohmann Tierzucht verfügt über die Erfahrung von 50 Jahren veterinärmedizinischer Diagnostik und von über 40 Jahren Entwicklung und Herstellung von Geflügelimpfstoffen. „Der Neubau des Impfstoffwerkes ermöglicht es, künftig bestandsspezifische Impfstoffe unter den höchsten Qualitätsanforderungen an die Räumlichkeiten und Ausrüstungen sowie die technischen Abläufe herzustellen. Mit der Erteilung des GMP-Status Mitte 2009 können wir auch solche Impfstoffe herstellen, die den GMP-Anforderungen unterliegen“, ergänzt Dr. Hans-Friedrich Finck.

## Produktion unterliegt der Tierimpfstoff-Verordnung

**Auch wenn die Herstellung bestandsspezifischer Impfstoffe nicht der GMP-Richtlinie unterliegt, so macht jedoch die Tierimpfstoff-Verordnung Vorgaben an die Räumlichkeiten und die Validierung bestimmter Herstellungsprozesse.**

Generell beinhaltet der Herstellungsprozess bestandsspezifischer Impfstoffe folgende Schritte:

- Einsendung des diagnostischen Materials an das Labor.
- Isolierung und möglichst genaue Charakterisierung des Erregers.
- Herstellung einer Reinkultur.
- Vermehrung des Erregers.
- Inaktivierung (mit Prüfung der Inaktivierung).
- Formulierung des eigentlichen Impfstoffes.
- Qualitätskontrolle mit Prüfung der Sterilität des Endproduktes, möglichst auch der Verträglichkeit und Wirksamkeit (Antikörper-Ausbildung).



Bestandsspezifische Impfstoffe:

# Produktion im neuen Impfstoffwerk

**Generell erfolgt die Herstellung bestandsspezifischer Impfstoffe in sieben aufeinander aufbauenden Schritten: Zunächst einmal muss das zu diagnostizierende Material an das Labor geschickt werden. Im zweiten Schritt geht es nun darum, den Erreger zu isolieren und möglichst genau zu charakterisieren. In den Schritten drei bis fünf wird nun aus dem Erreger eine Reinkultur erstellt, der Erreger vermehrt und inaktiviert. Ist dies geschehen, kann in Schritt sechs dann der eigentliche Impfstoff formuliert und produziert werden. Zum Schluss folgen die Qualitätskontrolle mit der Prüfung der Sterilität des Endprodukts, dessen Verträglichkeit und Wirksamkeit.**

Rein praktisch bedeutet das, dass aus erkrankten Tieren eines Bestandes die Erreger – seien es Bakterien oder Viren – im Labor isoliert, aufgereinigt und durch eingehende Untersuchungen identifiziert werden. Im nächsten Schritt – im Schritt vier des Prozesses wird dann aus diesen Isolaten sogenanntes „Saatmaterial“ hergestellt. Das heißt, dass diese Erreger vermehrt werden. Je nach Erregertyp stehen dazu entsprechende Produktionsmethoden zur Verfügung. Bakterien werden in der Regel in entsprechenden Nährlösungen in Glasgefäßen oder in Fermentern vermehrt.

## Gesondertes Verfahren für kleine Bestände

Dann erfolgt die Ernte: Die so gewonnenen Erreger werden durch Mikro- oder Ultrafiltration gewonnen oder über eine Zentrifugation konzentriert.

Für sehr kleine Bestände ist dieses Verfahren allerdings zu aufwendig. Sie werden deshalb in Petrischalen vermehrt. Die Aufbereitung der Erreger ist dann viel einfacher.

Bei Viren sieht das Verfahren anders aus, da Viren sich nicht ohne einen spezifischen Wirt, für den auf der Virusoberfläche entsprechende Rezeptoren vorhanden sein müssen, vermehren können. Bei Geflügel erfolgt das Wachstum in der Regel in bebrüteten Hühner- oder Enteneiern. Bei andere Tierarten, zum Teil aber auch bei Geflügel, findet das Wachstum in geeigneten Zellkulturen in Petrischalen oder in Rollflaschen statt.

Die so gewonnenen Antigene müssen nun nach einem validierten Verfahren zu nächst inaktiviert werden. Erst dann kann die Produktion des eigentlichen Impfstoffs beginnen.

Damit der Impfstoff seine optimale Wirksamkeit erreicht, wird das Antigen mit einem Mineralöl emulgiert. Ist diese Emulsion stabil, erfolgt das Abfüllen, Etikettieren und Verpacken.

So weit der Herstellungsprozess in groben Schritten. In der Praxis ist der Prozess selbstverständlich aufwendiger. Durch die verschiedenen Produktionsmethoden

und um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind drei Labors für die Produktion notwendig: eines für die Virusproduktion im Embryo, eines für die Virusproduktion in Zellkulturen und eines für die Bakterienproduktion. Des Weiteren wurde ein separates Labor für die Herstellung der Saatmaterialien eingeplant. Diese Labornordnung ermöglicht zudem eine optimale Flexibilität, um auf die Anforderungen des Marktes schnell und bedarfsgerecht reagieren zu können.

## Ziel ist ein größtmöglicher Produktschutz

Die Emulgierung erfolgt in Edelstahl tanks in einem geschlossenen System. Alle Tanks und Leitungen lassen sich durch eine Anlage reinigen (CIP, cleaning in place) und danach mit Dampf „in line“ sterilisieren. Die abschließende Abfüllung findet unter einer Laminar-flow-Anlage statt. Dazu ist die Anlage mit einem höheren Luftdruck ausgestattet, als die Umgebung. So kann keine Umgebungsluft in das Produkt gelangen.

Bei der Planung des Labors lag ein Hauptaugenmerk auf dem größtmöglichen Produktschutz. Um das zu erreichen, herrscht in allen Räumen, in denen offene Behälter gehandhabt werden, die größte Reinheitsklasse und der höchste Luftdruck. Dadurch kann keine Luft aus einem „unreinen“ Bereich in den Reinraum strömen. Die Laminar-flow-Anlagen (Klasse A) befinden sich jeweils in einer Klasse-B-Umgebung.

Damit alle Druckkaskaden auch ständig aufrecht erhalten bleiben, ist der Zugang zu den Produktionsbereichen nur über Personal- bzw. Materialschleusen möglich.

Selbstverständlich darf auch das Personal keine Verunreinigungen eintragen. Deshalb ist eine entsprechende Reinraumkleidung unentbehrlich.

Doch damit nicht genug der Vorbeugung. Schließlich gilt es auch, Kreuzkontaminationen von Charge zu Charge zu verhindern. Deshalb müssen alle Räume nach der Antigenproduktion chemisch desinfiziert werden. Dies erfolgt mit Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) in der Gasphase, weil dieses Verfahren keine unerwünschten Nebenprodukte hinterlässt: Überschüssiges Gas wird einfach zu Wasserstoff und Sauerstoff reduziert. Alle diese Maßnahmen laufen vollautomatisch unter größtmöglichen Sicherheitsvorkehrungen ab.

Der reine Produktschutz allein ist jedoch nicht ausreichend. Auch die Umgebung darf nicht mit den verarbeiteten Erregern verunreinigt werden. Dafür sorgen entsprechende Filter in der Abluftanlage sowie entsprechende Druckabstufungen in den jeweiligen Räumen. Eine chemische Abwasseraufbereitungsanlage hält auch das Abwasser frei von Verunreinigungen. An diese Wasseraufbereitungsanlage sind alle Räume angeschlossen, in denen lebende Mikroorganismen verarbeitet werden.

Unter Berücksichtigung all dieser Punkte entstanden insgesamt acht Einheiten, die sowohl räumlich als auch organisatorisch getrennt voneinander sind. Das gilt auch für die Lüftungsanlagen.

Nachdem alle Produktionsprozesse validiert und die erforderlichen Dokumentationen erstellt worden sind, kann mit dem Erhalt des GMP-Status gerechnet und auch die Produktion von MUMS-Impfstoffen geplant werden.



*Überwachung der sterilen Impfstoff-Zubereitung*

Escherichia coli-Infektionen beim Geflügel:

# Grundlagenforschung als tragende Säule in der Entwicklung präventiver Maßnahmen

Von Dr. Christa Ewers und Prof. Dr. Lothar H. Wieler, Freie Universität Berlin

**Obwohl Infektionen mit Escherichia coli seit mehr als einem Jahrhundert bekannt sind, stellen sie weltweit für die Geflügelindustrie noch immer eine bedeutende endemische Erkrankung dar. Der Krankheitskomplex, der durch Stämme des Pathotyps aviär pathogene E.coli (APEC) hervorgerufen wird, ist gekennzeichnet durch lokale und systemische Infektionen, die gleichermaßen zu erheblicher Morbidität und Mortalität bei Wirtschaftsgeflügel und Wildvögeln führen können. Bestandspezifische Impfstoffe liefern lediglich einen limitierten, stammspezifischen Schutz, und ein kommerziell verfügbarer Subunit-Impfstoff basiert auf Antigenen, die nur in einer geringen Subpopulation von APEC-Stämmen vorhanden sind.**

Bis in die jüngste Vergangenheit suggeriert die Literatur zu APEC, dass virulente Stämme auf wenige Serogruppen, insbesondere O1, O2 und O78 begrenzt sind. Über die wahre Diversität des Mikroorganismus, nicht nur in Bezug auf seinen Serotyp, sondern auch auf die Virulenzausstattung und den phylogenetischen Hintergrund, ist hingegen sehr wenig bekannt. Eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung präventiver Maßnahmen zur Verhinderung der schwerwiegenden APEC-bedingten Verluste ist jedoch nicht nur eine fundamentale Kenntnis des kausalen Mikroorganismus, sondern auch der Pathogen-Wirt-Interaktion sowie des Erregerreservoirs. Gleichermäßen erfordert die Aufschlü-

selung der mikrobiellen Pathogenese die Verfügbarkeit eines natürlichen Tierinfektionsmodells zur experimentellen Reproduktion der Erkrankung. In den meisten der bislang etablierten Modelle wurden embryonierte Hühnereier, Eintagsküken oder 2 Wochen alte Hühner verwendet, denen ein adäquates Immunsystem fehlt, das in keiner Weise vergleichbar ist mit dem von erwachsenen Hühnern, die sich in der Regel mit APEC-Infektionen auseinandersetzen müssen. Ebenso wurden in den genannten Modellen mit der Applikation der Bakterien unter die Haut, in die Muskulatur bzw. direkt in den thorakalen Luftsack der Hühner überwiegend Infektionsrouten gewählt, die den natürlichen Infektionsweg

von APEC nur unzureichend bzw. überhaupt nicht widerspiegeln und in jedem Fall den oberen Respirationstrakt als primäre Eintrittspforte und Organsystem der initialen unspezifischer Abwehr umgehen. Vor diesem Hintergrund etablierte die Arbeitsgruppe „Infektionsbiologie und Phylogenie bakterieller Pathogene“ (IPP) des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen vor einigen Jahren eine intensive Kooperation mit der Lohmann Tierzucht GmbH. Ziel war und ist die umfassende molekulare Charakterisierung einer repräsentativen Sammlung von APEC-Feldstämmen mit besonderem Augenmerk auf deren Serotyp, Virulenzgenmuster und Phylotyp. So zeigten die phylogenetischen Studien unter anderem, dass sich APEC-Stämme in der Vergangenheit mehrmals unabhängig von ihrem letzten gemeinsamen bakteriellen Vorfahren getrennt entwickelt haben. Dabei sprechen wir von Zeiträumen, die bis zu ca. 29 Millionen Jahre beinhalten.

Diese divergierenden zeitlichen Ursprünge haben ihre Fortführung in der Ausbildung





verschiedener APEC-Subpopulationen genommen, die wir heute in ihrer gesamten Diversität als Erreger von lokalen und systemischen Infektionskrankheiten beim Geflügel vorfinden. Es ist daher keineswegs überraschend, dass neben den drei „klassischen“, die Literatur beherrschenden Serotypen O1, O2 und O78, bei etwa der Hälfte der APEC unzählige weitere Serotypen identifiziert wurden, die gleichermaßen zu Krankheitsausbrüchen in Geflügelbeständen führen. In ähnlicher Weise führte die Testung von bis zu 40 virulenzassoziierten Genen bei APEC nur selten zum Nachweis von identischen Virulenzgenmustern. Das Pathovar unterliegt vielmehr auch hier einer enormen Variabilität, deren Ursache in einer Kombination von unterschiedlichem phylogenetischen Hintergrund sowie einem Austausch von Genen mittels horizontalen Gentransfers zu sehen ist. Trotz der starken Diversität innerhalb des APEC-Pathotyps lassen einige der in unseren Untersuchungen identifizierten größeren Subpopulationen eine höhere Virulenz vermuten. Diese in-vitro-Daten waren nun die Grundlage zur Testung von repräsentativen Stämmen der einzelnen APEC-Subpopulationen in einem in-vivo-Modell. Konsequenterweise etablierten wir deshalb unter Verwendung des Wildtyp-Ausbruchstammes IMT5155 (O2:K1:H5), der in einem Geflügel-Zuchtbetrieb in Deutschland isoliert wurde und zu einem der weltweit vorherrschenden Subpopulationen gehört, ein Hühner-Infektionsmodell. Besonderes Augenmerk lag dabei neben der Nutzung eines APEC-Prototyp-Stammes auf (i) dem

Alter und somit der Immunkompetenz der Tiere (5 Wochen alt, Immunsystem äquivalent dem adulter Tiere), (ii) der Verwendung reproduzierbarer Read-out-Systeme (klinischer Score, Organscore und bakterielle Belastung innerer Organe 24 h nach der experimentellen Infektion), und (iii) der Wahl einer intratrachealen Infektionsroute (Abb. 1), mit dem Ziel, den natürlichen Infektionsweg optimal zu simulieren. Mit der intratrachealen Infektion einer Bakteriensuspension von 109 Koloniebildenden Einheiten (KBE) des APEC-Stammes IMT5155 in 5 Wochen alten Hühnern konnte das typische klinische Bild (Abb. 2) einer systemischen E.coli-Infektion beim Huhn, einschließlich der Entzündung von Luftsack, Lunge, Leber und Herzbeutel, reproduziert werden, sowie die Bakterien aus den erkrankten Tieren reisoliert und angezüchtet werden. Somit konnten die Henle-Kochschen Postulate einer monokausalen Infektionskrankheit erfüllt werden. Ebenso konnten wir zeigen, dass eine integrierte Negativkontrolle, in Form des E. coli-Stammes IMT11327, der aus dem Darm eines

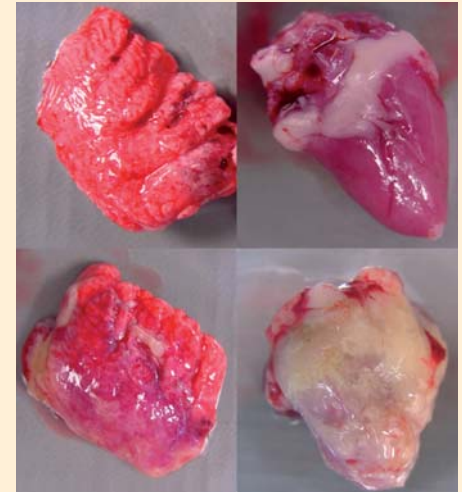


Abb. 3: Makroskopisches Bild von Lunge (l) und Herz (r) von Hühnern 24h nach der Infektion mit Negativ-Kontrollstamm IMT11327 und APEC-Stamm IMT5155.

klinisch gesunden Huhnes isoliert wurde, bei Applikation der gleichen Bakterienkonzentration keine klinischen Symptome und nur geringe, lokalisierte entzündliche Prozesse hervorrief, gemessen an einem signifikant niedrigeren Organscore sowie einer nur marginalen systemischen Verbreitung des Bakteriums in den Organen der Tiere (Abb. 3 und 4). Die molekulare Charakterisierung der APEC-Subpopula-

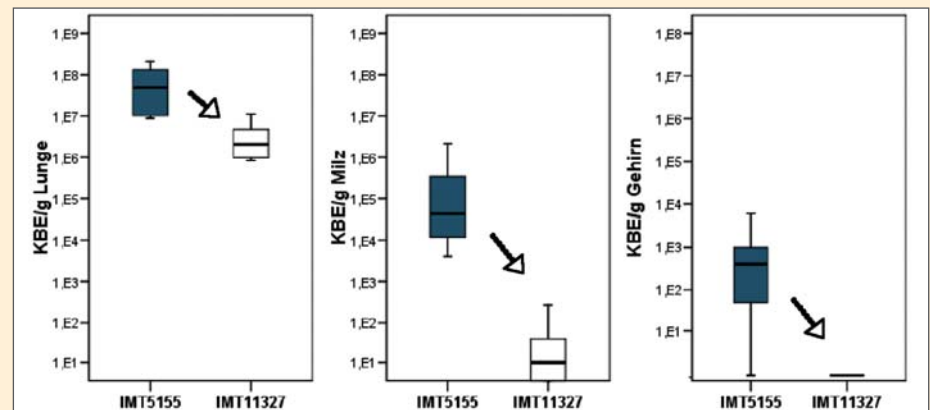


Abb. 4: Bakterielle Belastung (KBE = Koloniebildende Einheiten) der Organe von Hühnern 24h nach der Infektion mit APEC-Stamm IMT5155 und Negativ-Kontrollstamm IMT11327.



Abb. 1: Applikation definierter Bakterienkonzentrationen in die Trachea des Huhnes mittels einer 10 cm großen Knopfkanüle.



Abb. 2: Klinische Symptomatik bei Hühnern 18 h nach der Infektion mit APEC-Stamm IMT5155.



tionen im Zusammenhang mit der Testung der Stämme in einem relevanten Tiermodell erlaubt nun erstmals die valide Identifizierung des Pathotyps APEC.

Mit diesen Modellen sind wir nun in der Lage die entscheidenden Fragen zu adressieren, die uns zukünftig eine erfolgreiche Bekämpfung, wie z. B. die Entwicklung einer validen Diagnostik, eines Impfstoffes, die Aufklärung von Infektketten oder auch den Nachweis des APEC-Reservoirs erlauben. Tatsächlich konnten wir inzwischen in einer systematischen Untersuchung von E.coli-Stämmen aus dem Darm klinisch gesunder Hühnerbestände sowie deren unmittelbarer Umgebung (z. B. Stall-Luft, Trinkwasser und Reinigungsvorrichtungen) Stämme isolieren, die in ihrem Virulenzgen-Muster, dem Phylotyp sowie ihrer Pathogenität im Infektionsmodell von dem Ausbruchstamm IMT5155 nicht unterscheidbar waren. Die natürliche Ansteckungsquelle für eine systemische E.coli-Infektion des Huhnes ist demnach das Huhn selbst. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Erkenntnis, dass diesem Prozess keine klinische Infektion vorausgegangen sein muss. Vielmehr müssen wir uns mit der Situation vertraut machen, dass

lichkeit von APEC im Darm von Hühnern ab – eine völlig neue strategische Möglichkeit.

Durch die Zusammenarbeit mit der Lohmann Tierzucht GmbH (Prof. Rudolf Preisinger, Dr. Hans-C. Philipp) und die Gewinnung weiterer kompetenter Forschungspartner (Prof. Bernd Kaspers und Dr. Susanne Schwarz, Ludwig-Maximilians-Universität München; Prof. Henner Simianer, Dr. Reza Sharifi und Dr. Steffen Weigend, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit des FLI) haben wir z. B. im Rahmen der deutschen Genomforschung das FUGATO-Projekt „E.Coli-Chick“ durchführen können. Nun können wir die vom Münchener Partner neu entwickelten Methoden zur Bestimmung von Parametern des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems mittels Mikroarray und Real-Time PCR nutzen, um die Immunantwort der Hühner im Rahmen der Infektion besser studieren zu können. Auch konnte gezeigt werden, dass genetisch differierende Hühnerrassen bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber APEC keine Unterschiede zeigen, eine Resistenzzüchtung der Hühner nach den nun vorliegenden Daten also nicht sinnvoll ist.

Hintergrund der APEC-Stämme in ihrer Pathogenität für das Tier widerspiegelt.

Perspektivisch können Mutanten von Wildtypstämmen, bei denen pathogenetisch relevante Gene ausgeschaltet wurden, viel versprechende Kandidaten für die Impfstoffherstellung darstellen. Geeignete Impfstoffkandidaten können entsprechend im Hühner-Infektionsmodell im Rahmen von Immunisierungsversuchen getestet werden, um so dem Problem von Prävention und Kontrolle von APEC-Infektionen effizient entgegenzutreten zu können. Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die vorliegenden Untersuchungen einen enormen Beitrag zum Verständnis von aviär pathogenen E.coli sowie der Wirt-Erreger-Interaktion geleistet haben – einer, wie bereits anfangs erwähnt, Grundvoraussetzung für die Bekämpfung der systemischen E.coli-Infektion beim Geflügel. Dies war und wird auch weiterhin nur möglich sein durch intensive Kooperation mit kompetenten Forschungspartnern. Die hier geleistete Forschung ist ein nachdrücklicher Beleg dafür, dass nur eine hypothesengetriebene intensive Forschung langfristige Erfolge in der Bekämpfung



ein Teil des klinisch gesunden Bestandes potentiell pathogene E.coli im Darm trägt, die unter bestimmten Bedingungen, insbesondere einem schlechten Hygienemanagement, zu folgenschweren Infektionen führen können. Aus dieser Erkenntnis leitet sich folgerichtig eine Bekämpfungsmög-

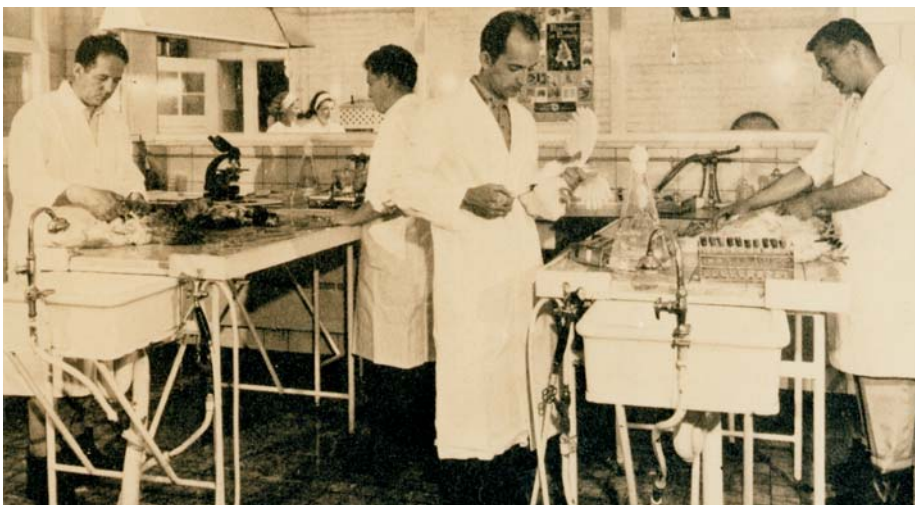
In weiteren laufenden Untersuchungen bestimmen wir Pathogenitätsunterschiede zwischen den phylogenetisch determinierten APEC-Subpopulationen. Auch hier haben wir, in Übereinstimmung mit den in-vitro-Daten, erste Hinweise darauf, dass sich der unterschiedliche phylogenetische

von Tierkrankheiten haben wird, während oberflächliche experimentelle Ansätze häufig zu fehlerhaften Interpretationen führen. Dies ist gerade im Hinblick auf die tierärztliche Verantwortung im Bereich Veterinary Public Health (VPH) von höchster Relevanz.

Eine Reise durch die Zeit:

## 50 Jahre Veterinär-Labor

**Ende der 50er Jahre schlug die Geburtsstunde des Veterinär-Labors: Firmengründer Heinz Lohmann schloss Lizenzverträge für die Masttiere Nichols und die Legetiere H&N ab. Gleichzeitig begann er, die vier Säulen der Geflügelzucht in Cuxhaven aufzubauen: Genetik, Fütterung, Management und Veterinärdienst.**



Rückblick: die Arbeit im Veterinärlabor vor rund 50 Jahren

Zu dieser Zeit steckte die Geflügelzucht in Europa noch in den Kinderschuhen. Ganz anders dagegen in den USA. Hier wurde Geflügelzucht bereits seit den 40er Jahren in großem Stil betrieben. Deshalb knüpfte Heinz Lohmann schon früh Kontakte mit amerikanischen Technikern und Wissenschaftlern, im Veterinärbereich vor allem mit Dr. Donald Zander von H&N. Diesen intensiven Kontakten war es zu verdanken, dass Zander seinen Labor-techniker Richard Raymond für einige Jahre an Lohmann „auslieh“. Das war der eigentliche Startschuss für das Veterinär-Labor: 1959 entstand in der Alten Industriestraße auf dem Gelände des Kohlenkontors das Labor. Ein Sektionsraum wurde neu gebaut und ein Schuppen zum Medikamentenlager umgerüstet.

Erster Laborleiter war Dr. Joachim Quandt. Dem tierärztlichen Personal gehörten

ferner Dr. Egon Vielitz und die Drs. Helga Landgraf, Reinhard Kirsch sowie der vor allem im Außendienst tätige Heino Löwensen an. Als Löwensen bei einem tragischen Verkehrsunfall ums Leben kam, übernahm Dr. Claus Conrad seine Funktion. Ihnen zur Seite standen im Labor Frau Holland-Letz und vier weitere MTAs. Nach dem Ausscheiden von Dr. Quandt übernahm Dr. Vielitz 1962 den weiteren Auf- und Ausbau des Labors.

Im Jahre 1968 schied Dr. Reinhard Kirsch aus dem Laborteam aus. Ihm folgte Dr. Bernd Hüttner vom Bundesgesundheitsamt, der die tierärztliche Betreuung der Mast-Zuchtfarmen bis zu seinem Tod 1983 leitete.

1997 wechselte Dr. Vielitz nach 39 Jahren als Leiter des Veterinär-Labors in den Ruhestand. Seine Nachfolge übernahm Dr. Matthias Voß, der bereits seit 1986 tierärzt-

licher Mitarbeiter war und das Unternehmen bestens kannte. Ihm zu Seite steht Dr. Hans-Christian Philipp, der 1994 in unser Team eintrat, im Jahre 2000 kam Dr. Atoussa Mazaheri hinzu. Derzeit arbeiten drei Tierärzte und 30 Mitarbeiter im Labor.

Doch zurück zu den Anfängen: Es begann eine sehr bewegte Zeit. An Arbeit fehlte es dem Team von Beginn an nicht: Täglich trafen 15 – 20 Sendungen erkrankter oder toter Tiere aus allen Teilen Deutschlands zur Diagnostik im Cuxhavener Labor ein. Mehr noch: Kaum war das Labor gegründet, stand die Geflügelzucht in Deutschland kurz vor dem Aus: 1960 gab es verheerende Geflügelpest-Ausbrüche (Newcastle Disease, ND). Als Impfstoff stand nur eine Inaktivat-Vakzine zur Verfügung, die offensichtlich schlecht wirkte.

Heinz Lohmann wollte deshalb die Geflügelzucht einstellen nach dem Motto: „keine Hühner, keine Pest!“ Doch als der Impfstoff ND HB1 aus den USA eingesetzt wurde, entspannte sich die Lage. Gleichzeitig war dies ein eindrucksvolles Beispiel für die Bedeutung von Impfungen, und so wurden in der Folge alle Tiere gegen ND und Pocken geimpft.

Da in der Startphase eigene Kapazitäten zur Impfstoff-Herstellung fehlten, arbeitete Lohmann Tierzucht zunächst mit den Behring-Werken in Marburg zusammen, bis es 1968 dann endlich so weit war: In den Räumen am Hafen nahm die eigene Impfstoff-Produktion ihren Betrieb auf.

Der Beginn der 60er Jahre war auch in anderer Hinsicht ereignisreich: Überall im Land entstanden große Farmen. Somit stieg auch der Bedarf an tierärztlicher Betreuung stark an. Lohmann wollte von Cuxhaven aus mit Laborwaren und zehn Tierärzten diese Versorgung übernehmen. Doch der überregionale Tierärzte-Einsatz scheiterte am Widerstand der Tierärztekammern. Ihre Forderung: Therapien sind von den örtlichen Tierärzten durchzuführen. So bildete Lohmann dann in den

## LOHMANN ...Rückblick

Jahren 1961-1963 ca. 150 Tierärzte deutschlandweit in Diagnose und Therapie aus.

Auch die Öffentlichkeit interessierte sich für das aufstrebende Unternehmen. Regelmäßig berichteten Fernsehteams über die moderne Geflügelzucht. Außerdem kamen jährlich Hunderte von Besuchern nach Cuxhaven. Unter ihnen auch der gesamte Lehrkörper der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Im Mittelpunkt des Interesses: die großen Stallungen, die wegen des großen Interesses z. T. „Besucherräume“ hatten, sowie die Auslaufhaltung der Jungtiere in Großenhain.



Rein-Raum-Bereich im Impfstoffwerk

Die Geflügelhalter erkannten bereits sehr früh die Vorteile der in Cuxhaven entwickelten Therapien und wollten die gleichen Therapeutika einsetzen. So entwickelte sich im Veterinär-Labor ein reger Versandhandel, der schnell einen Umsatz von nahezu einer Million DM pro Jahr erreichte.

Das war mit den bestehenden Strukturen auf Dauer aber nicht zu bewältigen. Auf Initiative von Dr. Egon Vielitz entstand so der Tierarzneidienst „TAD“ im Jahre 1963.

Anfang der 90er Jahre traten verstärkt invasive Salmonella-Infektionen auf. Davon blieben auch die Lohmann-Farmen nicht verschont. Doch durch eine verschärfte Farmhygiene und das Erhitzen des Futters gelang es, die Infektionen zu eliminieren. Die anfangs durchgeführten Impfungen waren somit nicht mehr nötig.

Etwa zur gleichen Zeit wurde die klassische Therapie mit antibakteriellen Mitteln wegen der Rückstandsproblematik und daraus resultierenden langen Wartezeiten praktisch unmöglich. Als Konsequenz

daraus wurden immer mehr bestands-spezifische Impfstoffe entwickelt – auch gegen bakterielle Infektionen. Der Bau des GMP-gerechten Impfstoffwerks im Jahre 2007/08 trägt dem ständig wachsenden Bedarf Rechnung.

Und die Entwicklung geht weiter: Molekularbiologische Techniken und ELISA-Tests

### Meilensteine des Veterinär-Labors:

**1961:** Nach seuchenartigen Ausbrüchen der Aviären Encephalomyelitis, AE, Entwicklung eines Lebendimpfstoffes, Zulassung des ND Impfstoffes HB1.

**ab 1962:** Marek-Resistenz-Teste in Deutschland und Spanien.

**1963/64:** IB Impfvversuche, Isolate verschiedener Variant Stämme.

**1966:** Erste SPF Tierhaltung bei Lohmann. Bau eines Tierhauses für diagnostische Tests und Impfstoffprüfung.

**1967:** Entdeckung des ursächlichen Erregers der Marek durch Dr. Peter Biggs, England, – ein Herpes Virus.

**1968:** Mycoplasma-Eradikation aus den Lohmann Zuchtbetrieben.

Trotz der Marek-Resistenzzucht nahm die tumoröse Form der Marek – besonders in Südeuropa, ständig zu – mit Verlusten bis 50 %.

**1970:** Übernahme des Putenherpes Virus (PHV) aus den USA als Impfvirus gegen Marek.

Das Unternehmen Lohmann wird restrukturiert: LTZ, LTE, TAD, LAB werden selbstständige Firmen.

**1971:** Erfolgreiche Impfvversuche mit PHV in Spanien.

ermöglichen ständig bessere Diagnosen, so dass sich heute durch die Untersuchung einer Blutprobe Antikörper gegen fast alle Krankheiten nachweisen lassen. Die Kunden von Lohmann Tierzucht können deshalb bei Krankheitsausbrüchen in ihren Herden sicher sein, schnell eine zutreffende Diagnose zu erhalten und umgehend kurative Maßnahmen einleiten.

**1971/72:** Neubau des Veterinär-Labors an der Abschnede.

**ab 1972:** Ausbau der Impfstoff-Produktion.

**1976:** EDS in Holland. Die Ursache ist eine Kontamination von Marek-Vakzinen mit einem Enten-Adenovirus. Lohmann Vakzine bleibt frei davon, da aus Hühner-SPF-Kulturen hergestellt.

**1978:** Avirulenter Gumboro-Impfstoff CU-1M.

**1980/81:** ILT-Ausbrüche in Deutschland, Entwicklung eines Impfstoffes.

**1982:** Marek Ausbrüche in PHV geimpften Herden – besonders im Nahen Osten.

**1983/84:** Impfvversuche mit Marek-Rispensvirus CVI 988.

Hohe Broilerverluste durch eine neue Krankheit: Gangränöse Dermatitis.

**1985:** Zulassung der Rispens-Vakzine, die sich als vollwirksam erwies.

Leukose-Eradikation bei LSL.

**1986/87:** Ursachliche Klärung der Broiler-Krankheit: Anaemie Virus (CAV) durch Dr. Vicco von Bühlow, FUB, in Zusammenarbeit mit dem Veterinär-Labor.

**1987:** Lohmann SPF-Herden als erste weltweit CAV frei.

**1988:** Hoch pathogene Gumboro-Krankheit. Untersuchung des neuen Pathotyps und Entwicklung eines Impfstoffs.

**1990:** Zulassung der CAV Vakzine: Thymovac, weltweit die erste Lebendvakzine.

### Termine

Jubiläums-Kongress des Veterinär-Labors  
Bremerhaven, 9. - 10. Juni, 2009

VIV Europe 2010

### Impressum

**Herausgeber:** LOHMANN TIERZUCHT GmbH  
Am Seedeich 9 – 11 · 27472 Cuxhaven (Germany)  
P.O.Box 460 · 27454 Cuxhaven (Germany)  
Phone +49 (0)47 21 – 505-0 · Telefax +49 (0) 4721 – 505 222  
Email: Info@ltz.de · www.ltz.de

**Verantwortlich:** Dr. Klaus Schernewsky (schernewsky@ltz.de)

**Redaktionelle Mitarbeit:** Dr. Hans-Friedrich Finck, Prof. Dr. Rudolf Preisinger, Dr. Klaus Schernewsky, Dr. Rainer Theil, Dr. Matthias Voß, Dr. Egon Vielitz, Dr. Christa Ewers, FU Berlin, Prof. Dr. Lothar H. Wieler, FU Berlin.

**Konzept, Text und Gestaltung:** 360 Grad – Agentur für integrierte Kommunikation und Marketing GmbH, Leimen, www.360Grad-komm.de

**Realisation:** Kraft & Partner, Leimen, www.kraftundpartner.com

**Druck:** Druckerei Wöbber, Cuxhaven