

## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-31-5

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvgn.net](mailto:geschaeftsstelle@dvgn.net)  
[www.dvgn.net](http://www.dvgn.net)

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Embryoletalität, Genotypisierung und  
Resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale*-Isolate**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Konstanze Waldow  
Tierärztin aus Leipzig

Berlin 2009  
Journal-Nr.: 3302

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. S. Grund  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Richter

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

poultry diseases, *Ornithobacterium rhinotracheale*, antibiotics, drug resistance, microbial sensitivity test (MeSH), embryo mortality, gene mapping, random amplified polymorphic DNA

Tag der Promotion: 21.07.2009

**Inhalt**

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Bedeutung .....	2
2.2	Ätiologie.....	2
2.2.1	Morphologische und kulturelle Eigenschaften .....	2
2.2.2	Serologische Typisierung .....	4
2.2.3	Genetische Diversität.....	5
2.2.4	Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen.....	7
2.2.5	Tenazität.....	10
2.3	Epizootiologie .....	10
2.3.1	Wirtsspektrum.....	10
2.3.2	Übertragung.....	11
2.3.3	Pathogenität und Synergien anderer Krankheitserreger.....	11
2.4	Krankheitsbild .....	13
2.4.1	Pathogenese.....	13
2.4.2	Klinische Symptome und Verlauf .....	14
2.4.3	Pathologisch-anatomische Veränderungen.....	15
2.4.4	Histologisch-pathologische Veränderungen .....	16
2.4.5	Immunantwort.....	16
2.5	Diagnose .....	18
2.5.1	Direkter Nachweis.....	18
2.5.1.1	Erregernachweis .....	18
2.5.1.2	Erregerisolierung .....	18
2.5.1.3	Erregeridentifizierung.....	19
2.5.1.4	Erregertypisierung.....	20
2.5.2	Indirekter Nachweis .....	20
2.5.3	Differentialdiagnose .....	21
2.6	Bekämpfungsmaßnahmen und Kontrolle .....	22
2.6.1	Therapie .....	22
2.6.2	Immunprophylaxe .....	23
2.6.2.1	Aktive Immunprophylaxe.....	23
2.6.2.2	Passive Immunprophylaxe.....	24

<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1	Material.....	25
3.1.1	Verbrauchsmaterial und Geräte .....	25
3.1.2	Inhalt der verwendeten Kits.....	30
3.1.3	Medien und Puffer.....	30
3.1.4	Bakterienstämme und Seren.....	32
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung .....	33
3.2.1.1	Isolierung .....	33
3.2.1.2	Biochemische Identifizierung .....	34
3.2.1.3	Molekularbiologische Identifizierung .....	34
3.2.1.4	Sequenzierung des OR 16S-F1/OR 16S-R1 PCR-Produktes des Standardserotypen F .....	36
3.2.1.5	Serotypisierung.....	37
3.2.1.6	Langzeitlaufbewahrung .....	37
3.2.2	Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting .....	37
3.2.2.1	Vorausgehende Untersuchung .....	38
3.2.2.2	Durchführung des Fingerprintings mittels RAPD-PCR .....	39
3.2.2.3	Auswertung.....	39
3.2.3	Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen .....	40
3.2.3.1	Vorausgehende Untersuchung .....	40
3.2.3.2	Durchführung des Embryoletalitätstests.....	40
3.2.3.3	Erfassung und Bewertung der Embryoletalität .....	41
3.2.3.4	Bakteriologische Untersuchung.....	41
3.2.3.5	Auswertung.....	42
3.2.4	Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) .....	42
3.2.4.1	Mikrobouillondilutionsmethode.....	42
3.2.4.2	Vorausgehende Untersuchungen.....	43
3.2.4.3	Durchführung der Mikrobouillondilution .....	44
3.2.4.4	Auswertung.....	46

4	Ergebnisse.....	47
4.1	Identifizierung und Charakterisierung des Erregers .....	47
4.1.1	Isolierung .....	47
4.1.2	Biochemische Identifizierung .....	47
4.1.3	Molekularbiologische Identifizierung .....	48
4.1.4	Serotypisierung.....	51
4.2	Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting .....	51
4.2.1	Vorausgehende Untersuchung .....	51
4.2.2	RAPD-PCR mit allen ORT-Standardstämmen .....	53
4.2.3	Untersuchungen an ORT-Feldisolaten .....	56
4.2.3.1	Feldisolate des Serotyps A .....	57
4.2.3.2	Feldisolate des Serotyps B .....	58
4.2.3.3	Feldisolate des Serotyps C .....	60
4.2.3.4	Feldisolate des Serotyps E .....	62
4.2.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der RAPD-PCR an ORT-Isolaten .....	64
4.3	Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen .....	65
4.3.1	Vorausgehende Untersuchung .....	65
4.3.2	Embryonale Mortalität .....	66
4.3.3	Bewertung der Pathogenität innerhalb der Serotypengruppen .....	67
4.3.3.1	Serotypgruppe A.....	68
4.3.3.2	Serotypgruppe B.....	69
4.3.3.3	Serotypgruppe C.....	71
4.3.3.4	Serotypgruppen D, E, I und J.....	72
4.3.3.5	Sonstige Serotypgruppen bzw. Kreuzreagenten .....	73
4.3.4	Auswertung.....	75
4.3.5	Keimzahlbestimmung.....	75
4.3.6	Bakteriologische Untersuchung.....	76
4.4	Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) .....	77
4.4.1	Vorausgehende Untersuchung .....	77
4.4.2	Mikrobouillondilutionsmethode .....	78
4.4.2.1	Empfindlichkeitstestung der Isolate deutscher Herkunft .....	78
4.4.2.2	Empfindlichkeitstestung der Isolate französischer Herkunft.....	79
4.4.2.3	Vergleich der Empfindlichkeit der deutschen und französischen Isolate.....	81
4.4.3	Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit .....	81

5	Diskussion .....	83
5.1	Erregercharakterisierung und Typisierung .....	83
5.2	Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting .....	85
5.3	Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen .....	89
5.4	Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) .....	91
6	Zusammenfassung .....	96
7	Summary .....	98
8	Literatur .....	100
9	Anhang .....	113

## **Abkürzungen**

Abb.	Abbildung(en)
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AGP	Agargelpräzipitationstest
APV	aviäres Pneumovirus
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute; frühere Bezeichnung: NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag(e)
DIA	Dotimmunobinding-Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
g	Gramm
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
h	Stunde
IBV	Infektiöses-Bronchitis-Virus
IFT	Immunfluoreszenztest
KBE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
kbp	Kilobasenpaare
LPS	Lipopolysaccharid(e)
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MHK	minimale Hemmstoffkonzentration
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
MRA	Makrorestriktionsanalyse
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm



## Abkürzungsverzeichnis

---

µl	Mikroliter
NDV	Newcastle-Disease-Virus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OMP	äußere(s) Membranprotein(e) (outer membrane protein)
ORT	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase-Färbung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	nach der Infektion (post infectionem)
pmol	pikomol
ppm	Teile einer Million (parts per million)
RAPD	random amplified polymorphic DNA (zufällig vervielfältigte polymorphe DNA)
RAT	Schnellagglutinationstest (rapid agglutination test)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Rep-PCR	repetitive extragenic palindromic-PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SAT	Serumagglutinationstest
SDS-PAGE	Natriumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunden
SPAT	Serumplattenagglutinationstest (serum plate agglutination test)
SPF	spezifisch pathogenfrei
<i>Staph. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TRT	Turkey Rhinotracheitis

# 1 Einleitung

Atemwegserkrankungen gehören neben Magen-Darm-Erkrankungen zu dem am häufigsten auftretenden Krankheitskomplex in der Geflügelhaltung. Unabhängig von dem auslösenden Agens werden dadurch wirtschaftliche Schäden in Form von erhöhter Mortalität, erhöhten Medikamentenkosten, erhöhten Verwurfsraten etc. verursacht. Besonders in Gebieten mit einer hohen Dichte an Tieren besteht eine größere Gefahr der Verbreitung von spezifischen und unspezifischen endemisch verlaufenden Infektionskrankheiten (Anonymus, 2005). Zur Behandlung von Ausbrüchen bakteriell bedingter Krankheiten werden aus wirtschaftlichen und tierschutzrechtlichen Gründen meist antimikrobiell wirksame Substanzen eingesetzt.

Angesichts der zunehmenden Bedeutung der Resistenzproblematik in der Human- sowie Veterinärmedizin werden immer häufiger Monitoringprogramme hinsichtlich der Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber Antibiotika im Nutztierbereich vom Verbraucher eingefordert. Hinsichtlich der Zoonoseerreger *E. coli*, *Salmonella* und *Campylobacter* wurde eine Vielzahl von Daten bezüglich ihres Vorkommens, der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiell wirksamen Stoffen sowie von Resistenzdeterminanten, die auf humanpathogene Bakterien übertragbar sind, erstellt (Anonymus, 2003a). Ob es sich beim Atemwegserreger *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) um eine potenzielle Gefahr für den Menschen handelt, ist bisher nicht nachgewiesen. Ebenfalls bisher nicht untersucht ist die Tatsache, ob ORT ebenfalls Resistenzgene auf humanpathogene Bakterien übertragen kann. Sicherlich sollte jedoch auch dieses besonders für Puten und Hühner pathogene Bakterium, das sehr schnell Resistenzen entwickelt, sowohl hinsichtlich seiner Resistenzentwicklung als auch seiner Pathogenität für seine Wirte häufiger überwacht werden.

Daraus ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Ziele und Untersuchungspunkte:

- Zur Erlangung eines Überblicks über die Resistenzsituation aktueller ORT-Isolate wird die Empfindlichkeit deutscher und französischer Isolate gegen antimikrobiell wirksame Stoffe unter Anwendung der Mikrobouillondilutionsmethode mit den erforderlichen Optimierungen bestimmt (Teil 4). Dies setzt jedoch eine vorhergehende Identifizierung von ORT, die eine Charakterisierung und Typisierung beinhaltet, voraus (Teil 1).
- Eine Untersuchung zur Feststellung der Eignung der Fingerprinting-Methode zur Typisierung von ORT-Isolaten (Teil 2).
- Des Weiteren wird die Fähigkeit zur Embryoletalität deutscher ORT-Isolate am Infektionsmodell „bebrütetes Hühnerei“ zur Abschätzung der Pathogenität untersucht (Teil 3).

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Bedeutung**

Bei ORT handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, das weltweit in den Geflügelbetrieben verbreitet ist und als weiteres verursachendes Agens von Atemwegserkrankungen verantwortlich gemacht wurde.

Im Allgemeinen verursachen Atemwegserkrankungen beim Geflügel schwere ökonomische Verluste durch erhöhte Mortalität, erhöhte Medikamentenkosten, erhöhte Verwurfsraten bei der Schlachtung, eine Verminderung der Eischalenqualität und der Schlupfrate (Hafez, 1994; Hafez, 1996). Des Weiteren wurde im Zusammenhang mit einer ORT-Infektion bei Legehennen von einem Rückgang der Eiproduktion um mehr als 15%, der über eine Periode von 22 Tagen andauern kann, berichtet (El-Gohary *et al.*, 1998; Sprenger *et al.*, 2000b; Refai *et al.*, 2005). Bei Broilerherden, in denen Antikörper gegen ORT nachgewiesen wurden, lag das durchschnittliche Körpergewicht deutlich unter dem der negativ getesteten Broilerherden (Canal *et al.*, 2003).

Die weltweite Verbreitung von ORT in Geflügelpopulationen in Europa, Amerika, Afrika und Asien wurden entweder über die Isolierung des Erregers oder mittels Nachweis von Antikörpern gegen ORT bestätigt.

Die gegenwärtige Inzidenz einer ORT-Infektion bei Puten in Deutschland korreliert mit der Anzahl der Puten in einem Gebiet. In Regionen mit einer sehr hohen Putendichte wird ORT unter jahreszeitlichen Schwankungen in regelmäßigen Abständen isoliert. Dagegen wird das Bakterium in Gebieten mit einer geringeren Putendichte im Vergleich zu anderen geflügelpathogenen Erregern seltener isoliert (T. Uchtmann, 2008, persönliche Mitteilung; Dr. R. Günther, 2008, persönliche Mitteilung).

### **2.2 Ätiologie**

#### **2.2.1 Morphologische und kulturelle Eigenschaften**

Bei ORT handelt es sich um ein gramnegatives Stäbchenbakterium, das in die rRNA-Superfamilie V eingeordnet wurde und eine enge Verwandtschaft zu den geflügelpathogenen Erregern *Riemerella anatipestifer* und *Coenia anatina* aufweist (Vandamme *et al.*, 1999).

Es ist unbeweglich, nicht sporulierend und weist einen chemoorganotrophen mesophilen Metabolismus auf. Die Größe des Bakteriums ist variabel und reicht von 0,2 bis 0,9 µm Breite und 1 bis 3 µm Länge (Vandamme *et al.*, 1994). Auffallend ist die ausgeprägte Pleomorphie (Charlton *et al.*, 1993; Hafez *et al.*, 1993).

ORT wächst auf Blut-, Schokoladen- und Tryptose Soy Agar. Auf McConkey Agar, Gassner-, Endo- und Drigalski-Agar sowie Simmons-Citrate-Medium lässt sich dagegen kein

Wachstum beobachten (Hafez, 1994; Hinz *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1994). Unter Verwendung von Flüssigmedien wie Peptonwasser, Pasteurellabouillon, Todd-Hewitt-Bouillon und Hirn-Herz-Bouillon wächst ORT nur in geringem Maße (Hafez *et al.*, 1993) und weist dabei eine größere Pleomorphie auf als bei Wachstum auf einem Festmedium (van Empel und Hafez, 1999).

Ein optimales Wachstum von ORT erfolgt auf 5-10%igem Schafblut-Agar bei einer Temperatur von 37 °C in einer mikroaerophilen Umgebung unter 5-10% CO<sub>2</sub>-Spannung. Auch unter aeroben Bedingungen bzw. einem Temperaturbereich von 30-42 °C wurde Wachstum beobachtet (Charlton *et al.*, 1993).

Die dem Geruch nach Buttersäure ähnelnden (Vandamme *et al.*, 1994) Kolonien von ORT stellen sich auf Blut-Agar als rund, konvex, opaque und nicht hämolysierend dar (Charlton *et al.*, 1993; Hafez *et al.*, 1993). Die Größe der Kolonien variiert von ca. 1 mm bis 3 mm im Durchmesser (Vandamme *et al.*, 1994; Post *et al.*, 1999). Kolonien einiger taiwanesischer Isolate von Tauben und Hühnern zeigten in ihrer Größe erhebliche Unterschiede zu einem Referenzstamm. Nach 48stündiger Inkubation wiesen die größeren Kolonien Durchmesser von 1,5-2 mm auf. Der Durchmesser der kleineren Kolonien betrug dagegen 0,3-0,5 mm (Tsai und Huang, 2006).

Untersuchungen zur Fähigkeit der Hämagglutination von ORT-Isolaten wurden von Fitzgerald *et al.* (1998), Soriano *et al.* (2002), Chansiripornchai (2004), Tsai und Huang (2006) und Vega *et al.* (2008) durchgeführt. Gegenüber Erythrozyten verschiedener Vogel- und Säugetierspezies traten innerhalb der neun verwendeten ORT-Referenzstämme Unterschiede in den hämagglutinierenden Eigenschaften auf. Allen gemeinsam war die Agglutination von Kaninchenerythrozyten (Vega *et al.*, 2008). Fitzgerald *et al.* (1998) vermuteten sogar einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Agglutination und der Antibiotikaempfindlichkeit von ORT-Isolaten. Tsai und Huang (2006) mutmaßten einen Zusammenhang zwischen der Koloniegröße bzw. dem Ursprung des Isolates und dem Auftreten der Hämagglutination. Bei allen Taubenisolaten wurde keine Hämagglutination sowie kleine Kolonien beobachtet. Dagegen wies die Vielzahl der hämagglutinierenden Hühnerisolate größere Kolonien auf. Des Weiteren konnte Chansiripornchai (2004) beobachten, dass bei einem ORT-Isolat Hämagglutination nur auftrat, wenn es auf Festmedium wuchs. Fand das Wachstum im Flüssigmedium statt, so verlor dieses Isolat die Fähigkeit zur Hämagglutination, zeigte stattdessen aber ein starkes Adhäsionsverhalten gegenüber Epithelzellen. Basierend auf den Untersuchungsergebnissen könnte die Hämagglutination für die Identifikation und Charakterisierung von ORT-Isolaten herangezogen werden (Soriano *et al.*, 2002) bzw. eine alternative Methode der Serotypisierung darstellen (Fitzgerald *et al.*, 1998).

Das Vorhandensein von Strukturen wie Pili oder Fimbrien wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht belegt (Leroy-Setrin *et al.*, 1998), ebenso wurden keine toxische Aktivitäten von ORT in Untersuchungen beobachtet (van Empel und Hafez, 1999; Chansiripornchai, 2004). Jansen *et al.* (2004) entdeckten in zwei Stämmen des Serotyps K ein als pOR1 bezeichnetes Plasmid, auf dem sich mindestens drei Gene befinden, die für mögliche Virulenzfaktoren kodieren.

### 2.2.2 Serologische Typisierung

Eine Differenzierung von ORT-Isolaten in verschiedene Serotypen gelang mit dem Agargelpräzipitationstest (AGP), dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) und der Schnellagglutination, wobei der AGP-Test jedoch als bevorzugte Methode der Serotypisierung angesehen wird (van Empel *et al.*, 1997; Hafez und Sting, 1999).

Bis zum heutigen Zeitpunkt können mittels AGP-Test unter Verwendung monovalenter Antisera und hitzestabilem Antigen 18 Serotypen (A-R) differenziert werden (van Empel, persönliche Mitteilung). Beobachtete Kreuzreaktionen traten zwischen verschiedenen Serotypen auf (Hafez, 1996; van Empel *et al.*, 1997; van Empel, 1998a).

Verschiedene Arten der Antigenaufbereitung beschrieben Hafez und Sting (1999). Hierbei wurden die extrahierten Antigene (hitzestabile, Proteinase-K-stabile und mittels Natriumdodecyl-Sulfat [SDS] aufbereitete Antigene) auf ihre Fähigkeit zur Typisierung im AGP-Test und ELISA verglichen. Hitzestabile und Proteinase-K-stabile Antigene erzeugten im AGP spezifische Reaktionen für die Serotypen A, C, D, E und G. Zwischen den Serotypen B, A und E traten Kreuzreaktionen auf. Die mit SDS extrahierten Antigene erzeugten im AGP gegenüber allen getesteten Antisera, außer C, Kreuzreaktionen und erwiesen sich als wenig geeignet für die Serotypisierung.

Dabei basiert die Serotyp-Klassifizierung nach den Erkenntnissen von Chansiripornchai (2004) nicht auf den Unterschieden in den Lipopolysacchariden (LPS), da das Profil der Natriumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der LPS bei zwei Stämmen des gleichen Serotyps (Serotyp D) verschiedenartig ausfiel. Welcher Bestandteil des Bakteriums stattdessen für die Einteilung in Serotypklassen verantwortlich gemacht werden kann, bleibt unbeantwortet.

Der Serotyp A weist unter den Hühner- und Putenisolaten weltweit die höchste Prävalenz auf. So typisierten van Empel *et al.* (1997) und Popp (2003) in ihren Untersuchungen 95% bzw. 87,5% der Hühnerisolate als Serotyp A. Aus Thailand stammende Ergebnisse der Serotypisierung von Taubenisolaten und Hühnerisolaten gestalteten sich ähnlich: alle 12 Taubenisolate und 85,7% der Hühnerisolate ließen sich mittels AGP ebenfalls dem Serotyp A zuordnen (Tsai und Huang, 2006). Dagegen stellt sich die Verteilung der Puten-Isolate

unter den Serotypen heterogener dar als die der Hühner-Isolate, wobei der Serotyp A jedoch am häufigsten isoliert wird (van Empel *et al.*, 1997).

Van Empel *et al.* (1997) stellten eine Beziehung zwischen der geographischen Herkunft der Isolate und dem Serotyp her. So konnten Hühnerisolate des Serotyps C in Südafrika und den USA, des Serotyps E in Frankreich und den Niederlanden, der Serotypen G, J und K jeweils in Frankreich, Niederlanden und den USA festgestellt werden. Putenstämme der Serotypen C und I wurden nur in den USA, der Serotypen F und G in den Niederlanden und des Serotyps K nur in England gefunden (van Empel, 1998a). ORT-Isolate der Serotypen A, C und I dominieren in der Putenpopulation der Mittleren Bundesstaaten in den USA (Nagaraja, unveröffentlichte Daten).

Innerhalb der Putenpopulation Deutschlands dominieren die Serotypen A und B (Hafez und Sting, 1999; Popp, 2003; Behr, 2007), in der Hühnerpopulation ist der Serotyp A am häufigsten vertreten (Hafez und Sting, 1999; Popp, 2003).

Mit dem von Hung und Alvarado (2001) beschriebenen Immunoperoxidase-Assay als weitere Möglichkeit der Typisierung von ORT-Isolaten wurde das gleiche Ergebnis wie mit dem AGP-Test erzielt. Alle untersuchten Isolate aus Peru wurden dem Serotyp A zugeordnet.

Auf molekularer Ebene gelang es Hafez und Beyer (1997) mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR)-Fingerprinting und dem Einsatz der Primer M13 und ERIC 1R, Unterschiede zwischen den meisten getesteten Serotypen nachzuweisen, jedoch nicht zwischen A und B. Thachil *et al.* (2007) war es nicht möglich, mit den Primern M 13 bzw. ERIC 1R alle getesteten Serotypen (A, C, D, E, F, I, J und K) zu differenzieren. Unterschiedliche Fingerprinting-Muster unter Verwendung des Primers M 13 ergaben sich für die Standardstämme C, D, E, I, J und K; dagegen konnten die Serotypen A und F nicht unterschieden werden. Die ERIC 1R-Technik ergab sogar nur 5 verschiedene Muster für die 8 Standardstämme. In der anschließenden Untersuchung von Feldisolaten der Serotypen A, C und I mittels M 13-PCR wurde festgestellt, dass die Vielzahl der Isolate des Serotyps A das Muster des Standardstammes A, alle Isolate des Serotyps I das Muster des Standards I und von 11 Isolaten des Serotyps C nur eines das Muster des Standards C aufwiesen. Insgesamt erwies sich die M 13-PCR zur Differenzierung von ORT-Isolaten geeigneter als die ERIC 1R-PCR.

### 2.2.3 Genetische Diversität

Verschiedene molekulare Untersuchungsmethoden an ORT-Isolaten führten zu der Vermutung, dass zwischen den ORT-Stämmen eine enge, genetische Verwandtschaft existiert. Amonsin *et al.* (1997) teilten mittels „multilocus-enzyme-electrophoresis“ (MLEE) 55 Isolate in sechs elektrophoretische Typen ein. Die Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens

unter den Isolaten der verschiedenen elektrophoretischen Typen ergab einen Anteil von mehr als 99% identischer Nukleotide. Tsai und Huang (2006) ermittelten in ihrer Sequenzanalyse von 31 amplifizierten Fragmenten des 16S rRNA-Gens einen Anteil zwischen 98% und 100% identischer Nukleotide. Die Sequenzen konnten in drei Cluster eingeteilt werden: alle Taubenisolate konnten dem Cluster III, die Hühnerisolate den Clustern I oder II zugeordnet werden.

Das von Popp und Hafez (2003) durchgeführte DNA-Fingerprinting mittels Makrorestriktionsanalyse (MRA) und anschließender Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) von 119 ORT-Isolaten ergab 2 klonale Gruppen (Cluster I und II). Cluster I wurde in 3 Subcluster (IA, IB, IC) aufgeteilt, wobei sich Subcluster IA nochmals in drei Gruppen in (IAa, IAb, IAc) und Subcluster IB sich in zwei Gruppen (IBa, IBb) aufgliedern ließ. Die Gruppe IAc beinhaltete 5 weitere Subgruppen. Insgesamt ergab die Clusteranalyse des Stammkollektivs eine genetische Ähnlichkeit von 41%, woraus sich eine genomische Heterogenität der Spezies ableiten ließ. Die genetische Distanz zwischen den Standardstämmen verschiedener Serotypen stellte sich als gering dar; die Autoren vermuteten, dass es sich hierbei teilweise um genetisch nah verwandte Stämme handelt. Ein Zusammenhang zwischen der MRA und der Tierart konnte nicht abgeleitet werden, da Isolate von Hühnern und Puten in mehreren Gruppen zu finden waren und keine erkennbaren Subpopulationen bildeten.

Die von Amonsin *et al.* (1997) mittels Rep-PCR (repetitive extragenic palindromic PCR) aufgestellten Profile von ORT-Isolaten von *Passeriformes* waren von den Profilen der *Galliformes* verschieden, was zu der Vermutung des Auftretens von Wirtsspezifität unter den Klonen führte. Darüber hinaus existiert eine geographische Komponente in der von den Autoren vermuteten klonalen Populationsstruktur. Koga und Zavaleta (2005) konnten in ihrer Untersuchung mittels Rep-PCR ähnliche genetische Muster, aber keine Unterschiede zwischen der Vogelspezies bzw. der Nutzungsrichtung und der geographischen Herkunft erkennen.

Auf die Existenz genetischer Unterschiede unter den Isolaten des gleichen Serotyps schlossen Thachil *et al.* (2007) aufgrund der Untersuchungsergebnisse aus der Rep-PCR mit der Primerkombination ERIC 1R und ERIC 2 sowie der RAPD (random amplified polymorphic DNA) mit dem Universalprimer M 13. Leroy-Setrin *et al.* (1998) konnten mit der RAPD und unter Verwendung des Primers OPG11 die meisten Genotypen identifizieren und betrachten diese Technik als geeignete Methode zur Charakterisierung und Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen bezüglich ORT. Im Gegensatz zur Ribotypisierungsmethode (Leroy-Setrin *et al.*, 1998) zeigte die AFLP (amplified fragment length polymorphism)-Methode die Fähigkeit, zwischen Stämmen zu differenzieren und ermöglichte

somit die Einteilung der Spezies ORT in mindestens 5 Subgruppen oder die Unterteilung der Spezies ORT in drei Spezies (van Empel, 1998b).

#### 2.2.4 Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

Die Studien zur Empfindlichkeitstestung (Tabelle 1) von ORT-Isolaten gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen wurden unter Anwendung der Agardiffusion bzw. der Dilutionsmethode (Agar-, Mikro- und Makrodilution) bestimmt.

Die natürliche Sensitivität gegenüber Antibiotika untersuchten Devriese *et al.* (1995). Neben Stämmen aus Hühnervögeln, die als Nutztiere gehalten worden waren, wurden Stämme von Wildvögeln (Krähen) mit der Agardilutionsmethode untersucht. Die Wildstämme repräsentierten mit geringen minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werte) gegenüber den Penicillinen, Cephalosporinen, Fluochinolonen und Tetracyclinen die natürlichen Sensitivitätsniveaus von ORT. Aus den Ergebnissen der Hühnervogel-Stämme wurde geschlossen, dass ORT in hohem Maße erworbene Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen aufweist. Nach van Empel und Hafez (1999) schwankt die Empfindlichkeit von ORT gegenüber Antibiotika sehr und scheint von dem Ursprung des Isolates (Land, Spezies) abhängig zu sein.

Gegenüber den für eine Behandlung häufig eingesetzten Wirkstoffen Ampicillin oder Amoxicillin zeigte sich ORT in den meisten Untersuchungen als empfindlich (Hafez, 1994; Roger und Leorat, 1997; El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary *et al.*, 1998; Hafez und Friedrich, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; van Veen *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2003; Popp, 2003; Tsai und Huang, 2006; Bostvironnois und Zadjan, 2008). Jedoch wurden für Isolate aus den Niederlanden, Deutschland, Belgien, Türkei und Jordanien auch Resistenzen bzw. eine rückläufige Empfindlichkeit diesen Wirkstoffen gegenüber festgestellt (Devriese *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2001; El-Sukhon *et al.*, 2002; Misirlioglu *et al.*, 2006; Behr, 2007).

Die getesteten Tetracycline (vornehmlich Tetracyclin und Oxytetracyclin) wurden von vielen Autoren als wirksam gegen ORT bewertet (Van Beek *et al.*, 1994; Odor *et al.*, 1997; Roger und Leorat, 1997; Hafez und Friedrich, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; El-Sukhon *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2003; Misirlioglu *et al.*, 2006; Tsai und Huang, 2006). Variable Empfindlichkeiten von ORT beobachteten Varga *et al.* (2001) und De Rosa *et al.* (1996) bezüglich Oxytetracyclin bzw. Tetracyclin, wohingegen eine abnehmende Empfindlichkeit für deutsche Isolate von Behr (2007) und für Isolate aus Minnesota von Malik *et al.* (2003) festgestellt wurden. Die Ergebnisse der Studie von Popp (2003) lassen ebenfalls eine geringe Empfindlichkeit von ORT diesem Wirkstoff gegenüber vermuten.

Die Angaben zur Wirksamkeit von Penicillin G in der verfügbaren Literatur reichen von resistent (Malik *et al.*, 2003), variabel (van Veen *et al.*, 2001) bis hin zu empfindlich



(Nagaraja *et al.*, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2001; Popp, 2003; Tsai und Huang, 2006).

Ein sehr häufiges Ergebnis waren Resistenzen gegenüber den Aminoglykosiden Gentamicin, Kanamycin, Spektinomycin, Neomycin (Hafez, 1994; Devriese *et al.*, 1995; De Rosa *et al.*, 1996; Roger und Leorat, 1997; Salem *et al.*, 1997; El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary *et al.*, 1998; Hafez und Friedrich, 1998; Joubert *et al.*, 1999; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; van Veen *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2003; Popp, 2003; Soriano *et al.*, 2003; Misirlioglu *et al.*, 2006). Bezüglich Spektinomycin und Neomycin wurde auch von Empfindlichkeiten berichtet (Nagaraja *et al.*, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000).

Für die Gyrasehemmer Enrofloxacin, Flumequine, Nalixidinsäure und Sarafloxacin existieren unterschiedliche Sensitivitäten. So wurden für französische (Roger und Leorat, 1997), amerikanische (Odor *et al.*, 1997) und ein kanadisches (Joubert *et al.*, 1999) Isolat(e) hohe Empfindlichkeiten bestimmt, wohingegen sich ein österreichisches (Hafez und Friedrich, 1998), slowenische (Zorman-Rojs *et al.*, 2000), ägyptische (El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary *et al.*, 1998) sowie deutsche (Hafez *et al.*, 1993; Popp, 2003; Behr, 2007) Isolat(e) als unempfindlich darstellten. Ebenso verlief die Behandlung mit einer Kombination aus Enrofloxacin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol erfolglos (Van Beek *et al.*, 1994); die *in vitro* Unempfindlichkeit verschiedener Sulfonamide in Kombination mit Trimethoprimen (potenzierte Sulfonamide) wurde in Untersuchungen von De Rosa *et al.* (1996), Odor *et al.* (1997), Hafez und Friedrich (1998), El-Sukhon *et al.* (2002), Popp (2003), Tsai und Huang (2006) und Bostvironnois und Zadjan (2008) ermittelt.

Auch für die häufig getesteten Makrolide Erythromycin, Tylosin und Tilmicosin stellt sich die Empfindlichkeit von ORT nicht einheitlich dar. Isolate aus Frankreich, USA, Österreich und Ungarn wiesen hohe Sensitivitäten auf (De Rosa *et al.*, 1996; Salem *et al.*, 1997; Hafez und Friedrich, 1998; Varga *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2003; Bostvironnois und Zadjan, 2008). Eine Behandlung von Broilern in der Türkei mit Erythromycin für 5 Tage über das Trinkwasser reduzierte zumindest die Mortalität (Misirlioglu *et al.*, 2006). Dagegen beurteilten El-Gohary *et al.* (1998), El-Sukhon *et al.* (2002), Tsai und Huang (2006), van Veen *et al.* (2001) und Popp (2003) Vertreter dieser Wirkstoffgruppe als unwirksam. Berichte über die *in vitro* Wirksamkeit von Lincosamiden wie Lincomycin und Clindamycin (Odor *et al.*, 1997; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; Malik *et al.*, 2003) stehen Darstellungen der Unwirksamkeit gegenüber (Devriese *et al.*, 2001; Popp, 2003; Tsai und Huang, 2006). Das Polypeptid-Antibiotikum Bacitracin erwies sich im Gegensatz zu anderen Polypeptid-Antibiotika wie Colistin und Polymyxin B als effektiv in der Hemmung des Wachstums von ORT (Odor *et al.*, 1997; Roger und Leorat, 1997; Hafez und Friedrich, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2001; El-Sukhon *et al.*, 2002).

Der seltener getestete Wirkstoff Tiamulin erwies sich *in vitro* als wirksam gegen ORT. Die von Popp (2003) untersuchten deutschen Putenisolate wiesen größtenteils einen MHK-Wert von 0,5 µg/ml auf, sodass ORT als empfindlich gegenüber diesem Antibiotika eingestuft wurde. Ebenso kamen Devriese *et al.* (2001) und Varga *et al.* (2001) aufgrund ihrer Ergebnisse zu diesem Schluss. In der Untersuchung von Leorat und Mogenet (1998) erwiesen sich 99% der französischen Isolate als sensibel.

Tabelle 1: Übersicht über wichtige Arbeiten zur Empfindlichkeit von ORT gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

Herkunft der Isolate		Methode der Empfindlichkeitsprüfung	Referenz
Land	Spezies/ Nutzungsrichtung		
Ägypten	Broiler	Agardiffusion	El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary <i>et al.</i> , 1998
	Legehennen	Agardiffusion	
Belgien	Pute, Hühner, Rebhuhn, Perlhuhn, Krähe	Agardilution	Devriese <i>et al.</i> , 1995  Devriese <i>et al.</i> , 2001
	Broiler	Agardilution	
Deutschland	Puten	Agardiffusion	Hafez, 1994; Popp, 2003; Behr, 2007; Popp, 2003
	Puten	Mikrodilution	
Frankreich	Puten	Agardiffusion	Dudouyt <i>et al.</i> , 1995; Roger und Leorat, 1997
Israel	Puten	Agardiffusion	Bock <i>et al.</i> , 1998
Jordanien	Broiler	Agardiffusion	El-Sukhon <i>et al.</i> , 2002
Kanada	Puten	Agardiffusion	Joubert <i>et al.</i> , 1999
Mexiko	Huhn	Mikrodilution	Soriano <i>et al.</i> , 2003
Niederlande	Pute	Agardiffusion	Van Beek <i>et al.</i> , 1994; van Veen <i>et al.</i> , 2001
	Broiler	Agardilution, Agardiffusion	
Österreich	Puten	Agardiffusion	Hafez und Friedrich, 1998
Slowenien	Puten	Agardiffusion	Zorman-Rojs <i>et al.</i> , 2000
Südafrika	keine Angaben	Mikrodilution	Fitzgerald <i>et al.</i> , 1998
Taiwan	Huhn, Taube	Agardiffusion	Tsai und Huang, 2006
Ungarn	Huhn, Pute	Makrodilution	Varga <i>et al.</i> , 2001
USA	Puten	Agardiffusion	De Rosa <i>et al.</i> , 1996; Salem <i>et al.</i> , 1997; Nagaraja <i>et al.</i> , 1998; Malik <i>et al.</i> , 2003
	Broiler	unbekannt	
	Puten	Agardiffusion	

### 2.2.5 Tenazität

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Tenazität von ORT lassen darauf schließen, dass eine Bekämpfung des Bakteriums mit relativ einfachen Mitteln zu erreichen ist. Auf organischen Säuren oder Aldehyden basierende Desinfektionsmittel erzielten in niedrigsten Konzentrationen (0,5%) in 15 Minuten Einwirkzeit eine komplette Inaktivität von ORT (Hafez und Schulze, 2003). Formalin in einer 3%igen Lösung führte ebenso zur vollständigen Inaktivierung des Erregers.

Die Überlebenszeit von ORT scheint temperaturabhängig zu sein (Varga *et al.*, 2001). Auf Bruteiern, die bei 37 °C aufbewahrt wurden, war der Erreger weniger als 24 Stunden und bei Raumtemperatur weniger als 3 Tage lang lebensfähig. Auf den Bruteiern, die im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt wurden, konnte ORT bis zu 11 Tage nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten Lopes *et al.* (2002c), die die Überlebensfähigkeit von ORT in der Einstreu mittels Reisolierungsversuche untersuchten. Hierbei zeigte sich die Überlebenszeit umgekehrt proportional zur Umgebungstemperatur: bei höheren Temperaturen von 22 °C, 37 °C und 42 °C konnte ORT 6, 1 bzw. keinen Tag überleben. Dagegen blieb ORT bei niedrigen Temperaturen von 4 °C 40 Tage und bei -12 °C sogar 150 Tage lebensfähig.

## 2.3 Epizootiologie

### 2.3.1 Wirtsspektrum

ORT wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt bei einer Vielzahl von Vogelspezies nachgewiesen. So fand sich das Bakterium bei Hühnern, Puten, Enten, Gänsen, Straußen, Fasanen, Tauben, Krähen, Möwen, Perl- und Rebhühnern sowie Wachteln (Charlton *et al.*, 1993; Hafez *et al.*, 1993; Vandamme *et al.*, 1994; Anonymus, 1995; Devriese *et al.*, 1995; van Empel *et al.*, 1997; van Empel und Hafez, 1999). Die häufigsten Isolierungen und indirekten Nachweise anhand der Antikörper stammen der Literatur zufolge jedoch aus Hühner- und Putenbeständen.

Aufgrund genetischer Unterschiede zwischen Stämmen, die *Passeriformes* (z.B. Krähen) bzw. *Galliformes* (Hühner, Puten, Perlhühner) infizieren, vermuteten Amonsin *et al.* (1997) eine Wirtsspezifität von ORT. Dagegen vertraten van Empel *et al.* (1996) die Auffassung, dass eine Wirtsspezifität nicht existiert, da Isolate, die aus verschiedenen Vogelspezies stammten und verschiedenen Serotypen angehörten, gleichermaßen für Hühner als auch für Puten pathogen waren. Chansiripornchai (2004) bezweifelte aufgrund der Adhäsion an humanen Epithelzellen sowie der Infektion von Mäusemakrophagen durch ORT ebenfalls die Wirtsspezifität für Vogelspezies. Die Besiedlung von Nicht-Vogel-Spezies (z.B. Säugetiere) durch ORT wäre dem Autor nach denkbar, allerdings fehlt bis zum jetzigen Zeitpunkt die

Bestätigung dieser Vermutung, da pathologische Veränderungen fehlten und/oder die Isolierung des Keims aus Nicht-Vogel-Spezies nicht gelang.

### 2.3.2 Übertragung

Die von Hafez (1997) vermutete aerogene Übertragung und Verbreitung von ORT durch direkten und indirekten Kontakt mit infizierten Tieren konnte mit den Ergebnissen aus experimentellen Infektionen belegt werden: intranasale, intratracheale und als Aerosol verabreichte ORT-Suspensionen verursachten eine Infektion (Sprenger *et al.*, 1998; van Empel und van den Bosch, 1998; Back *et al.*, 1998b).

Neben dem horizontalen Übertragungsweg vermuteten Tanyi *et al.* (1995) die Möglichkeit der vertikalen Übertragung des Erregers. Eine erste Bestätigung gelang mit der Isolierung von ORT aus den Ovarien und den Eileitern experimentell infizierter Putenlegehennen (Back *et al.*, 1997; Back *et al.*, 1998b), später spekulierten van Veen *et al.* (2004) aufgrund ihrer Ergebnisse auf die vertikale Übertragung von ORT auf die Nachkommen von Putenelterntieren. Der Erreger konnte des Weiteren aus den Dottersäcken von Eintagsküken und von der Eioberfläche (van Empel, 1998b), aus unbefruchteten Eiern, Hühner- und Putenembryonen sowie aus Eintagsküken (El-Gohary, 1998) isoliert werden. Von serologisch positiven Elternherden mit bekannter ORT-Problematik abstammende Broiler- und Putenküken wurden nach dem Schlupf in isolierten Ställen gehalten. Nach viralem Priming mit einem lentogenen Newcastle-Disease-Virus (NDV) -Stamm (Broiler) bzw. Turkey Rhinotracheitis (TRT)-Virus (Puten) war es möglich, ORT aus den entzündeten Luftsäcken zu kultivieren. Es blieb jedoch ungeklärt, ob es sich dabei um eine primär transovariable Übertragung oder eine sekundäre kloakale Kontamination handelte (van Empel, 1998a; van Empel, 1998b).

Im Zusammenhang mit einer Feldinfektion gelangen Sprenger *et al.* (2000b) die Anzucht von ORT aus Trachealtupfern einer vier Wochen alten Hähnchenherde und ließ die Autoren die vertikale Übertragung von ORT vermuten.

Varga *et al.* (2001) vertreten die Meinung, dass ORT nicht über Bruteier übertragen wird. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37 °C konnte der Erreger auf der Eischale nicht mehr nachgewiesen werden und die Isolierung lebender Bakterien aus Bruteiern war nur bis zum 14. Tag nach Inokulation möglich.

### 2.3.3 Pathogenität und Synergien anderer Krankheitserreger

Eine Vielzahl von experimentellen Infektionen mit unterschiedlichen Infektionsrouten an Hühnern als auch Puten wurde zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei ORT um ein primär oder sekundär pathogenes Agens handelt, durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen fielen unterschiedlich aus.

Mit einer alleinigen ORT-Infektion konnten bei Puten und Hühnern neben den allgemeinen Anzeichen einer Erkrankung vor allem Wachstumsdepression, respiratorische Symptome in verschiedenen Ausprägungen, Arthritis oder eine deutliche Reduktion der täglichen Gewichtszunahme reproduziert werden (Van Beek *et al.*, 1994; Ryll *et al.*, 1996; Travers *et al.*, 1996; van Empel *et al.*, 1996; El-Gohary und Awaad, 1998; Sprenger *et al.*, 1998; El-Sukhon *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2002; van Veen *et al.*, 2004). Aufgrund der klinischen Symptome und der pathologisch-anatomischen Veränderungen schlussfolgerten van Empel *et al.* (1996), dass ORT ein infektiöses Agens für Puten und Hühner darstellt. Oftmals zeigten sich jedoch keine klinischen Anzeichen einer Infektion und der Nachweis einer angegangenen ORT-Infektion ließ sich nur durch pathologische-anatomische, histologische oder bakteriologische Untersuchungen führen (van Empel *et al.*, 1996; Back *et al.*, 1997; Sprenger *et al.*, 1998).

Salem *et al.* (1997) kamen aufgrund ihrer Beobachtung im Feld und der Ergebnisse aus experimentellen Studien zu dem Schluss, dass es sich bei ORT um ein sekundär pathogenes Agens handelt, welches durch einen primär pathogenen Erreger initiiert wird. Experimentelle Infektionen mit ORT von Legehennen führten nicht zu der Ausbildung klinischer Symptome, die im Rahmen von Feldinfektionen beobachtet worden sind (El-Gohary *et al.*, 1998; Popp, 2003; Thachil *et al.*, 2007). ORT ist zwar fähig den Respirationstrakt zu besiedeln, aber unter Laborbedingungen nicht in der Lage, ohne ein virales Priming eine respiratorische Erkrankung hervorzurufen (Marien *et al.*, 2005).

Im Zusammenhang mit Feld- und experimentellen Infektionen zeigten sich durch die Beteiligung von *E. coli*, *Salmonella give* und *Bordetella avium* deutlicher ausgeprägte Läsionen und klinische Symptome als nach alleiniger ORT-Infektion (De Rosa *et al.*, 1997; El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000; El-Sukhon *et al.*, 2002). Darüber hinaus führte eine begleitende Infektion mit *Pasteurella haemolytica* bei Legehennen zu einem verstärkten Legeleistungsabfall (El-Gohary, 1998).

Im Bereich der Puten könnte das TRT-Virus durch seine immunsuppressive Wirkung (Timms *et al.*, 1986) das Entstehen einer ORT-Infektion begünstigen oder zu einer Verstärkung der ORT-Infektion führen (Hafez, 1998b). Zumindest wurde bei einer Koinfektion mit TRT/APV (aviäres Pneumovirus) eine längere Persistenz von ORT im Respirationstrakt beobachtet (Marien *et al.*, 2005). Einen additiven Effekt bzw. eine stärkere Ausprägung der ORT-Infektion wurde durch vorherige experimentelle Infizierung mit einem lentogenen NDV (LaSota) oder TRT/APV hervorgerufen (van Empel *et al.*, 1996; Back *et al.*, 1997; Marien *et al.*, 2005; Marien *et al.*, 2007) und im Rahmen einer Feldinfektion stellten Szalay *et al.* (2002) bei 2 bis 4 Wochen alten Mastputen, die als Eintagsküken mit einer attenuierten Lebendvakzine gegen TRT und NDV geimpft worden waren, eine Infektion mit ORT fest, die mit einer schweren respiratorischen Erkrankung und erhöhter Mortalität verbunden war.

Oftmals fungieren *Pasteurella haemolytica* und *E. coli* als Verstärker einer ORT-Infektion (El-Gohary und Awaad, 1998; El-Gohary *et al.*, 1998). Auch wurden schwerere Krankheitsverläufe unter vorheriger Infektion mit einem lentogenen ND-Virus oder mit dem Infektiöse-Bronchitits-Virus (IBV) bei Broilern festgestellt (Odor *et al.*, 1997; Salem *et al.*, 1997; Thachil *et al.*, 2007; van Veen *et al.*, 2000a; van Empel *et al.*, 1996; van Empel *et al.*, 1999). Der Grund, warum ORT-Infektionen oft nur in Kombination mit anderen viralen oder bakteriellen Infektionen vorgefunden werden, könnte in der eingeschränkten Fähigkeit von ORT liegen, die Schleimhautbarriere im Wirt zu durchbrechen. Die begleitenden Erreger bzw. die assoziierte Entzündungsreaktion rufen Zellschäden hervor, die die Penetration von ORT durch die Mukosa ermöglicht (Chansiripornchai, 2004).

Unterschiede in der Ausprägung der klinischen Symptome und pathologischen-anatomischen Veränderungen nach experimentellen Infektionen lassen Virulenzunterschiede zwischen den einzelnen getesteten Stämmen vermuten. Innerhalb verimpfter südafrikanischer Feldisolate kam es nach Infektion von Broilern zu unterschiedlichen Läsionsgraden der Arthritis und der Aerosacculitis (Travers *et al.*, 1996), die auch in der Studie von El-Sukhon *et al.* (2002) nach Infektion von Broilern mit ORT des Serotyps A festgestellt wurden. In einem früher durchgeführten Vergleich führten ein niederländischer und ein südafrikanischer ORT-Stamm zu schwereren pathologischen-anatomischen Veränderungen der Luftsäcke, Lungen und Trachea bei Broilern als der verwendete amerikanische Stamm (van Veen *et al.*, 2000a). Ryll *et al.* (1996) stellten bei der Erfassung der pathologischen-anatomischen Veränderungen nach der Infektion mit ORT auch bei Puten erhebliche Unterschiede in der Ausprägung der klinischen Symptome und Läsionen fest.

## 2.4 Krankheitsbild

### 2.4.1 Pathogenese

Die Mechanismen, über die ORT eine Krankheit hervorruft, sind größtenteils unbekannt. Die von van Empel *et al.* (1999) geäußerte Vermutung der Persistenz von ORT bzw. seinen Antigenen in den Vögeln basiert auf einem für 14 Wochen stabil bleibenden Antikörpertiter experimentell infizierter Tiere. Bei Vögeln mit natürlicher ORT-Exposition sinken diese Titer nach 3-10 Wochen (van Empel *et al.*, 1999; Hafez, 1996).

Pathologische Veränderungen infizierter Tiere und histologische Untersuchungen an Geweben lassen vermuten, dass das Bakterium vornehmlich den Respirationstrakt des Wirtes durch Adhäsion an die Schleimhaut des Wirtes besiedelt (Back *et al.*, 1998b; van Empel *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 2000b). Einer Exposition mit ORT folgte eine Infiltration des Luftsack-Epithels mit polymorphonukleären Granulozyten und Makrophagen (van Empel,

1998b). Aufgrund der vorwiegenden Assoziation von Bakterien oder Zellfragmenten mit Makrophagen (van Empel *et al.*, 1999) kann eine wichtige Rolle der Makrophagen in der Etablierung und Pathologie der Infektion vermutet werden (Chansiripornchai, 2004). In einer umfangreichen Testreihe untersuchte Chansiripornchai (2004) unter anderem die Fähigkeit von ORT zur Adhäsion und die Reaktion von Makrophagen auf eine Exposition mit ORT. Hierbei vermutete er die Existenz verschiedener und zelltypspezifischer Adhäsine bei ORT-Stämmen. Die Reaktion von Makrophagen auf bakterielle Pathogene resultiert oft in der Aktivierung der Wirtsabwehr mit der Produktion des Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase und damit der Bereitstellung des bakteriziden Moleküls Stickstoffmonoxid (NO) (Qureshi *et al.*, 1994; Karaca *et al.*, 1995). Nach Exposition der Makrophagen mit ORT wurde ein langsamer Anstieg von NO beobachtet. Lipopolysaccharide (LPS) als vermuteter Stimulus für die NO-Produktion stehen nicht zur Diskussion, da LPS von ORT zwar die intrinsische Fähigkeit der Stimulation besitzt, im Zusammenhang mit einem intakten Bakterium aber nicht biologisch aktiv ist (Chansiripornchai, 2004).

#### 2.4.2 Klinische Symptome und Verlauf

Die Schwere der klinischen Symptome, die Dauer der Erkrankung und die Mortalität einer ORT-Infektion sind sehr variabel. Negativ beeinflusst werden diese Parameter durch Faktoren wie schlechtes Management in Form von inadäquater Belüftung, hoher Besatzdichte, Stress, schlechter Einstreuqualität, mangelnder Hygiene, hoher Ammoniakkonzentrationen und das Auftreten sonstiger Krankheiten sowie die Art bakterieller Sekundärinfektionen (Tanyi *et al.*, 1995; De Rosa *et al.*, 1996; Hafez, 1996). Die Inkubationszeit bei Feldinfektionen kann bisher nur aus experimentellen Infektionsversuchen abgeleitet werden, so traten gemäß Sprenger *et al.* (1998) erste Symptome nach einer experimenteller Infektion von Puten 24 h post infectionem (p.i.) auf.

Ein ausgeprägter Verlauf einer ORT-Infektion konnte bei älteren, männlichen und schweren Tieren festgestellt werden (Hafez *et al.*, 1993; Clark, 1996; De Rosa *et al.*, 1996; Roepke *et al.*, 1998; Zorman-Rojs *et al.*, 2000). Weiterhin traten Symptome vorwiegend in Herbst- und Wintermonaten auf (Hafez, 1994; Hinz *et al.*, 1994; Salem *et al.*, 1997; Hafez und Friedrich, 1998; Roepke *et al.*, 1998; van Veen *et al.*, 2000b; Lopes *et al.*, 2002c; Bostvironnois und Zadjan, 2008).

Initiale Symptome einer ORT-Infektion sind Störungen des Allgemeinbefindens, gefolgt von Husten und Nasenausfluss, denen im weiteren Verlauf schwere respiratorische Störungen folgen, die sich bis zur Dyspnoe und Festliegen verstärken können (Hafez, 1994). Die Sterblichkeit liegt laut Chin und Charlton (1998) im Allgemeinen in einem Bereich zwischen 2-11%, wobei diese bei Mastputenhähnen größer zu sein scheint als bei den -hennen (Hafez *et al.*, 1993; Zorman-Rojs *et al.*, 2000). Bei schwerwiegenden Infektionen bei

Broilern kann die Mortalitätsrate aber auch zwischen 17% und 60% betragen (Tanyi *et al.*, 1995; Soriano *et al.*, 2002).

Bei Mastputen sowie Broilern treten neben den typischen respiratorischen Symptomen durch sinkende Futter- und Wasseraufnahme begründete Wachstumsdepressionen auf (Van Beek *et al.*, 1994; Tanyi *et al.*, 1995; Hafez, 1998c; van Veen *et al.*, 2000b; Soriano *et al.*, 2002; Szalay *et al.*, 2002). In einem experimentellen Infektionsversuch stellten sich die Tiere der Broilerlinie SPF Leghorns als weniger empfindlich dar als die der Linien Hybro Broiler und Ross Broiler (van Veen *et al.*, 2000a).

Als weitere Krankheitszeichen bei Puten wurden die Schwellung des Sinus infraorbitalis, Augenausfluss und Konjunktivitis sowie motorische Beschwerden, die sich in abnormaler Kopfhaltung oder im Festliegen äußerten, beobachtet (Van Beek *et al.*, 1994; Szalay *et al.*, 2002). Korbelt und Hafez (2001) berichteten weiterhin von akuten okulären Symptomen, die mit zunehmender Dauer in ein chronisches Stadium mit Uveitis, Hypopyon, Glaukomen und Katarakt führten.

Eine Verminderung der Eiproduktion sowie der Schlupf- und Befruchtungsrate, der Eigrößen und der Eischalenqualität wurde bei Mastelertieren beobachtet (De Rosa *et al.*, 1996; Hafez, 1998c; Joubert *et al.*, 1999; Refai *et al.*, 2005). Unterschiede in der Empfänglichkeit zwischen den Putenlinien British United Turkey, Hybrid oder Nicholas existieren nicht (Clark, 1996). In Bezug auf Legehennen berichteten El-Gohary *et al.* (1998), Sprenger *et al.* (2000b) und Soriano *et al.* (2002) von einem Legeleistungsabfall bis zu 15%.

#### 2.4.3 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei verendeten Puten äußern sich stets durch das Auftreten von Lungenödemen und ein- oder beidseitigen fibrinopurulenten Pneumonien. Ebenso häufig festzustellen sind Sinusitis, Tracheitis, fibrinöse Aerosacculitis, Peritonitis und katarrhalische Enteritis (Hafez *et al.*, 1993; Van Beek *et al.*, 1994; De Rosa *et al.*, 1996; Hafez und Friedrich, 1998; Roepke *et al.*, 1998; Sprenger *et al.*, 1998; Joubert *et al.*, 1999; Ryll *et al.*, 2002). Neben Leber-, Milz- und Nierenschwellungen können zusätzlich Veränderungen am Herzen in Form von Perikarditis, Myokarditis, Aortenrupturen und Myokardose auftreten (Hafez *et al.*, 1993; De Rosa *et al.*, 1996; Sprenger *et al.*, 1998; Joubert *et al.*, 1999; Ryll *et al.*, 2002).

Szalay *et al.* (2002) fanden bei Puten des Weiteren eine fibrinopurulente Entzündung der Schädelknochen sowie Meningitis vor. Darüber hinaus wurden bei Putenelertieren vereinzelt Arthritiden und eine Deformation des Ovars beobachtet (De Rosa *et al.*, 1996; Joubert *et al.*, 1999).

Koga und Zavaleta (2005) fanden bei Hennen im Allgemeinen, El-Gohary *et al.* (1998) und Sprenger *et al.* (2000b) bei Legehennen neben den oben genannten Veränderungen



des Respirationssystems Oophoritis, Eiperitonitis und veränderte Follikel (rupturiert, hämorrhagisch, aträsiert) vor.

Die bei den Broilern am häufigsten anzutreffenden pathologisch-anatomischen Veränderungen betreffen ebenfalls den Respirationstrakt: hier kommt es zur Ausbildung einer moderaten bis chronischen Aerosacculitis (Van Beek *et al.*, 1994; Travers, 1996; van Veen *et al.*, 2000b). Weitere auffällige Veränderungen in Untersuchungen von Broilern waren Polyserositis, Synovitis, Arthritis, Peritonitis, Aszites und Perikarditis und Femurkopfnekrosen (Travers *et al.*, 1996; van Veen *et al.*, 2000b). Seltener konnte eine Dermatitis beobachtet werden (van Veen *et al.*, 2000b). Goovaerts *et al.* (1999) fanden durch ORT verursachte Ostitis, Osteomyelitis und Enzephalitis vor.

#### 2.4.4 Histologisch-pathologische Veränderungen

Histologisch-pathologische Veränderungen beim Geflügel nach einer Feldinfektion zeigen sich vor allem im unteren Respirationstrakt. Im Lungengewebe kann es zur Ausbildung von schweren perivaskulären und interstitiellen Ödemen mit Infiltration von heterophilen Granulozyten und Lymphozyten bis hin zur Bildung multipler Nekroseherde kommen (Ghazikhanian, 1996). Aufgrund der fibrinoheterophilen Exsudation sind die serösen Häute und die Luftsäcke verdickt (De Rosa *et al.*, 1996). Extrem hyperämisch stellen sich die Parabronchien und Luftkapillare dar, die außerdem mit Fibrin, heterophilen Granulozyten, Makrophagen und Bakterien angefüllt sind. Weitere Befunde können hyaline Thromben in allen Organen, Hepatitis, Stauung der Leber, Milz und Nieren sein (De Rosa *et al.*, 1996; Sprenger *et al.*, 1998; Joubert *et al.*, 1999). Arterien können gelegentlich eine milde Proliferation der Endothelzellen mit vakuolisiertem Zytoplasma und eine Infiltration von heterophilen Granulozyten in die Endothelialschicht zeigen (De Rosa *et al.*, 1996).

Nach experimenteller Infektion zeigten die Nasenmuscheln und die Trachea neben Entzündungsreaktionen einen fokalen Verlust der Zilien und/oder Nekrose des Epithels sowie eine Degeneration der mukösen Drüsen. In der Lunge konnten Areale mit Bronchitis bzw. Bronchiolitis beobachtet werden. Einen Zusammenhang mit der Anwesenheit der Bakterien an den Zilien und der Schwere der histopathologischen Läsionen konnten Marien *et al.* (2005) nicht bestätigen. In der Untersuchung von van Empel (1998b) zeigten SPF-Leghorns unter einer ORT-Exposition minimale Infiltration der Luftsäcke und des respiratorischen Epithels mit polymorphonukleären Granulozyten. Auf dem Epithel und den Zilien konnten ebenso Bakterien bzw. Fragmente von ORT nachgewiesen werden.

#### 2.4.5 Immunantwort

Sowohl experimentelle als auch natürliche Infektionen induzieren die Bildung ORT-spezifischer Antikörper bei Hühnern und Puten, die in verschiedenen Testsystemen wie ELISA, Serumagglutinationstests (RAT, SAT, SPAT), Dotimmunobinding-Assay (DIA) und

quantitativem AGP nachgewiesen worden sind. Dabei wies der ELISA eine gute Korrelation zu den Ergebnissen aus der Isolierung und den klinischen Symptomen einer Herde und eine höhere Sensitivität auf als der Serumagglutinationstest (Heeder *et al.*, 2001; Refai *et al.*, 2005). Jedoch sind Antikörper gegen ORT in der Putenpopulation trotz des Fehlens klinischer Symptome sehr weit verbreitet (Hafez und Friedrich, 1998; Hafez, 1998b; Back *et al.*, 1999; Türkyilmaz und Kaya, 2005).

Im Initialstadium der Infektion wurden hohe Niveaus der Antikörperklasse IgM nachgewiesen. Die anschließende experimentelle intravenöse Infektion von SPF-Broilern führte eine Woche p. i. zur Bildung höherer Serumantikörperkonzentrationen im Vergleich zur Infektion mittels Aerosol und induzierte primär die Bildung von IgG, während bei der Aerosol-Infektion eher IgA und IgG produziert wurden (Schuijffel *et al.*, 2005a).

Mit den Untersuchungen von Sommer und Gabler (2000), Sakai *et al.* (2000), Sprenger *et al.* (2000b) und Heeder *et al.* (2001) wurde eine Vielzahl positiver Herden bzw. Tiere nachgewiesen, deren Anzahl nach der Beobachtung von Allymehr (2006) mit zunehmendem Alter der Tiere weiter ansteigen kann. Auch Refai *et al.* (2005) wiesen in 7 von 10 Herden mit klinischen respiratorischen Symptomen Antikörper gegen ORT nach, allerdings traten Antikörper auch in einer klinisch gesunden Herde auf. Dieser Sachverhalt wurde von Sommer und Gabler (2000) sowie Zorman-Rojs *et al.* (2000) auch bei Mastputenherden beobachtet.

Eine Doppelinfektion mit TRT und ORT in verschiedenen Putenmastherden nach einer Feldinfektion erreichte zwischen der 3. und 8. Woche nach Auftreten der klinischen Erscheinungen den Höchststand der Antikörper gegen ORT, der für ca. 3 Wochen anhielt (Hafez, 1998b). Hohe bzw. gleich bleibende Antikörper-Niveaus in Hühnern wurden für einen Zeitraum von 28 Tagen nach Infektion (Thachil *et al.*, 2007) bzw. für mindestens 14 Wochen (van Empel *et al.*, 1999) beobachtet. Bei Putenseren mittels ELISA, basierend auf OMP des Serotyps A, betrug dieser Zeitraum 8 Wochen (Lopes *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit einer Feldinfektion sinkt der Antikörperspiegel nach 6-10 Wochen wieder (van Empel *et al.*, 1997). Eine Beeinflussung der Antikörperantwort im Rahmen einer experimentellen Infektion durch eine sofortige Behandlung mit Antibiotika (hier Amoxicillin) erfolgt nicht. Startet die Behandlung am 7. Tag p.i., so kann die Antikörperantwort etwas geringer ausfallen (Popp, 2003).

Der Nachweis maternaler Antikörper mittels ELISA gelang van Empel (1998a) und Naeem *et al.* (2003). Dagegen konnten Heeder *et al.* (2001) und Türkyilaz und Kaya (2005) in ihren Untersuchungen keine maternalen Antikörper nachweisen.

## 2.5 Diagnose

Die bereits dargestellten Symptome, pathologisch-anatomischen sowie histologischen Veränderungen einer ORT-Infektion treten auch bei anderen Erkrankungen des Geflügels auf. Eine sichere Diagnose kann deshalb nur durch die Isolierung und Identifizierung des verursachenden Agens gestellt werden (Hafez, 1996). Möglichkeiten des direkten bzw. indirekten Nachweises von ORT werden im Folgenden vorgestellt.

### 2.5.1 Direkter Nachweis

#### 2.5.1.1 Erregernachweis

Der Nachweis von ORT-DNA mittels PCR wurde von van Empel (1998b) erarbeitet. Die Verwendung von Primern, die ein 784 bp großes Fragment innerhalb des 16S rRNA-Gens von ORT, aber nicht von anderen relevanten und verwandten Bakterien amplifizieren, erlaubt eine sichere Diagnosestellung aus untersuchten Bakterienisolaten (van Empel, 1998b; Koga und Zavaleta, 2005; Tsai und Huang, 2006), Trachealtupfern (Hung und Alvarado, 2001) und Rachentupfern (Van Loock *et al.*, 2005). Für epidemiologische Fragestellungen könnte die PCR für den Nachweis von ORT in Eiern, Kot, Staub- oder Gewebeproben eingesetzt werden; allerdings muss die Sensitivität der Methode für dieses Probenmaterial noch erarbeitet werden (van Empel, 1998b).

Unter Anwendung einer immunohistochemischen Färbung kann ORT unmittelbar im Gewebe nachgewiesen werden. Sowohl die Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Färbung als auch der Immunofluoreszenztest (IFT) sind für den Nachweis von ORT in infizierten respiratorischen Geweben geeignet (Back *et al.*, 1998a; van Empel *et al.*, 1999; van Veen *et al.*, 2005). Der Antigennachweis mittels PAP-Färbung gelang van Veen *et al.* (2000b) in Sehnenscheiden und Aponeurosen von Broйлern. Der IFT weist nach van Veen *et al.* (2005) die gleiche Sensitivität auf wie die PAP, ist aber aufgrund der einfacheren und leichteren Handhabung vorzuziehen.

#### 2.5.1.2 Erregerisolierung

Die Entnahme von geeignetem Material zur Isolierung von ORT sollte zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion, möglichst während der akuten Phase, stattfinden. Zur Kultivierung von ORT wird sehr häufig Blutagar mit Schafblut verwendet.

In kontaminiertem Probematerial können schnellwachsende Bakterien wie *E. coli*, *Proteus* oder *Pseudomonas* ORT überwachsen und die Identifizierung verdächtiger ORT-Kolonien in der Routinediagnostik erschweren. Zur Wachstumshemmung der genannten Begleiterreger können dem Blutagar Gentamicin und/oder Polymyxin B hinzugefügt werden (Hafez *et al.*, 1993; van Empel *et al.*, 1997).

Die Isolierung von ORT aus der Trachea, Lunge und den Luftsäcken verlief in den meisten Fällen erfolgreich (Charlton *et al.*, 1993; Vandamme *et al.*, 1994; Travers, 1996; Hafez, 1997). Auch die Kultivierung aus Material des Sinus, Herzens, Perikards, Konjunktiven, Milz, Dottersacks, Abszesses, der Knochen und Gelenke, Gehirns und Peritoneums gelang (Charlton *et al.*, 1993; De Rosa *et al.*, 1996; van Empel *et al.*, 1997). Dagegen gestaltet sich die Isolierung von ORT aus Lebergewebe schwierig: es gab positive (Charlton *et al.*, 1993; De Rosa *et al.*, 1996; van Empel *et al.*, 1997; Sprenger *et al.*, 1998; Back *et al.*, 1998b) als auch negative Ergebnisse (Hafez, 1994; De Rosa *et al.*, 1996; Hafez und Friedrich, 1998; Marien *et al.*, 2005). Szalay *et al.* (2002) isolierte ORT aus den Hirnhäuten und den pathologisch veränderten Arealen der Schädelknochen von Puten, die im Rahmen einer ORT-Infektion zentralnervöse Symptome zeigten. Nach einer experimentellen Infektion konnte ORT aus Herz, Perikard, Gehirn, Sprunggelenk, Ovar, Eileiter, Milz, und Nieren isoliert werden (Travers *et al.*, 1996; Sprenger *et al.*, 1998; Back *et al.*, 1998b; Nagaraja *et al.*, 1999; Marien *et al.*, 2005).

#### 2.5.1.3 Erregeridentifizierung

Die Beurteilung der Kolonimorphologie und die Gram-Färbung verdächtiger ORT-Kolonien sind für die Identifizierung unabdingbar.

Bezüglich der biochemischen Reaktionen muss beachtet werden, dass in Flüssigmedien kultivierte ORT-Isolate aufgrund der geringen Wachstumsfähigkeit unterschiedliche Ergebnisse aufweisen können. Unter Nutzung geeigneter Medien und optimaler Wachstumsbedingungen stellen sich die biochemischen Testergebnisse als relativ beständig dar, ungeachtet der Herkunft und des Serotyps des untersuchten ORT-Stammes (van Empel und Hafez, 1999).

ORT-Isolate weisen die Produktion von alkalischer Phosphatase, Esterase/lipase, saurer Phosphatase, Phosphorhydrolase, Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin,  $\alpha$ -Galaktosidase,  $\beta$ -Galaktosidase,  $\alpha$ -Glukosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glukosaminidase, Cystin-Amino-peptidase, Leucin-Amino-peptidase und Valin-Amino-peptidase auf. Dagegen werden Katalase, Ornithindecaboxylase, Lysindecaboxylase, Lipase,  $\alpha$ -Glukoronidase,  $\beta$ -Glukoronidase,  $\alpha$ -Mannosidase,  $\alpha$ -Fukosidase und  $\beta$ -Glukosidase nicht produziert. Eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit und Indolbildung findet ebenfalls nicht statt. Hinsichtlich der Aktivität von Cytochromoxidase, Urease, Arginindehydrolase sowie der Säurebildung aus Kohlenhydraten wie Fruktose, Galaktose, Glukose, Laktose, Maltose und Mannose wiesen ORT-Isolate variable Ergebnisse auf (Hinz *et al.*, 1994; Van Beek *et al.*, 1994; Vandamme *et al.*, 1994; Travers, 1996; Chin und Charlton, 1998; Hafez, 1998a; van Empel und Hafez, 1999; Ryll *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2003).

Zur Vereinfachung der biochemischen Identifizierung wird der kommerzielle Teststreifen API 20 NE (BioMerieux, Frankreich) von van Empel *et al.* (1997) empfohlen. Obwohl für ORT kein biochemischer Code in der Datenbank dieses Systems hinterlegt ist, gelten Isolate mit den Profilen 0-2-2-0-0-0-4 und 0-0-2-0-0-0-4 als verdächtig. Ergeben sich unter Einbezug eines ADH-Test im API 20 NE-System die Profile 0-3-2-0-0-0-4 oder 0-1-2-0-0-0-4, handelt es sich höchstwahrscheinlich um ORT (van Empel *et al.*, 1997). Seit Travers *et al.* (1996) und Ryll *et al.* (2002) von Cytomchromoxidase-negativen Isolaten berichteten, gelten die Profile 0-0-2-0-0-0-0 und 0-2-2-0-0-0-0 im API 20 NE als ebenso ORT-verdächtig. Ein weiteres kommerzielles System stellt das RapID NF Plus System (Inoovative Diagnostics, USA) dar. Profil-Indices von 472264, 476264, 676264 der 672264 sind für ORT-Isolate typisch (Post *et al.*, 1999).

Unter Anwendung der Gaschromatographie und eines Tests zur Bestimmung der Fettsäuremethylester (Microbial Identification System (Microbial ID) dominieren die Fettsäuren 15:0 iso, 15:0 iso 3OH, 17:0 iso 3OH, 16:0 und 17:0 iso und 16:0 3OH. Die genannten Fettsäuren in ihrer jeweiligen Konzentration und unbekannte Peaks mit äquivalenten Kettenlängen von 13566 und 16580 ergeben ein für ORT typisches Muster (Charlton *et al.*, 1993; Vandamme *et al.*, 1994).

#### 2.5.1.4 Erregertypisierung

Unter Verwendung monovalenter Antiseren kann ORT mittels AGP und ELISA identifiziert und serotypisiert werden. Die Serotypspezifität hängt dabei von der Art der Aufbereitung des Antigens ab. Hitzestabile Antigene stellen sich für die Serotypisierung als sehr geeignet dar. Die Aufbereitung der Antigene kann nach den Angaben von Hafez und Sting (1999) erfolgen.

Die bereits vorgestellte Typisierung mittels PCR-Fingerprinting und der Immunoperoxidase-Assay (Hung und Alvarado, 2001) könnten weitere Methoden zur Serotypisierung darstellen. Fitzgerald *et al.* (1998) schlagen die Hämagglutinationsfähigkeit einiger ORT-Isolate als mögliche alternative Methode der Serotypisierung vor.

#### 2.5.2 Indirekter Nachweis

Der indirekte Nachweis einer ORT-Infektion erfolgt über den Nachweis von Antikörpern gegen ORT. Den Literaturangaben zufolge stellen der SAT, DIA und der ELISA die am häufigsten angewandten Tests dar.

Mittels SAT konnten Antikörper gegen ORT bei Hühnern und Puten nachgewiesen werden. Der DIA zeigte bei der Untersuchung von aus Legehennen stammenden Seren eine geringere Sensitivität als der SAT, Angaben zur Spezifität des DIA fehlten jedoch (Sprenger *et al.*, 1998; Back *et al.*, 1998a; Sprenger *et al.*, 2000b; Heeder *et al.*, 2001; Erganis *et al.*, 2002).

Die Serotypspezifität des häufig in der Routinediagnostik angewendeten ELISA ist abhängig von der Art der Antigenaufbereitung. In dem von Hafez und Sting (1999) entwickelten ELISA unter Verwendung von SDS-extrahiertem Antigen des Isolates GGD 1261/91 (Serotyp B) konnten Kreuzreaktionen aller Isolate gegen alle Antiseren beobachtet werden. Van Empel *et al.* (1997) verwendeten hitzestabiles Antigen der Serotypen A bis G im ELISA. Der Test reagierte serotypspezifisch, zeigte allerdings auch leichte Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen A, B, D und E. Dagegen nutzten Lopes *et al.* (2000) die äußeren Membranproteine (outer-membrane-proteins; OMP) von ORT als Antigen im ELISA. Die Autoren vermuteten aufgrund der Analyse dieser Proteine die Nutzung des OMP eines einzigen ORT-Serotyps als Antigen zum Nachweis verschiedener Serotypen. Unter Verwendung dieses ELISA wurden sowohl spezifische Antikörper als auch Kreuzreaktionen zwischen allen getesteten Serotypen nachgewiesen.

Im Vergleich zwischen dem auf SDS-extrahiertem Antigen basierenden ELISA und einem kommerziellen ELISA (BioChek) stellten sich beide Testsysteme trotz geringfügig unterschiedlicher Ergebnisse als gleichermaßen geeignet dar, Antikörper gegen die zwölf getesteten Serotypen (A-L) in Seren experimentell infizierter SPF-Hühner zu detektieren (Hafez *et al.*, 2000). Die zurzeit erhältlichen kommerziellen Testkits der Hersteller Biochek und IDEXX ergaben in der Herdenbeurteilung und in der Beurteilung der einzelnen Serumproben von Puten und Hühnern unterschiedliche Ergebnisse (Sommer und Gabler, 2000).

### 2.5.3 Differentialdiagnose

Respiratorische Symptome bzw. pathologisch-anatomische Veränderungen des Respirationstrakts, die mit einer ORT-Infektion einhergehen, ähneln denen, die durch Bakterien wie *E. coli*, *Chlamydothyla psittaci*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella avium*, *Haemophilus paragallinarum*, *Riemerella anatipestifer* oder *Mycoplasma spp.* hervorgerufen werden (Hinz *et al.*, 1994; De Rosa *et al.*, 1996; Hafez, 1996; Back *et al.*, 1997; Roepke *et al.*, 1998; Hafez, 2002). Auch virale Infektionen, wie zum Beispiel mit dem TRT-Virus oder dem Aviären Influenzavirus, müssen in Betracht gezogen werden (Hafez, 1996; Roepke *et al.*, 1998). Für das gelegentliche Auftreten von Gelenksentzündungen bei einer ORT-Infektion müssen differentialdiagnostisch Infektionen mit Reoviren, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus faecalis* abgeklärt werden (van den Bosch, 2001). Die beschriebenen okulären Symptome bei Puten könnten auch auf eine bakterielle Infektion mit *E. coli* oder *Proteus* bzw. auf eine mykologische Infektion, hervorgerufen durch *Candida albicans*, zurückgeführt werden (Korbel und Hafez, 2001).

## 2.6 Bekämpfungsmaßnahmen und Kontrolle

Kernpunkte der Bekämpfung stellen die Verbesserung der hygienischen Bedingungen und die Ausschaltung aller schwächenden Umwelteinflüsse dar (Hafez, 1997). Dies gewinnt immer mehr an Bedeutung, da extreme Konzentrationen von Puten in definierten geographischen Gebieten eine Ausbreitung von ORT verstärken (Bostvironnois und Zadjian, 2008). Die häufig anzutreffende „multiple-age“ Produktion erlaubt keine effektive Reinigung und Desinfektion, wodurch eine Persistenz von ORT trotz der Anfälligkeit gegenüber Desinfektionsmitteln nicht verhindert werden kann. Zur Eindämmung einer Infektion sollte das Prinzip des „all in, all out“ angewendet werden (Hafez und Schulze, 2003). Zur Kontrolle der Krankheit sollten alle Formen der horizontalen Infektion sowie der vermuteten vertikalen Infektion reduziert werden.

### 2.6.1 Therapie

Vor der Wahl eines Wirkstoffes zur Behandlung einer durch ORT verursachten Infektion sollte die Herkunft des Isolates berücksichtigt werden (van Empel und Hafez, 1999). Ein Resistenztest muss vor jedem Einsatz eines Therapeutikums durchgeführt werden. Die Behandlung einer ORT-Infektion in Deutschland mit 200-300 ppm Amoxicillin über das Trinkwasser (Hafez *et al.*, 1993; Hinz *et al.*, 1994) brachte zufrieden stellende Ergebnisse. Aus den Niederlanden wurde von uneffektiven Behandlungen erkrankter Puten mit Enrofloxacin sowie der Kombination Trimethoprim+Sulfonamide berichtet. Die in einigen Fällen angewandten Injektionen mit Tetracyclinen und synthetischen Penicillinen waren dagegen wirksam (Van Beek *et al.*, 1994).

Der Einsatz der Wirkstoffe Kitassamycin und Amoxicillin über das Trinkwasser sowie Oxytetracyclin und Hydrochlorid über das Futter für 4 Tage zur Behandlung von Legehennen in Ägypten führte innerhalb einer Woche zur deutlichen Reduktion der Mortalität und zum enormen Anstieg der Legeleistung (El-Gohary *et al.*, 1998). Marien *et al.* (2007) infizierten 3 Wochen alte Puten mit APV, ORT und *E. coli*. Die anschließende Behandlung mit Enrofloxacin führte zu einer Reduktion der klinischen Zeichen sowie einem Nachlassen der Vermehrung der Bakterien im Respirationstrakt. In Kanada konnte unter dem Einsatz von Enrofloxacin bei Puten keine Besserung festgestellt werden (Joubert *et al.*, 1999).

## 2.6.2 Immunprophylaxe

### 2.6.2.1 Aktive Immunprophylaxe

Die aktive Immunprophylaxe umfasst eine Vielzahl von Studien mit Inaktivat-, Lebend- bzw. Spaltimpfstoffen.

Die Anwendung von mono- bzw. trivalenten Inaktivatimpfstoffen mit Aluminiumhydroxid-Adjuvans bei Mastputen führte zur Ausbildung einer Immunantwort verbunden mit einer Reduktion der Mortalitäts- und Verwurfsraten (Hafez *et al.*, 1999). Beide Impfstoffe wurden von den Tieren gut vertragen, dagegen traten in einem weiteren Versuch bei Mastputen, denen trivalenten Impfstoff auf Ölemulsionsbasis verabreicht worden war, nach der ersten Impfung leichte Gewebereaktionen und nach der zweiten Impfung gelegentlich zentralnervöse Störungen auf (Popp, 2003). Die Auswertung der wirtschaftlichen Parameter brachte keinen Aufschluss über die Verbesserung der Wirtschaftlichkeit.

Eine Vakzinierung von Legehennen und Eintagsbroilerküken mit einem Inaktivatimpfstoff mit Mineralöl-Adjuvans resultierte in einer ausreichenden Immunantwort (van Empel und van den Bosch, 1998). Allerdings empfehlen die Autoren die Vakzinierung von Broilerküken mit diesem Adjuvans nur im Notfall, da lokale Gewebereaktionen oder ein negativer Effekt auf die Entwicklung der Tiere auftreten können. Wird Masthähncheneltern in der 12. und 18. Lebenswoche dieser Impfstoff verabreicht, führt dies zu einer hohen und langanhaltenden Immunantwort der Impflinge sowie zu einem hohen Titer maternalen Antikörper in den Nachkommen (van Empel und van den Bosch, 1998). Auch eine Vakzinierung der Puteneltern resultierte bei den Nachkommen in einem Schutz vor ORT-Infektionen in einem frühen Alter. Wurden die Nachkommen dann in der zweiten Lebenswoche geimpft, so waren sie während der Aufzuchtphase, mindestens jedoch bis zur sechsten Lebenswoche vor einer ORT-Infektion geschützt (van Veen *et al.*, 2004).

Puten und Broiler, denen ein Lebendimpfstoff verabreicht wurde und die anschließend experimentell mit ORT infiziert wurden, wiesen höhere Antikörpertiter und geringere pathologische Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf (van Empel und van den Bosch, 1998; Sprenger *et al.*, 2000a). Je geringer der Titer der maternalen Antikörper der Broiler zum Zeitpunkt der Impfung war, desto höher fiel die Immunantwort auf die Vakzinierung aus bzw. desto geringer waren die pathologischen Veränderungen im Rahmen der experimentellen Infektion (van Empel und van den Bosch, 1998).

Eine temperatursensitive Mutante von ORT als Lebendvakzine gegen eine ORT-Infektion entwickelten Lopes *et al.* (2002a). Der Stamm, der bei einer Temperatur von 31 °C, nicht aber bei 41 °C wächst, siedelt sich nur im oberen Respirationstrakt an. Zur Ausbildung schwerer Läsionen im unteren Respirationstrakt kommt es dabei nicht. Eintagsputen, denen der Impfstamm über das Trinkwasser, intranasal oder intraokulär verabreicht worden war,



zeigten nach der experimentellen Infektion mit ORT unabhängig von der Darreichungsform und der Keimzahl der Vakzine eine Immunantwort. Die im Rahmen einer Feldstudie am 5. Lebenstag vakzinierten und 7 Wochen später experimentell infizierten Puten zeigten deutliche Immunantworten und geringe pathologische Veränderungen (Lopes *et al.*, 2002a; Lopes *et al.*, 2002b).

Die Studien von Schuijffel *et al.* (2005a, 2005b) beschreiben die Entwicklung eines Spaltimpfstoffes (Subunit-Vakzine), die auf die Amplifikation und Expression der Gene von acht kreuzprotektiven ORT-Antigenen basiert. Der Test dieser Vakzine gegen eine experimentelle Infektion mit einem homologen und heterologen ORT-Serotypen bei Broilern zeigte neben einem stimulierten humoralen Immunsystem eine deutliche Reduktion pathologischer Veränderungen im Respirationstrakt. Bei einer fortführenden Untersuchung der acht Antigene stellte sich heraus, dass nur das Antigen Or77 vor einer Infektion mit einem heterologen Serotypen schützte. Das für dieses Antigen kodierende Gen war bei den meisten Stämmen der untersuchten Serotypen präsent und hoch konserviert.

Zurzeit ist für eine aktive Immunisierung gegen ORT bei Mastelternieren nur ein Impfstoff (Nobilis OR Inac<sup>®</sup>, Intervet GmbH) in Deutschland zugelassen. Es handelt sich dabei um eine inaktivierte Ganzzellsuspension des Serotyps A, der weiblichen Mastelternieren im Alter von 6-12 Wochen (1. Impfung) und 14-18 Wochen (2. Impfung) subkutan oder intramuskulär verabreicht wird.

#### 2.6.2.2 Passive Immunprophylaxe

Im Rahmen der Untersuchung der Rolle der humoralen Immunantwort in der ORT-Infektion bezeichneten Schuijffel *et al.* (2005a) den Transfer spezifischer Antikörper gegen ORT als weitere Möglichkeit der Prophylaxe einer ORT-Infektion. Hierzu wurden die in immun-kompetenten Hühnern gebildeten spezifischen Antikörper gegen ORT auf immun-inkompetente Hühner übertragen. Alle Antiseren enthielten nahezu die gleiche Konzentration an IgG. Fünf Stunden nach dem Transfer erfolgte die intravenöse Infektion der immun-inkompetenten Tiere mit ORT-Serotyp A. Bei allen immun-inkompetenten Tieren führten die transferierten Antikörper zu einer deutlich verringerten Morbidität.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

- für die Identifizierung und Typisierung des Erregers

Verbrauchsmaterial/Geräte	Hersteller/Vertrieb
Ableselampe für AGP-Platten	
Anaerobiersystem <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anaerobiertopf BD GasPak™100</li> <li>- CO<sub>2</sub>-Erzeugung: BD BBL™GasPak™CO<sub>2</sub> System Envelopes</li> </ul>	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
API 20 NE-System (Test zur Identifizierung gramnegativer, nicht fermentierender Bakterien [nicht Enterobacteriaceae])  Zusatzreagenzien: <ul style="list-style-type: none"> <li>- JAMES-Reagenz</li> <li>- Nit 1 &amp; Nit 2</li> <li>- Zinkpulver</li> </ul>	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Basisagar Bacto™Agar	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank (Bakteriologie)	Heraeus Typ B12, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz
Columbia-Agar mit Schafblut	Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Drehverschlussröhrchen Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Drigalskispatel	
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Feinwaage „Präzisionswaage 2250“	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Gassner-Nährboden	Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Gramfärbung Color Gram 2	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Größenstandard 100 bp	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Küvetten	Bio-Rad, München, Deutschland
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland

Material und Methoden

<b>Verbrauchsmaterial/Geräte</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Magnetrührgerät Typ MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe Typ MZ2C	Vacuubrand GmbH+Co, Wertheim, Deutschland
Mikroskop	Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle	Severin, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Oxidase-Test: BD BBL™DrySlide™Oxidase	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH+Co, Wertheim, Deutschland
Petrischalen 94/16	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH-Meter: handylab pH 11	Schott Geräte GmbH, Mainz, Deutschland
Pipetten: Eppendorf (1-5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen: Eppendorf (2-5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Primer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads	Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland
QIAmp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Thermoblock (Thermomixer comfort)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Transilluminator Typ UVT 2053 (302 nm, mittelwellig)	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Videodokumentationssystem Bioprint DS und Software BioCapt Version 97.05	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage: Sartorius BL600	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	
- Typ 5415C und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

- für die Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting

<b>Verbrauchsmaterial/Geräte</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Anaerobiersystem Anaerobiertopf BD GasPak™100 CO <sub>2</sub> –Erzeugung: BD BBL™GasPak™CO <sub>2</sub> System Envelopes	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschrank (Bakteriologie)	Heraeus Typ B12, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz
Columbia-Agar mit Schafblut	Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage „Präzisionswaage 2250“	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Größenstandard 100 bp-DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Größenstandard 1 kb-DNA Ladder	Lifetechnologies™Gibco Brl, Galthersburg, USA
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Küvetten	Bio-Rad, München, Deutschland
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrowelle	Severin, Deutschland
Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Primer	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads	Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland
QIAmp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Safe-Lock Zentrifugengefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SeaKem® LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Videodokumentationssystem Gel DocXR und Software Quantity One® 4.6.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen (Typ 5415C und 5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- für die Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen

<b>Verbrauchsmaterial/Geräte</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Anaerobiersystem Anaerobiertopf BD GasPak™100 CO <sub>2</sub> –Erzeugung: BD BBL™GasPak™CO <sub>2</sub> System Envelopes	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Brutschrank (Bakteriologie)	Heraeus Typ B12, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz
Brutgerät für Vorbebrütung: Serie BSS/Compact	Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Columbia-Agar mit Schafblut	Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Densitometer	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Drigalskispatel	
Eierprüflampe (Typ ORBAN Tempo 119)	Siepmann GmbH, Herdecke, Deutschland
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Feindosierungsspritze 1 ml	Omnican® F, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Paraffin	
Pinzetten, steril	
Pipetten: Eppendorf (1-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfen (Accuboy)	Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
Pipettenspitzen: Eppendorf (2-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präpariernadeln (Metallhorn zum Öffnen der Eierschale)	
Scheren, steril	
SPF-Bruteier	Valo SPF-Bruteier, Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Deutschland
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wattetupfer, steril	Firma Böttger, Bodenmais, Deutschland

- für die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration

<b>Verbrauchsmaterial/Geräte</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Anaerobiersystem - Anaerobiertopf BD GasPak™100 - CO <sub>2</sub> -Erzeugung: BD BBL™GasPak™CO <sub>2</sub> System Envelopes	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
ATB Densitometer Prüfkrit	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Autoklav	
Brutschrank (Bakteriologie)	Heraeus Typ B12, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz
Columbia-Agar mit Schafblut	Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Dampftopf	
Densitometer	BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Dispensierwannen	
Drigalskispatel	
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnetrührgerät Typ MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Pferdeblut, lysiert	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Pipetten (1-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (1-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
12 Kanal-Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sensititre®-Mikrotiterplatten	TrekDiagnostic Systems Ltd., East Grinstead, England
Spiegel zum Ablesen	
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wattetupfer, steril	Firma Böttger, Bodenmais, Deutschland
Waage: Sartorius BL600	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

### 3.1.2 Inhalt der verwendeten Kits

- Gram-Färbung (BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland)  
Kristallviolett-Oxalat-Lösung  
Stabilisierte Lugol-PVP-Lösung  
Entfärber  
Safranin-Lösung
- Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek GmbH, Berlin, Deutschland)  
Gel-Lösungspuffer (Gel Solubilizer S); Bindungspuffer (Binding Enhancer); Filtersäulen;  
Waschpuffer; Elutionspuffer
- QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)  
Proteinase K (20 mg/ml), Lysispuffer ATL, Lysispuffer AL, QIAamp<sup>®</sup>-Säulen, Waschpuffer  
AW 1 und AW 2, Elutionspuffer AE
- PuReTaq<sup>™</sup> Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland)  
PCR-Gefäße mit Puffer-, Nukleotid- und Polymerasemix in lyophilisierter Form. Im  
vorgesehenen Endvolumen von 25 µl sind enthalten: 1,5 Einheiten Taq-DNA-  
Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Stabilisatoren  
einschließlich Bovines Serumalbumin, 200 µM je dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat;  
dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

### 3.1.3 Medien und Puffer

- Natriumchloridlösung 0,9%  
Natriumchlorid 9 g  
(Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua bidest.
- Natriumchloridlösung 8%  
Natriumchlorid 80 g  
(Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua bidest.
- Basisagar für AGP-Platten  
Bacto<sup>™</sup> Agar 5 g  
8%ige wässrige Natriumchlorid-Lösung 495 ml  
pH 7,0

Unter Erwärmen wurden 5 g Bacto<sup>™</sup>Agar in 495 ml 8%ige Natriumchlorid-Lösung aufgelöst und auf pH 7,5 eingestellt. Das anschließende 20minütige Autoklavieren erfolgte bei einer Temperatur von 121 °C mit nachfolgender Korrektur des pH-Wertes auf 7,2. Nach dem Nachsterilisieren, das für 20 Minuten bei 100 °C in einem Dampftopf erfolgte, wurden je 15 ml des abgekühlten, aber noch flüssigen Agars in Petrischalen gegossen und über Nacht zum Erstarren stehen gelassen. Die Schalen wurden anschließend im Kühlschrank bei 4 °C auf dem Deckel liegend aufbewahrt.

- PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
  - Natriumchlorid 137 mM
  - Kaliumchlorid 1,47 mM
  - Di-Natriumhydrogenphosphat 6,46 mM
  - Kaliumhydrogenphosphat 1,47 mM
  - pH 7,4
  
- TBE-Puffer (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer)
  - Tris 89 mM
  - Borsäure 89 mM
  - EDTA Dinatriumsalz 2 mM
  - pH 7,5
  
- Größenstandard 100 bp
  - 100 bp-DNA Ladder 30 µl
  - (0,5 µg DNA/µl)
  - Probenladepuffer 30µl
  - Aqua bidest. 185 µl
  - pH 7,5
  
- Probenladepuffer
  - Bromphenolblau 0,25 %
  - Xylencyanol 0,25 %
  - Glycerin 30,0 %
  - in TBE-Puffer (4x)
  
- Größenstandard 1 kbp
  - 1 kbp-DNA Ladder 30 µl
  - (1 µg DNA/µl)
  - Probenladepuffer 30 µl
  - Aqua bidest. 185µl
  
- Mueller-Hinton-II-Bouillon  
(Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA)  
Herstellung erfolgte nach Herstelleranweisung



### 3.1.4 Bakterienstämme und Seren

Für die Untersuchungen wurden 17 ORT-Standardserotypen A-Q (Tabelle 2), die, bis auf den Standardserotyp B (GGD 1261/91), freundlicherweise von der Firma Intervet International, Boxmeer, Niederlande, zur Verfügung gestellt wurden, sowie 88 ORT-Stämme, die dem Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin aus verschiedenen Regionen Deutschlands zur Differenzierung und Typisierung zugesandt wurden, verwendet. Die Feldisolate wurden in den Jahren 2003, 2005 und 2006 aus Mastputen verschiedenen Alters isoliert. Des Weiteren wurden 29 ORT-Isolate aus Frankreich zur Verfügung gestellt (Bio-Chêne Vert, Chateaubourg Cedex), die ebenfalls aus Mastputen im Jahr 2005 isoliert worden sind. Insgesamt wurden 117 Feldisolate charakterisiert und typisiert. Die Herkunft der Isolate ist in Tabelle 3 dargestellt.

Des Weiteren wurden die Bakterien *Pasteurella avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *E. coli* und *Aeromonas laidlawii* in die Untersuchung der Spezifität der für die Identifizierung von ORT angewendeten Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) einbezogen.

Im Rahmen der Empfindlichkeitstestung wurden zur Qualitätssicherung die Stämme *E. coli*, ATCC® 25922 und *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*), ATCC® 29213 mitgeführt.

Die in der Serotypisierung verwendeten Antiseren für die ORT-Serotypen A-L entstammten der Institutssammlung und wurden nach den Angaben von Hafez und Sting (1999) hergestellt.

Tabelle 2: Auflistung der ORT-Standardserotypen

ORT-Serotyp	Bezeichnung	ORT-Serotyp	Bezeichnung
A	B3263/91	J	O-97091 HEN81-2
B	GGD1261/91	K	BAC970321101 5m
C	K91-201	L	O-97071BUT2237
D	ORV-94084nr.2	M	TOP 98036 98.4500
E	O-95059nr.12229	N	TOP 99023 LMG 13114
F	ORV-94084K858	O	TOP 99023 LMG 11553
G	O-95059nr.16279	P	TOP 99090 may 71
H	E-94063 4.2.	Q	O-95256 SP 1507
I	BAC-96-8334		

Tabelle 3: Überblick über die Herkunft der Isolate

Herkunft			Anzahl
Land	Bundesland	Region	
Deutschland (n=88)	Brandenburg (n=5)	Ostprignitz-Ruppin	2
		unbekannt	3
	Niedersachsen (n=67)	Vechta	6
		Cloppenburg	14
		Oldenburg	43
		Emsland	3
		Westerstede	1
	Baden-Württemberg (n=4)	Rot am See	2
		Öhringen	1
		unbekannt	1
	Nordrhein-Westfalen (n=8)	unbekannt	8
	Sachsen-Anhalt (n=4)	unbekannt	4
Frankreich (n=29)		Loire et Atlantique	8
		Morbihan	2
		Manche	1
		Mayenne	7
		Ille et Vilaine	8
		Côtes d'armor	1
		Eure	1
		Sarthe	1

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung

#### 3.2.1.1 Isolierung

Alle 117 ORT-Feldisolate wurden von den Einsendern auf Blutagarplatten eingesandt. Hiervon wurden Subkulturen auf Columbia-Agar mit Schafblut und auf Gassner-Agar für die weiteren Untersuchungen angelegt. Die beimpften Platten wurden in den Anaerobiertopf gestapelt und ein nach Herstellerangaben vorbereiteter GasPak™ zur Erzeugung einer CO<sub>2</sub>-Spannung von ca. 5% hinzugefügt. Der Topf wurde fest verschlossen und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Trat eine Kontamination mit Fremdkeimen auf, so wurde das entsprechende Isolat unter gleichen Bedingungen erneut subkultiviert.

Um zu gewährleisten, dass es sich bei den angezüchteten Kulturen um gramnegative Bakterien handelt, wurde von jedem Isolat in Reinkultur eine Gramfärbung angefertigt. Dazu wurden 1-2 Ösen Koloniematerial auf einen mit einem Tropfen sterilen Wassers versehenen Objektträger verbracht und ausgestrichen. Im Anschluss an die Lufttrocknung wurde der Ausstrich hitzefixiert, nach Gram gefärbt und unter Verwendung der Ölimmersion mikroskopisch begutachtet und beurteilt. Verwendete Lösungen und der Ablauf der Gramfärbung sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Ablauf der Gramfärbung

Anfertigen des Ausstrichs	
Lufttrocknung	
Hitzefixierung	
Kristallviolett-Oxalat-Lösung	1 Minute Einwirkzeit; Abspülen mit Wasser
Stabilisierte Lugol-PVP-Lösung	1 Minute Einwirkzeit; Abspülen mit Wasser
Entfärber	keine Einwirkzeit; Abspülen mit Wasser
Safranin-Lösung	1 Minute Einwirkzeit; Abspülen mit Wasser
Trocknung	
Beurteilung des Ausstrichs	

### 3.2.1.2 Biochemische Identifizierung

Alle gramnegativen, ORT-verdächtigen Isolate wurden auf das Vorhandensein von Cytochromoxidase unter Verwendung des DrySlide™ **Oxidase**-Tests (Becton, Dickinson and Company, USA) getestet. Sowohl die oxidasepositiven als auch -negativen Isolate wurden in die weiteren Untersuchungen einbezogen, da Ryll *et al.* (2002) die Isolierung Cytochromoxidase-negativer ORT-Stämme gelang.

Im weiteren Verlauf der Identifizierung kam das kommerzielle biochemische Testsystem **API 20 NE** (BioMérieux, Nürtingen) zur Anwendung. Ausgewertete Teststreifen mit den Reaktionsprofilen 0-0-2-0-0-0-4 (Oxidase positiv, Urease negativ), 0-2-2-0-0-0-4 (Oxidase positiv, Urease positiv) 0-0-2-0-0-0-0 (Oxidase negativ, Urease negativ) sowie 0-2-2-0-0-0-0 (Oxidase negativ, Urease positiv) ließen die entsprechenden Isolate als ORT-verdächtig erscheinen (Hafez *et al.*, 1993; van Empel und Hafez, 1999; Ryll *et al.*, 2002) und galten als Voraussetzung für die anschließende molekularbiologische Identifizierung mittels PCR.

### 3.2.1.3 Molekularbiologische Identifizierung

Die molekularbiologische Identifizierung mittels PCR erfolgte unter Anwendung der von van Empel (1998b) beschriebenen Primer, mit denen ein 784 bp-großes Fragment innerhalb des 16S-rRNA-Gens von ORT nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht von einem verwandten Bakterium, wie die Spezifitätsprüfung unter Verwendung der Bakterien *Pasteurella avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *E. coli* und *Aeromonas laidlawii* ergab.

Die **Präparation der DNA** der zur Spezifitätsprüfung verwendeten Bakterien und der ORT-verdächtigen Isolate erfolgte mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranweisung. Als Ausgangsmaterial dienten frische Kulturen. Es wurden 180 µl Lysispuffer AL und 20 µl Proteinase K in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt und mit einer Öse Koloniematerial gründlich gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 56 °C und anschließend für 10 min bei einer Temperatur von 70 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Gemisch auf eine Säule überführt und für 1 min bei 5200 x g zentrifugiert.

Das Filtrat wurde verworfen. Von dem Waschpuffer AW1 wurden 500 µl auf die Säule pipettiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1 min, 8000 x g). Nach Verwurf des Filtrats folgte der zweite Waschschrift, indem 500 µl des Waschpuffers AW2 aufgetragen wurden. Die anschließende Zentrifugation verlief für 3 Minuten bei 14000 x g. Das Filtrat wurde wiederum verworfen. Mit der Zugabe von 100 µl des auf 70 °C vorgewärmten Puffers AE und einer Zentrifugation (1 min, 5200 x g) erfolgte die Elution der DNA aus dem Filterröhrchen. Die Konzentration der gewonnenen DNA (ng/µl) wurde photometrisch bei einer Lichtwellenlänge von 260 nm gegen destilliertes Wasser als Leerwert im Biophotometer gemessen. Dazu wurde die gewonnene DNA 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Zur Vervielfältigung des Produkts mittels **PCR** wurde in die Ready-To-Go PCR Beads je 25 µl Flüssigkeit, bestehend aus je 1 µl Primer OR 16S-F1 (5`- GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G-3`) und OR 16S-R1 (5`- TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT-3`), maximal 1000 ng extrahierter DNA sowie nukleasefreiem Wasser, gegeben. Die Konzentration der Primer betrug je 25 pmol/µl.

In jedem PCR-Ansatz wurden von Beginn der DNA-Extraktion an eine Präparationskontrolle bzw. von Beginn der PCR an eine Negativkontrolle zum Erkennen möglicher Kontaminationen der verwendeten Substanzen mitgeführt. Als Positivkontrolle diente der mitgeführte Standardserotyp ORT B (GGD 1261/91).

Die Amplifikation lief in einem Thermozykler mit dem in Tabelle 5 wiedergegebenen Temperaturprofil ab.

Tabelle 5: Temperaturprofil der PCR zum Nachweis von ORT

Schritt	Dauer	Temperatur in °C
Initiale Denaturierung	5 Minuten	94
45 Zyklen:		
Denaturierung	30 Sekunden	94
Annealing	1 Minute	52
Elongation	1,5 Minuten	72
Finale Extension	7 Minuten	72

Nach der Amplifikation erfolgte die Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Für die Herstellung eines 1%igen Gels wurden 1 g Agarose (SeaKem® LE Agarose) in 100 ml 1xTBE-Puffer gelöst, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Abkühlen (wahlweise im Wasserbad oder bei Raumtemperatur) wurde das noch flüssige Gel in einen Gelträger gegossen. Nach 30minütiger Polymerisation konnte das Gel beladen werden.

Vor dem Beladen des Gels wurden je 5 µl der PCR-Produkte mit 0,5 µl des Probenladepuffers vermischt und in die entsprechenden Vertiefungen des Gels verbracht. Als Größenstandard wurde bei jedem Durchgang 8 µl des 100 bp-Markers aufgetragen. Die **Gelelektrophorese** lief bei 60-65 Volt über 2-2,5 h ab. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet.

Zur **Analyse der Fragmente** wurde das Gel nach erfolgter Gelelektrophorese in die Videodokumentations-Einrichtung verbracht. Mittels UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht werden. Die Auswertung wurde mit der Software BioCapt Version 97.05 durchgeführt. Bei einem positiven PCR-Ergebnis wurde die gewonnene DNA der untersuchten Isolate bei -20 °C eingefroren und aufbewahrt.

Um das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten, erfolgten alle Arbeitsschritte in getrennten Arbeitsräumen. Für jeden Untersucher standen getrennte Reagenzien und Lösungen zur Verfügung.

### 3.2.1.4 Sequenzierung des OR 16S-F1/OR 16S-R1 PCR-Produktes des Standardserotypen F

Zur anschließenden Sequenzierung wurde das erhaltene PCR-Produkt mittels des Invisorb Spin DNA Extraction Kit gelgereinigt. Hierzu wurde das gesamte PCR-Produkt (25µl) mit 2,5 µl Probenladepuffer vermischt und in die Geltaschen eines 1%igen Agarosegels überführt. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurde die entsprechende Bande auf einem UV-Transilluminator aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Zentrifugengefäß überführt.

Nach Zugabe von 500 µl Gel-Lösungspuffer (Gel Solubilizer S) wurde der Ansatz 10 min bei 50 °C auf einem Schüttel-Thermoblock bis zum vollständigen Lösen der Agarose inkubiert. 250 µl Bindungspuffer (Binding Enhancer) wurden hinzugegeben und das gesamte Reaktionsvolumen wurde auf die Filtersäule überführt und für 1 min bei 10600 x g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl Waschpuffer und einer Zentrifugation für 30 sec bei 15300 x g. Das jeweilige Filtrat wurde verworfen. Nach Entfernung der Waschpufferreste durch hochtourige Zentrifugation (4 min, 20800 x g) wurde die Filtersäule 5 min mit 20 µl Elutionspuffer equilibriert und die DNA durch eine Zentrifugation für 1 min bei 15300 x g aus der Filtersäule eluiert.

Die Sequenzierung des gereinigten PCR-Produktes erfolgte bei einem kommerziellen Sequenzierservice (Agowa GmbH, Berlin) unter Verwendung des Primers OR 16S-F1. Die sich anschließende Homologie-Analyse wurde mittels des Programmes Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang *et al.*, 2000) durchgeführt.

### 3.2.1.5 Serotypisierung

Die Serotypisierung der mittels PCR bestätigten ORT-Isolate wurde unter Verwendung des AGP vorgenommen.

Zunächst wurde eine neue Subkultur des Isolats auf Columbia-Agar angefertigt. Gut bewachsene Platten wurden in 6 ml PBS abgeschwemmt und die Suspension in Reagenzröhrchen überführt. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei ca. 3000 rpm (Umdrehungen/Minute; 1200 x g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und der Bodensatz mit 3 ml PBS resuspendiert und einer erneuten gleichzeitigen Zentrifugation unterzogen. Nach 3maliger Wiederholung des Waschschrilles erfolgte die Resuspension des Sediments in 1,5 ml PBS mit nachfolgender Erhitzung im Wasserbad bei 100 °C für 1 h (Hafez und Sting, 1999).

Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend für 30 min bei ca. 14000 rpm (15800 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß verbracht und als hitzestabiles Antigen im AGP eingesetzt.

In die im Vorfeld gegossenen Basisagar-Gelplatten wurden mittels einer Stanze sieben hexagonal angeordnete Löcher ausgehoben. In die zentrale Vertiefung wurden 25 µl des Antigens, in die peripheren Vertiefungen je 25 µl der antikörperhaltigen Seren der verschiedenen Serotypen verbracht. Die bei Raumtemperatur aufbewahrte Agargelplatte wurde nach 24 h, 48 h und 72 h abgelesen.

### 3.2.1.6 Langzeitlaufbewahrung

Zur Erhaltung der aufgrund der durchgeführten Untersuchungen als ORT identifizierten Isolate wurde frisches Koloniematerial in Drehverschluss-röhrchen, die 1 ml fetales Kälberserum enthielten, suspendiert. Die Röhrchen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Die verbliebene extrahierte DNA der ORT-Stämme aus der molekularbiologischen Untersuchung wurde in Eppendorf-Gefäßen bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.2.2 Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting

Das Fingerprinting wurde unter Verwendung von ERIC-Primern und der core-Sequenz des Phagen M 13 durchgeführt. Die ERIC-Primer binden an repetitive Abschnitte, sogenannte „Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences“, der Primer M 13 bindet zufallsbedingt an unterschiedlichsten Stellen polymorpher DNA. Hieraus ergeben sich zwei verschiedene PCRs (ERIC-PCR und die RAPD-PCR), aus denen Amplikons resultieren, die nach der Gelelektrophorese typische Bandenmuster erzeugen. Obwohl ORT nicht zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehört, wurden die ERIC-Primer

erfolgreich zur Identifizierung eingesetzt (Amonsin *et al.*, 1997; Hafez und Beyer, 1997; Hafez und Hess, 1999; Koga und Zavaleta, 2005; Thachil *et al.*, 2007).

### 3.2.2.1 Vorausgehende Untersuchung

Die für die ERIC-PCR zur Verfügung stehenden Primer **ERIC 1R und ERIC 2** (ERIC 1R: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'; ERIC 2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') sowie der Primer **M 13** (5'- GAG GGT GGC GGT TCT-3') für die RAPD-PCR wurden zunächst auf ihre Fähigkeit zur Differenzierung der ORT-Serotypgruppen B, D, E, G und M getestet. Der Prozess der DNA-Präparation verlief wie unter 3.2.1.3 dargestellt.

Die Vervielfältigung der DNA-Polymorphismen erfolgte mittels PCR. Die jeweiligen Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 25 µl sind in der Tabelle 6 aufgeführt. Zur Durchführung der PCR wurden die PuRe Taq™ Ready-To-Go PCR Beads verwendet. Die Amplifikationsschemata für beide PCR-Assays sind unter Tabelle 7 wiedergegeben.

Die anschließende Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese sowie die Sichtbarmachung und Analyse der Fragmente verlief wie unter 3.2.1.3 beschrieben.

Aufgrund des entstandenen aussagekräftigeren Fragmentmusters unter Verwendung des Primers M 13, wurde dieser für das weitere Fingerprinting ausgewählt sowie das Amplifikationsschema für die RAPD-PCR optimiert.

Tabelle 6: Reaktionsansätze zur Durchführung der ERIC-PCR und der RAPD-PCR unter Verwendung der Ready-To-Go PCR Beads

Primer	ERIC 1R / ERIC 2 (ERIC-PCR)	M 13 (RAPD-PCR)
Primer (Konzentration)	2 µl (50 pmol/µl)	2 µl (25 pmol/µl)
RNA-ase freies Wasser	8 µl	8 µl
Aqua bidest.	10 µl	10 µl
DNA-Probe (max. 1000 ng)	5 µl	5 µl

Tabelle 7: Amplifikationsschemata der ERIC-PCR und der RAPD-PCR (in Anlehnung an Hafez und Beyer, 1997)

Primer	ERIC 1R / ERIC 2 (ERIC -PCR)		M 13 (RAPD-PCR)	
	Dauer	Temperatur	Dauer	Temperatur in
Initiale Denaturierung	4 Minuten	94 °C	4 Minuten	94 °C
	30 Zyklen		25 Zyklen	
Denaturierung	1 Minute	94 °C	1 Minute	94 °C
Annealing	1,5 Minuten	52 °C	1,5 Minuten	40 °C
Extension	1,5 Minuten	72 °C	1,5 Minuten	72 °C
Finale Extension	10 Minuten	72 °C	10 Minuten	72 °C

### 3.2.2.2 Durchführung des Fingerprintings mittels RAPD-PCR

Mit dem Primer M 13 wurden zunächst alle verfügbaren Standardserotypen (Tabelle 2) untersucht. Im weiteren Verlauf wurden deutsche ORT-Isolate, die den Serotypengruppen A, B, C und E angehören, ausgewählt und zusammen mit dem jeweiligen Standardstamm in der RAPD-PCR untersucht. Die Fragmentmuster der Standardstämme wurden mit den Mustern der jeweiligen Feldisolate verglichen.

Als Ausgangsmaterial diente die im Zuge der molekularbiologischen Identifizierung gewonnene und bei -20 °C aufbewahrte DNA der Standardserotypen und Feldisolate.

Zur Durchführung der **PCR** wurden die PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads verwendet. Der 25 µl umfassende Reaktionsansatz bestand aus vorgelegtem Puffer, Nukleotiden, Polymerase sowie 2 µl des gelösten Primers in einer Konzentration von 25 pmol/µl, 5µl DNA (max. 1000 ng) und nukleasefreiem Wasser. Die PCR wurde in einem Thermocycler mit unter den in Tabelle 8 aufgeführten nach Volksbeck (2006) modifizierten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Tabelle 8: Amplifikationsschema der optimierten RAPD-PCR (Volksbeck, 2006)

Schritt	Anzahl der Zyklen	Dauer	Temperatur in °C
Initiale Denaturierung	1	5 Minuten	94
Denaturierung	4	30 Sekunden	94
Annealing		2 Minuten	43
Extension		2 Minuten	72
Denaturierung		20 Sekunden	94
Annealing	30	1 Minute	50
Extension		30 Sekunden	72
Finale Extension		1	5 Minuten

Die **Auftrennung der PCR-Produkte** wurde mittels Gelelektrophorese unter Nutzung eines 1%igen Gels durchgeführt. Als Größenstandards wurden 8 µl des 100 bp-Größenmarkers und 8 µl des 1 kb-Größenmarkers aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief bei 30-50 Volt über 4-5 h ab.

Die **Sichtbarmachung der Fragmentmuster** erfolgte mittels Ethidiumbromid unter Nutzung des Videodokumentationssystems Gel DocXR (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) unter UV-Licht.

### 3.2.2.3 Auswertung

Die weitere Analyse des erhaltenen Bandenmusters wurde anschließend mit der Computer-Software Quantity One® 4.6.1 vorgenommen. Mit Hilfe dieses Programms wurden die Banden einer jeden Laufstrecke detektiert und die Laufstrecken selbst zwecks Normalisierung an dem auf dem Gel mitgeführten Größenstandard ausgerichtet. Zum einen



konnte somit die Größe der einzelnen Fragmente berechnet werden, zum anderen war ein Vergleich der normalisierten und definierten Laufstrecken eines Gels anhand ihres Fragmentmusters möglich. Die Berechnung ihrer genetischen Ähnlichkeit zueinander erfolgte mit Hilfe der distanzbasierten Phylogenieschätzung UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means). Das Ähnlichkeitsprofil wurde in Form von Dendrogrammen veranschaulicht. Aufgrund fehlender technischer Voraussetzungen seitens der Software war es nicht möglich, alle genotypisierten Stämme in einem einzigen Dendrogramm zusammenzufassen. Aus diesem Grund wurde nur das Ähnlichkeitsprofil für jede untersuchte Serotypgruppe dargestellt.

### 3.2.3 Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen

Der Bestimmung der Embryoletalität an Hühnerembryonen wurden die unter 3.1.4 beschriebenen 88 deutschen Isolate unterzogen. Zusätzlich wurden als Referenzisolate die in der Dissertation von Popp (2003) als hoch- bzw. niedrig pathogen bestimmten Isolate GB 168/01/1 (hoch pathogen) und GB 70/94 (niedrig pathogen) in die Untersuchung einbezogen.

#### 3.2.3.1 Vorausgehende Untersuchung

Um die geeignete Inokulationsmenge pro Ei zu definieren, mit der Unterschiede in der Embryoletalität erkennbar werden, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dazu wurden je zehn 11 Tage alte SPF-Hühnerembryonen mit verschiedenen Mengen (250 KBE/Ei, 500 KBE/Ei, 1000 KBE/Ei) der Referenzisolate GB 168/01/1 und GB 70/94 über die Allantoishöhle beimpft und bei 37,6 °C im Eierbrutschrank bebrütet. Nach der achttägigen Beobachtungszeit erreichte nur die Beimpfung mit 1000 KBE/Ei annähernd die von Popp (2003) erzielten Ergebnisse bezüglich der Mortalitätsrate und des Überlebensindex, weshalb diese Infektionsdosis im nachfolgenden Embryoletalitätstest eingesetzt worden ist.

#### 3.2.3.2 Durchführung des Embryoletalitätstests

Die zu verwendenden SPF-Bruteier wurden zunächst für 11 Tage bei einer Temperatur von 37,6 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60% vorbebrütet. Vor der Beimpfung wurden die Eier geschickt. Es wurden nur Eier mit lebenden Embryonen verwendet.

Zur Herstellung einer Bakteriensuspension wurde frisches Koloniematerial in 5 ml PBS überführt. Die Suspension wurde anschließend mittels Densitometer auf den Trübungsstandard McFarland 0,5 eingestellt; dies bedeutet aufgrund von Ergebnissen aus früheren Vorversuchen mit Keimzahlbestimmungen einen Keimgehalt von ca.  $10^7$  KBE/ml.

Von dieser Bakteriensuspension ausgehend wurde eine 1:1000 Verdünnung (nachfolgend *Inokulumsuspension* genannt) hergestellt. Pro zu untersuchendes Isolat wurden 10 Bruteier über die Allantoishöhle mit 0,1 ml der Inokulumsuspension beimpft. In jedem Durchgang wurden unbeimpfte Bruteier sowie Bruteier, die mit 0,1 ml PBS beimpft worden waren, als

Negativkontrolle mitgeführt. Die Löcher in der Kalkschale wurden mit verflüssigtem Paraffin verschlossen und die beimpften Bruteier bei einer Temperatur von 37,6 °C für 8 Tage weiter bebrütet.

Zur Ermittlung der tatsächlichen Infektionsdosis pro Ei wurde die Inokulumsuspension jeden zweiten Isolats 1:100 und 1:1000 verdünnt. Im Doppelansatz wurden Blutplatten mit je 100 µl der beiden Verdünnungen beimpft. Nach der Verteilung der Suspension auf der Oberfläche wurden die Blutplatten für 48 h bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub>-Spannung inkubiert. Anschließend erfolgte die visuelle Zählung der Kolonien und die Berechnung der Keimzahl der Inokulumsuspension. Gleichzeitig wurde damit die Reinheit der Inokulumsuspension überprüft.

### 3.2.3.3 Erfassung und Bewertung der Embryoletalität

Nach der Inokulation wurden die Eier für 8 Tage lang täglich geschickt und nach Ablauf der Inkubationszeit die Anzahl abgestorbener Embryonen pro Isolat erfasst und die Mortalitätsrate berechnet (Wooley *et al.*, 2000). Überlebende Embryonen wurden nach Beendigung der Bebrütungsphase für ca. 24 h bei 4 °C getötet.

In Anlehnung an die Pathogenitätsbestimmung von ORT-Isolaten (Popp, 2003) wurde für jeden Tag die Überlebensrate der Embryonen pro Isolat ermittelt und für alle 8 Tage addiert. Die Summe stellte den Index für die Überlebensrate dar, die - ebenso wie die Mortalitätsrate - für die Bestimmung der Pathogenität eines jeden Isolates genutzt werden konnte.

Für die Bewertung der berechneten Parameter Mortalitätsrate und Überlebensindex im Zusammenhang mit einem Embryoletalitätstest für ORT stand nur der Maßstab von Popp (2003) zur Verfügung. Da die Mortalitätsraten der Isolate aus der Arbeit von Popp (2003) und die der gegenwärtigen Arbeit verglichen werden sollten, wurden die gleichen Kennziffern zur Kategorisierung verwendet (Tabelle 9). Die Einteilung des Überlebensindex wurde jedoch angepasst, da in der vorliegenden Arbeit nur 10 Bruteier pro Isolat verwendet worden sind, der Überlebensindex somit einen Maximalwert von 80 erreichen konnte.

Tabelle 9: Bewertungsmaßstab (in Anlehnung an Popp, 2003)

Mortalitätsrate in %	Überlebensindex	Bewertung der Embryoletalität
> 60	0-30	hoch pathogen
21-60	31-60	mäßig pathogen
0-20	61-80	niedrig pathogen

### 3.2.3.4 Bakteriologische Untersuchung

Von den während der Bebrütungsphase abgestorbenen Embryonen wurde zum Nachweis von ORT bzw. zur Prüfung der Abwesenheit von Fremdkeimen eine bakteriologische Untersuchung der Allantoisflüssigkeit und des Dottersackinhaltes durchgeführt. Ebenso

wurden die Allantoisflüssigkeit und Dottersackinhalt der getöteten Embryonen bakteriologisch untersucht. In beiden Fällen wurde dazu mit einer sterilen Öse nach der Eröffnung des Eis Allantoisflüssigkeit abgenommen und auf Columbia-Agar mit Schafblut ausgestrichen. Zur Entnahme von Dotter wurde der Embryo aus dem Ei entwickelt und der Dottersack mit einer sterilen Schere aufgeschnitten. Die Inkubation der beimpften Columbia-Agarplatten erfolgte unter einer CO<sub>2</sub>-Spannung von ca. 5% bei einer Temperatur von 37 °C für 48 h.

### 3.2.3.5 Auswertung

Da die Messwerte keine Normalverteilung aufwiesen, wurde mit einem nicht-parametrischen Verfahren gearbeitet. Hierbei wurde der H-Test nach Kruskal-Wallis angewendet und damit die Mortalitätsraten und die Überlebensindices auf eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Serotypgruppen geprüft (Nullhypothese). Bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,01$  wird die Nullhypothese als widerlegt angesehen, d. h. die Mortalitätsrate bzw. der Überlebensindex ist nicht gleichmäßig auf die Serotypgruppen verteilt.

### 3.2.4 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmstoffkonzentration ist definiert als die Mindestkonzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, die ein sichtbares Wachstum eines Mikroorganismus in Agar- oder in Bouillon-Dilutions-Empfindlichkeitsprüfungen verhindert (CLSI, 2002). Die Empfindlichkeit eines Erregers liegt vor, wenn seine minimale Hemmkonzentration niedriger ist als der unter therapeutischen Bedingungen *in vivo* erreichbare Wirkstoffspiegel. Ist dagegen die zur Hemmung oder Abtötung erforderliche Wirkstoffkonzentration höher als die *in vivo* realisierbare Konzentration, ist der Erreger resistent (Trollenier, 1999).

Der Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration unterlagen die in 3.1.4 aufgeführten 117 ORT-Feldisolate aus Deutschland (n=88) und Frankreich (n=29).

Um die vom Hersteller garantierte Funktionalität und Qualität der Mikrotiterplatten zu überprüfen, wurden in jedem Testdurchgang je eine mit *E. coli*, ATCC® 25922 bzw. *Staph. aureus*, ATCC® 29213 beimpfte Platte mitgeführt. Als interne Kontrolle wurde der Standardserotyp ORT B (GDD 1261/91) in insgesamt vier Durchgängen in analoger Weise zu den ORT-Isolaten mitgeführt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden die erzielten MHK-Werte für diesen Stamm für jeden der Durchgänge miteinander verglichen.

#### 3.2.4.1 Mikrobouillondilutionsmethode

Die Durchführung der Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der Mikrobouillondilutionsmethode. Diese Methode

stellt ein Verfahren zur Resistenzprüfung von Bakterien in flüssigem Medium auf einer Mikrotiterplatte dar. Die verwendeten Sensititre®-Mikrotiterplatten beinhalteten 94 Vertiefungen, die gefriergetrocknete Chemotherapeutika in verschiedenen Konzentrationen, aufgetragen als zweifache Verdünnungsreihe sowie zwei Vertiefungen für die Wachstumskontrolle, enthielten (Tabelle 10). Die MHK-Bestimmung wurde in enger Anlehnung an die vom CLSI festgelegten Methoden (2002, 2004) sowie in Anlehnung an die Herstelleranweisung durchgeführt.

Tabelle 10: Konzentrationen der eingesetzten Chemotherapeutika

Wirkstoff	Abkürzung	Wirkstoffgehalt (µg/ml)
Penicillin G	PEN	0,06-8
Erythromycin	ERY	0,12-32
Ampicillin	AMP	0,5-64
Ceftiofur	XNL	0,12-16
Enrofloxacin	ENR	0,06-8
Lincomycin	LIN	0,06-8
Tetracyclin	TET	0,12-16
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	SXT	0,25/4,75-16/304
Tiamulin	TIA	0,5-32

### 3.2.4.2 Vorausgehende Untersuchungen

#### ▪ Bestimmung des Lebendkeimgehaltes

Der Mikrobouillondilutionstest erfordert die Verwendung von Keimsuspensionen, die auf eine Trübung entsprechend dem McFarlandStandard 0,5 eingestellt sind.

In früheren Vorversuchen wurden zur Bestimmung des Lebendkeimgehaltes ORT-Suspensionen mittels Densitometer auf einen Trübungsstandard McFarland 0,5 entsprechend, eingestellt. Davon ausgehend wurden dekadische Verdünnungsreihen unter Verwendung von steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung bis zu einer Verdünnung von 1:1.000.000 angefertigt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,1 ml auf zwei Columbia-Agarplatten verbracht, mit einem Drigalskispatel auf der Oberfläche verteilt und für 48 h unter 5% CO<sub>2</sub>-Spannung bei 37 °C inkubiert. Die nach 48 h gewachsenen Kolonien wurden visuell gezählt und die Lebendkeimzahl (KBE/ml) der Ausgangssuspension nach der Formel berechnet:

$$\text{Lebendkeimzahl in KBE/ml} = \frac{\text{Zahl der Kolonien}}{\text{Volumen in ml}} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Lebendkeimgehalt von ORT-Suspensionen entsprechend dem Trübungsstandard McFarland 0,5 liegt größtenteils im Bereich von  $10^7$  KBE/ml.

### ▪ **Inokulationsmedium**

Unter Verwendung der reinen Mueller-Hinton-II-Bouillon als Inokulationsmedium kam es zu keinem Wachstum von ORT in den dafür vorgesehenen Vertiefungen auf der Mikrotiterplatte. Dieses Problem wurde durch den erlaubten Zusatz von lysiertem Pferdeblut zur Mueller-Hinton-II-Bouillon behoben. Für die nachfolgenden MHK-Bestimmungen wurde als Inokulationsmedium ein Gemisch aus Mueller-Hinton-II-Bouillon und lysiertem Pferdeblut verwendet. Der Anteil des Pferdebluts am Gemisch betrug dabei 3%.

### ▪ **Inkubationsdauer**

Laut Herstellerangabe der verwendeten Sensititre®-Mikrotiterplatten beträgt die Inkubationszeit für anspruchslose, schnell wachsende Keime 18-24 h. Da es sich bei ORT um einen anspruchsvollen und langsam wachsenden Keim handelt, musste die Inkubationsdauer der beimpften Mikrotiterplatten bestimmt werden. Es wurden Mikrotiterplatten mit ORT-Suspensionen beimpft und in bestimmten Intervallen die Wachstumskontrollvertiefungen auf Wachstum kontrolliert. Parallel dazu wurden Wachstumskurven der Isolate GGD 1261/91 und GB 65/06/12 erstellt.

Nach einer 24stündigen Inkubation beimpfter Mikrotiterplatten war ein Wachstum in den Kontrollvertiefungen nicht zu beobachten. Dagegen wurden die Wachstumskontrollen nach einer 44stündigen Inkubation als positiv beurteilt. Auch die Ergebnisse aus den Wachstumskurven bestätigten die im Gegensatz zur Herstelleranweisung nötige längere Inkubationsdauer.

### 3.2.4.3 Durchführung der Mikrobouillondilution

#### ▪ Herstellung des Inokulums

Mit einer sterilen Öse wurde frisches Koloniematerial von ORT aufgenommen und in 5 ml einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung suspendiert. Diese *Bakteriensuspension* wurde mit Hilfe des Densitometers auf einen Trübungsstandard 0,5 McFarland entsprechend, eingestellt und wies größtenteils einen Lebendkeimgehalt im Bereich von  $10^7$  KBE/ml auf.

Zur Herstellung der *Inokulumsuspension* (Abbildung 1) wurden 110 µl der Bakteriensuspension in 11 ml Bouillon (bestehend aus 10,67 ml Mueller-Hinton-II-Bouillon + 0,33 ml lysiertes Pferdeblut) überführt und für 30sec mit Hilfe des Vortex gemischt. Die *Inokulumsuspension* wies einen Keimgehalt von ca.  $10^5$  KBE/ml auf.

Zur Herstellung der Inokulumsuspension der Qualitätsstämme (*E. coli*, *Staph. aureus*)

wurden 55 µl der analog hergestellten Bakteriensuspension in 11 ml Mueller-Hinton-II-Bouillon ohne Zusatz von lysiertem Pferdeblut überführt und für 30 sec mit Hilfe des Vortex gemischt. Der Lebendkeimgehalt dieser Inokulumsuspension betrug somit ca.  $1 \times 10^5$  KBE/ml; pro Kavität ca.  $2,5 \times 10^4$  KBE (CLSI, 2002).

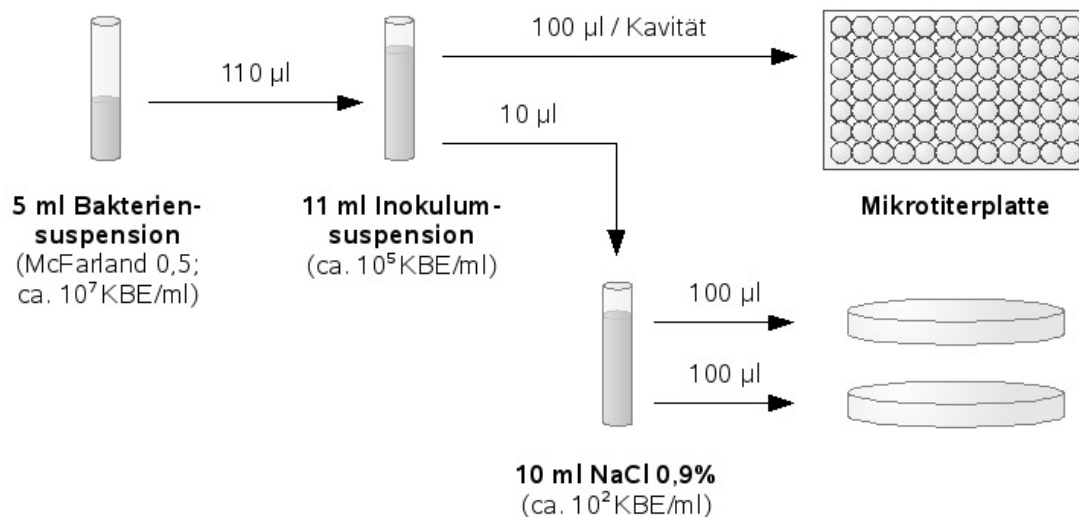


Abbildung 1: Schema der Verwendung der Bakteriensuspension für die Mikrobuillondilutionsmethode von ORT-Isolaten

- **Beimpfung der Mikrotiterplatte**

Gemäß der Herstelleranweisung wurden sowohl von den *ORT-Inokulumsuspensionen* als auch von denen der Qualitätsstämmen 100 µl pro Kavität der bei Raumtemperatur gelagerten Platten gefüllt. Der Keimgehalt einer jeden Vertiefung lag somit im Bereich von ca.  $10^4$  KBE.

- **Versiegelung und Inkubation**

Die mit den ORT-Isolaten beimpften Mikrotiterplatten wurden mit einer vom Hersteller mitgelieferten perforierten Folie verschlossen und in das Anaerobier-System überführt. Die Platten wurden unter 5%  $\text{CO}_2$ -Spannung für mindestens 44 h, maximal 48 h bei 37 °C in einem bakteriologischen Brutschrank inkubiert. Die mit den Qualitätsstämmen beimpften Mikrotiterplatten wurden mit einer nicht perforierten Folie verschlossen und bei einer Temperatur von 37 °C für 24 h inkubiert.

- **Ablesung**

Nach der Inkubation erfolgte die unter Verwendung eines Spiegels durchgeführte visuelle Ablesung der MHK-Werte der untersuchten ORT-Isolate. Das Wachstum der Bakterien stellte sich als eine grob- bis feinkörnige Trübung dar. Kavitäten, in denen kein Wachstum

erfolgte, stellten sich rötlich-braun, klar und durchscheinend dar. Die Ergebnisse wurden auf einem Plattenbelegungsplan in Form von +/- (Wachstum/kein Wachstum) dokumentiert. Ausgewertet wurden nur die Platten, die zwei positive Wachstumskontrollen aufwiesen.

Die mit den Stämmen *E. coli* und *Staph. aureus* beimpften Mikrotiterplatten wurden bereits nach 24stündiger Inkubation abgelesen. Das Wachstum der Bakterien stellte sich als eine weiße, grob- bis feinkörnige Trübung dar. In Vertiefungen, die klar und durchscheinend waren, fand kein Wachstum statt. Es wurden nur Platten mit zwei positiven Wachstumskontrollen ausgewertet; war dies nicht der Fall, so galt der Durchgang als nicht auswertbar.

- Kontaminationskontrolle

Zum Ausschluss einer Kontamination der verimpften *Inokulumsuspensionen* wurde von jeder ein Ausstrich auf Columbia-Agar angefertigt und dieser bei 37 °C für 48 h unter 5% CO<sub>2</sub>-Spannung inkubiert. Wurden neben ORT-Kolonien weitere festgestellt, wurde der Test wiederholt.

- Überprüfung des Lebendkeimgehaltes der Inokulumsuspension

Zur Feststellung des tatsächlichen Lebendkeimgehaltes der ORT-Inokulumsuspension wurde von dieser eine 1:1000 Verdünnung in 10 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung hergestellt und je 100 µl auf zwei Columbia-Agarplatten aufgetropft. Nach der Inkubation bei 37 °C für 48 h unter 5% CO<sub>2</sub>-Spannung wurden die Kolonien gezählt und der Lebendkeimgehalt der Inokulumsuspension wurde berechnet (Abbildung 1).

### 3.2.4.4 Auswertung

Da für ORT keine Grenzwerte (Breakpoints) zur Klassifizierung der Isolate in resistent, intermediär bzw. sensibel existieren, wurden die MHK-Werte zunächst für jedes Isolat erfasst und die MHK<sub>50</sub> bzw. MHK<sub>90</sub> als Kriterien für die derzeitige Resistenzlage berechnet. Der MHK<sub>50</sub>-bzw. MHK<sub>90</sub>-Wert bezeichnen dabei die Konzentration der getesteten Wirkstoffe, bei denen mindestens 50% bzw. 90% der untersuchten Isolate in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Im weiteren Verlauf wurden die Minimal- und Maximalwerte sowie die Modalwerte (häufigster aufgetretener MHK-Wert in einer Untersuchungsreihe) der erzielten MHK-Werte, getrennt nach Ländern dargestellt, um Anhaltspunkte für die Resistenzlage und einen Überblick über die Streuung der MHK-Werte zu erhalten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung und Charakterisierung des Erregers

#### 4.1.1 Isolierung

Unter den auf Columbia-Agarplatten kultivierten Isolaten traten Unterschiede in der Koloniemorphologie auf. Die Vielzahl der Isolate zeigte runde, glatte, opaque, nicht hämolysierende und ca. 2-3 mm im Durchmesser große Kolonien. Daneben existierten auch Stämme, deren Koloniedurchmesser ca. 1 mm betrug und deren Kolonien nahezu farblos wirkten.

Mit der Gramfärbung aller Isolate erfolgte die Zuordnung zu den gramnegativen Stäbchenbakterien, die sich als sehr pleomorph darstellten.

#### 4.1.2 Biochemische Identifizierung

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungsmethoden zur Identifizierung von ORT, die den Oxidase-Test zur Prüfung auf das Vorhandensein des Enzyms Cytochromoxidase und die Anwendung der biochemischen Testreihe **API NE 20** zur Erstellung eines charakteristischen Identifizierungsprofils beinhalteten, sind im Anhang (Tabelle 34) aufgelistet. Alle untersuchten Isolate zeigten hinsichtlich der Produktion des für das Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase eine positive Reaktion.

Bei 12 (13,64%) der *deutschen Isolate* wurde zusätzlich zur Cytochromoxidase- auch Urease-Aktivität nachgewiesen (0-2-2-0-0-4). Die Vielzahl (68; 77,27%) der deutschen Isolate wies das Reaktionsprofil 0-0-2-0-0-4 auf; hier wurde Cytochromoxidase-Aktivität festgestellt. Für 8 (9,09%) der Isolate wurde das Identifizierungsprofil 0-0-2-0-0-0 ermittelt; hier wurde weder Cytochromoxidase- noch Urease-Aktivität nachgewiesen. Dagegen gelang bei allen *französischen Stämme* der Nachweis des Enzyms Cytochromoxidase, bei einem wurde sogar zusätzlich Urease-Aktivität festgestellt. Somit ergab sich für 28 von 29 Isolaten (96,55%) das Identifizierungsprofil 0-0-2-0-0-4, für 1 (3,45%) das Identifizierungsprofil 0-2-2-0-0-4 (Tabelle 11).



Tabelle 11: Ergebnisse der biochemischen Identifizierung mittels Cytochromoxidase-Test und API 20 NE

	Identifizierungsprofil	Anzahl der Isolate	
		Deutschland (n=88)	Frankreich (n=29)
Urease-Aktivität + β-Galaktosidase-Aktivität + Cytochromoxidase-Aktivität +	0-2-2-0-0-0-4	12 (13,64%)	1 (3,45%)
Urease-Aktivität - β-Galaktosidase-Aktivität + Cytochromoxidase-Aktivität +	0-0-2-0-0-0-4	68 (77,27%)	28 (96,55%)
Urease-Aktivität - β-Galaktosidase-Aktivität + Cytochromoxidase-Aktivität -	0-0-2-0-0-0-0	8 (9,09%)	-

#### 4.1.3 Molekularbiologische Identifizierung

Zur weiteren Identifizierung wurden alle zur Verfügung stehenden Feldisolate zusätzlich in der PCR untersucht.

Die *Spezifitätsprüfung* der verwendeten Primer OR 16S-F1/OR 16S-R1 erfolgte mit DNA der Bakterien *Pasteurella avium*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *E. coli* und *Aeromonas laidlawii*. Außer bei ORT konnte das erwartete 784 bp große Fragment bei keinem anderen Bakterium detektiert werden (Abbildung 2). Ebenso gelang mit diesem Primerpaar die Erfassung aller verfügbaren ORT-Standardserotypen (A-Q). Auffällig war die schwächer ausgeprägte Bande des Standardserotypen F (Abbildung 3). Eine daraufhin durchgeführte Sequenzanalyse von ca. 630 bp innerhalb des amplifizierten Bereiches ergab jedoch eine Nukleotidhomologie von 97% bis 99% zu verschiedenen ORT-Stämmen, was eine eindeutige Identifizierung als ORT ermöglichte.

Die *Sensitivitätsprüfung* erfolgte mittels einer dekadischen Verdünnungsreihe von Standardserotyp ORT A mit bekannter Keimdichte. Ausgehend von einer Bakteriensuspension mit einer berechneten Keimdichte von  $2,6 \times 10^9$  KBE/ml lag die unterste Nachweisgrenze bei 260 KBE/ml (Abbildung 4).

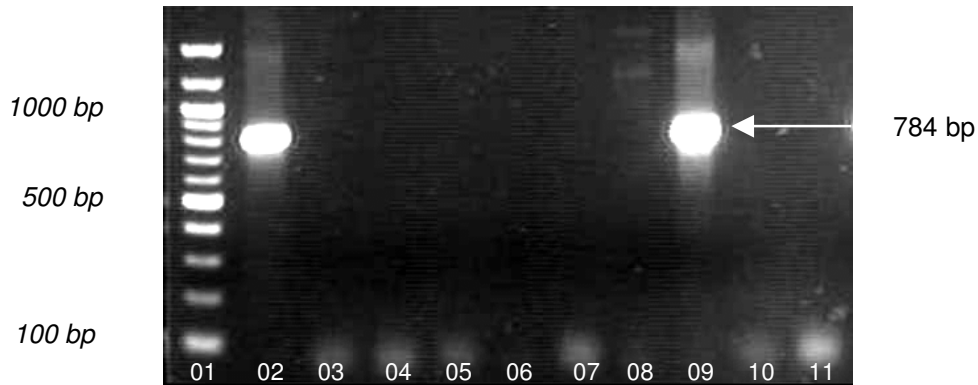


Abbildung 2: Spezifitätsprüfung mit dem Primerpaar OR 16S-F1/OR 16S-R1

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Positivkontrolle Standard ORT B (GGD 1261/91); Spur 03: *Pasteurella avium*; Spur 04: *Pasteurella gallinarum*;

Spur 05: *Pasteurella multocida*, Spur 06: *Pseudomonas aeruginosa*;  
Spur 07: *Salmonella sp.*, Spur 08: *E. coli*; Spur 09: Standard ORT A; Spur 10: *Aeromonas laidlawii*; Spur 11: Negativkontrolle

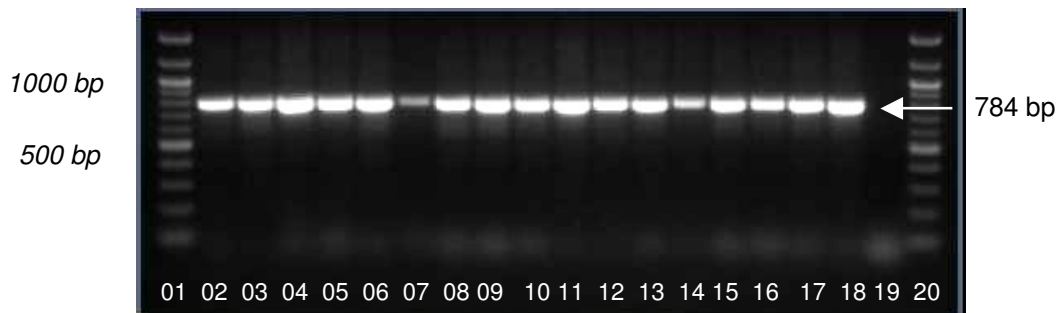


Abbildung 3: Nachweis des Amplifikates mit einer Größe von 784 bp bei den

ORT-Standardserotypen mit dem Primerpaar OR 16S-F1/OR 16S-R1

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Standard ORT A; Spur 03: Standard ORT B; Spur 04: Standard ORT C; Spur 05: Standard ORT D; Spur 06: Standard ORT E; Spur 07: Standard ORT F; Spur 08: Standard ORT G; Spur 09: Standard ORT H; Spur 10: Standard ORT I; Spur 11: Standard ORT J; Spur 12: Standard ORT K; Spur 13: Standard ORT L; Spur 14: Standard ORT M; Spur 15: Standard ORT N; Spur 16: Standard ORT O; Spur 17: Standard ORT P; Spur 18: Standard ORT Q; Spur 19: Präperationskontrolle; Spur 20: Marker (100 bp)

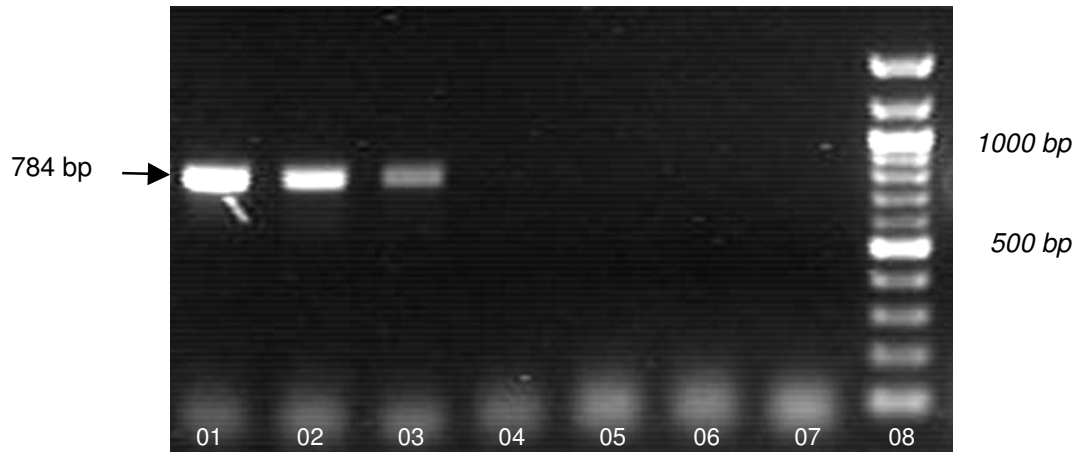


Abbildung 4: Sensitivitätsprüfung ausgehend von einer Bakteriensuspension des Standards ORT A mit dem Primerpaar OR 16S-F1 / OR 16S-R1

Spur 01:  $2,6 \times 10^4$  KBE/ml, Spur 02:  $2,6 \times 10^3$  KBE/ml, Spur 03:  $2,6 \times 10^2$  KBE/ml, Spur 04:  $2,6 \times 10^1$  KBE/ml, Spur 05:  $2,6 \times 10^0$  KBE/ml; Spur 06: Präperationskontrolle; Spur 07: Negativkontrolle; Spur 08: Marker (100 bp)

Mit der im Anschluss durchgeführten molekularbiologischen Untersuchung aller ORT-verdächtigen Isolate wurde das ca. 784 bp große Fragment bei allen Isolaten nachgewiesen (Abbildung 5) und die Ergebnisse der bisherigen bakteriologischen Untersuchungen damit bestätigt.

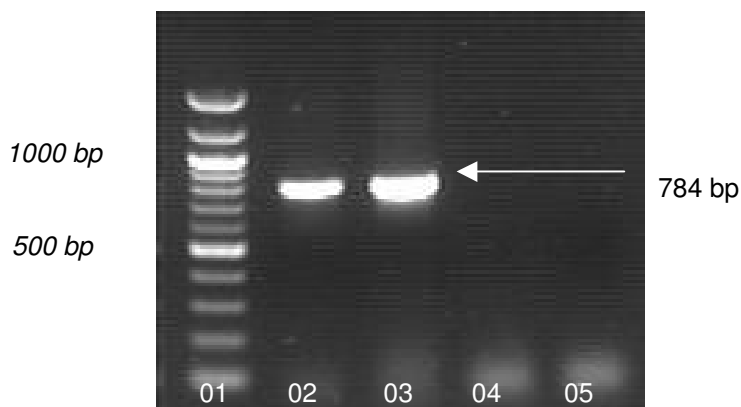


Abbildung 5: Untersuchung eines ORT-Feldisolates mittels PCR unter Nutzung des Primerpaares OR16 S-F 1/OR16 S-R 1

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Positivkontrolle Standard ORT B (GGD 1261/91); Spur 03: GB 271/06; Spur 04: Präperationskontrolle; Spur 05: Negativkontrolle

#### 4.1.4 Serotypisierung

Die Ergebnisse der Serotypisierung mittels AGP aller als ORT identifizierten Isolate sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Unter den 88 Isolaten deutscher Herkunft konnten 32 (36,4%) dem Serotyp A, 12 (13,6%) dem Serotyp B, 13 (14,8%) dem Serotyp C, 4 (4,6%) dem Serotyp D, 5 (5,7%) dem Serotyp E, 1 (1,1%) dem Serotyp H, 4 (4,6%) dem Serotyp I und 5 (5,7%) dem Serotyp J zugeordnet werden. Kreuzreaktionen traten bei 12 (13,6%) der untersuchten Isolate auf. Von den 29 französischen Isolaten ließen sich 17 (58,6%) dem Serotyp A, 3 (10,3%) dem Serotyp C, 3 (10,3%) dem Serotyp I und 3 (10,3%) dem Serotyp J zuordnen. Insgesamt traten bei 3 Isolaten (10,3%) Kreuzreaktionen auf.

Tabelle 12: Ergebnisse der Serotypisierung der deutschen und französischen Isolate

	Serotyp	Anzahl der Isolate
<b>Deutschland</b> (n=88)	A	32 (36,4%)
	B	12 (13,6%)
	C	13 (14,8%)
	D	4 (4,6%)
	E	5 (5,7%)
	H	1 (1,1%)
	I	4 (4,6%)
	J	5 (5,7%)
	sonstige*	12 (13,6%)
<b>Frankreich</b> (n=29)	A	17 (58,6%)
	C	3 (10,3%)
	I	3 (10,3%)
	J	3 (10,3%)
	sonstige*	3 (10,3%)

\* Isolate, die Kreuzreaktionen aufwiesen

## 4.2 Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting

In einer vorausgehenden Untersuchung wurden die Primer ERIC 1R und ERIC 2 (ERIC-PCR) sowie der Primer M 13 (RAPD-PCR) auf ihre Fähigkeit zur Differenzierung einzelner ORT-Serotypgruppen untersucht. Die Untersuchung aller ORT-Standardstämme sowie ausgewählter ORT-Feldisolate wurde anschließend unter Verwendung der ausgewählten und optimierten Methode durchgeführt.

### 4.2.1 Vorausgehende Untersuchung

Die Standardstämme ORT B, D, E, G und M zeigten in Verbindung mit der ERIC-PCR das unter Abbildung 6 dargestellte Bandenmuster. Fragmente mit einer Größe von 82-88 bp traten bei allen Stämmen auf. Sichtbare Fragmente von einer ungefähren Größe von 1243-1262 bp traten bei den Standardstämmen D, E und G auf; beim Standardstamm M trat nur ein deutliches Fragment (Größe ca. 974 bp) auf. Die unter Tabelle 13 aufgeführten

berechneten Fragmente waren bis auf die oben genannten auf der Abbildung nicht deutlich sichtbar.

Für die Standardstämme ergab sich unter Anwendung des Primers M 13 ein differenzierteres Fragmentmuster (Abbildung 7) als für die ERIC-PCR. Sehr deutliche Fragmente von einer Größe von ca. 1200 bp bzw. 814 bp wurden für die Standardstämme D bzw. M ermittelt. Obwohl nicht alle errechneten Fragmente (Tabelle 14) auf der Abbildung erkennbar waren, ließen sich für die Standardstämme D, E und M jedoch unterschiedliche Fragmentmuster feststellen. Mit Fragmenten von 382 bzw. 370 bp, 793 bzw. 773 bp und 1153 bzw. 1117 bp wiesen die Standardstämme B und G ein sehr ähnliches Muster auf.

Eine weitgehende Differenzierung der einzelnen Serotypen war unter Nutzung des Primers M 13 festzustellen. Aufgrund dessen wurde dieser für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt und die Amplifikationsbedingungen optimiert.

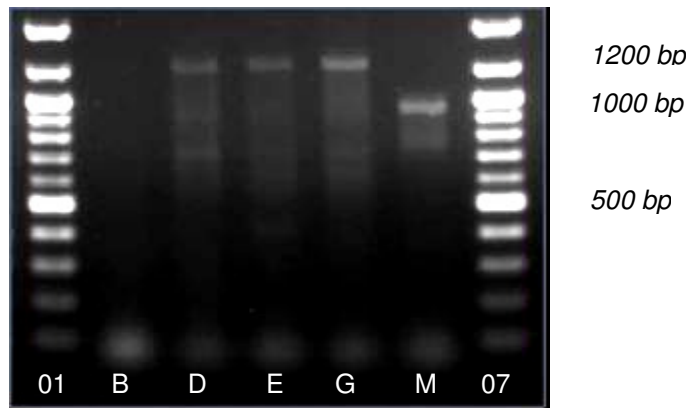


Abbildung 6: Fragment-Muster der Standardserotypen ORT B, D, E, G und M erhalten durch Amplifizierung mit dem Primer ERIC 1R und ERIC 2 (ERIC-PCR)  
Spur 01: Marker (100 bp); Spur 07: Marker (100 bp)

Tabelle 13: Software-unterstützte Berechnung der erhaltenen Fragmentgrößen (bp) der ERIC-PCR der ORT-Standardserotypen B, D, E, G und M

Standard B	Standard D	Standard E	Standard G	Standard M
1262*	1243	1262	1262	
1000*			1050*	
	932*	974*		974
				814*
	735*	742*	742*	
		648*	654*	
		421*		
88	84	82	82	84

\*berechnete, aber in Abbildung 6 nicht deutlich sichtbare Fragmente

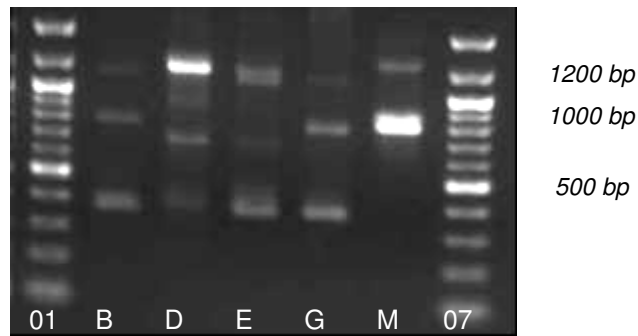


Abbildung 7: Fragment-Muster der Standardserotypen ORT B, D, E, G und M erhalten durch Amplifizierung mit dem Primer M 13 (RAPD-PCR)  
 Spur 01: Marker (100 bp); Spur 07: Marker (100 bp)

Tabelle 14: Software-unterstützte Berechnung der erhaltenen Fragmentgrößen (bp) der RAPD-PCR

Standard B	Standard D	Standard E	Standard G	Standard M
2232*			2029*	
				1531*
	1200			1271
1153		1121, 1171	1117	
	932	948*		
				814
793			773	
	687	675		
	400			
382		370	370	

\* berechnete, aber in Abbildung 7 nicht deutlich sichtbare Fragmente

#### 4.2.2 RAPD-PCR mit allen ORT-Standardstämmen

Die genomische DNA aller verfügbaren Standardstämmen (A-Q) wurde mittels RAPD-PCR untersucht. Das Fragmentmuster nach erfolgter Gelelektrophorese ist unter Abbildung 8 dargestellt. Differenzierbare Bandenmuster der Standardstämmen ORT A, B, D, E, F, G, I, K, M und O waren sowohl anhand des Fragmentmusters als auch anhand der berechneten Fragmente (Tabelle 15) erkennbar.

Die verbleibenden Standardstämmen ORT C, H, J, L, N, P und Q wiesen untereinander ähnliche Muster auf. So stellten sich die Muster der Standards **ORT C, ORT H und ORT Q** als fast identisch dar (Tabelle 16). Ein Fragment mit einer Größe von ca. 429 bp kam nur beim Referenzstamm ORT C, ein Fragment von 3512 bzw. 3586 bp dagegen bei den Referenzstämmen ORT H bzw. ORT Q vor. Ein nahezu identisches Fragmentmuster ließ

sich bei den Standardstämmen **ORT J** und **ORT L** beobachten. Die für den Standard **ORT J** berechneten sechs Fragmente wurden beim Standard **ORT L** in gleicher Anzahl und in der gleichen Größenordnung nachgewiesen (Tabelle 17). Der gleiche Sachverhalt traf für die Standards **ORT N und ORT P** zu (Tabelle 18). Im Bandenmuster des Standards **ORT D** wurde in der vorausgehenden Untersuchung ein ca. 400 bp großes Fragment dargestellt (Abbildung 7). Dieses Fragment wurde in der Untersuchung aller Standardstämmen unter dem optimierten Amplifikationsschema nicht mehr beobachtet (Abbildung 8). Umgekehrt war ein Fragment von ca. 400 bp im Muster des Standards **ORT M** in der vorausgehenden Untersuchung nicht detektierbar; nach Optimierung der Amplifikationsbedingungen stellte es sich als schwache Bande dar (Abbildung 8).

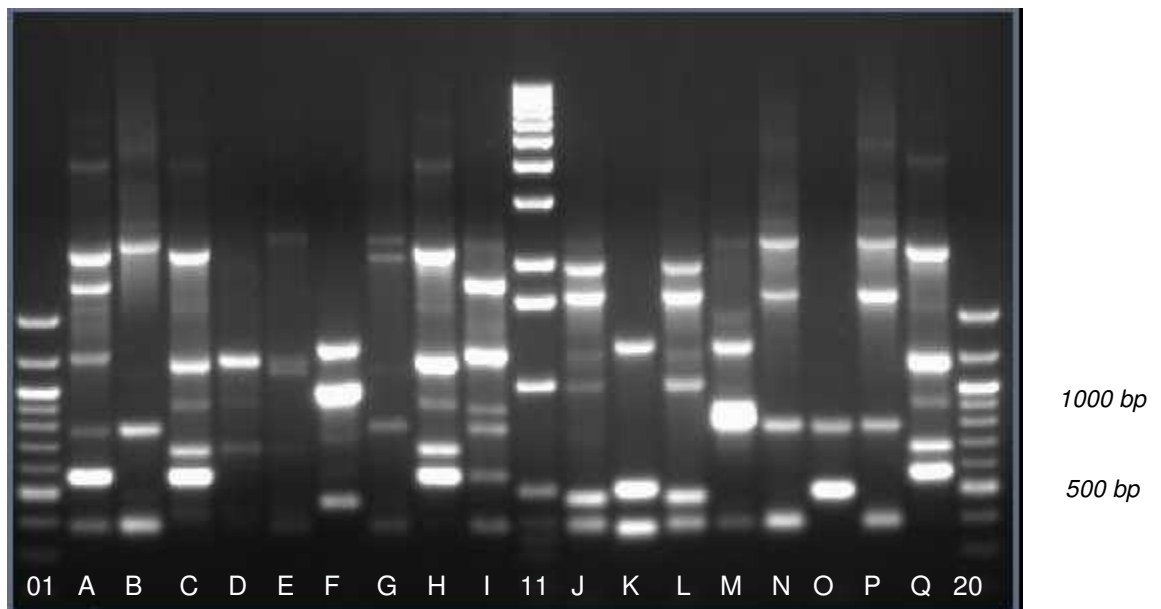


Abbildung 8: Fragment-Muster aller Standardserotypen A-Q erhalten durch Amplifizierung mit dem Primer M 13 (RAPD-PCR)

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 11: Marker (1 kb); Spur 20: Marker (100 bp)

## Ergebnisse

Tabelle 15: Software-unterstützte Berechnung der erhaltenen Fragmentgrößen (bp) der ORT-Standardstämme A-Q

ORT A	ORT B	ORT C	ORT D	ORT E	ORT F	ORT G	ORT H	ORT I	ORT J	ORT K	ORT L	ORT M	ORT N	ORT O	ORT P	ORT Q
3487							3512									3586
	2530												2513		2530	
				2343		2327										
	2232							2232					2279		2279	
2096		2110				2125	2125		2170			2010				2155
									1982		1996					
								1823								
1798									1712		1712		1736		1724	
1608		1688*					1665									1665
1500*												1531				
										1304		1304				
1233			1216		1277			1251	1251		1260					1208
	1153*	1171		1181		1162	1190									
									1048		1057					
		924	957	991*	991		940	900								948
						800						860	800		807	
773	780			700	760			786						793		705
		681	693		656*		687									
561		566					571	571		514				514		588
		429			470				480		485	400	404		408	
388	391			391		391		388	391	384	395					

\*berechnete, aber in Abbildung 8 nicht deutlich sichtbare Fragmente; **fett**: Standardstämme mit differenzierbaren Fragmentmustern



Tabelle 16: Vergleich der ORT-Standardstämme C, H und Q anhand der berechneten Fragmentgrößen (bp)

Standard ORT C	Standard ORT H	Standard ORT Q
	3512	3586
2110	2125	2155
1688	1665	1665
1171	1190	1208
924	940	948
681	687	705
566	571	588
429		

Tabelle 17: Vergleich der ORT-Standardstämme J und L anhand der berechneten Fragmentgrößen (bp)

Standard ORT J	Standard ORT L
1982	1996
1712	1712
1251	1260
1048	1057
480	485
391	395

Tabelle 18: Vergleich der ORT-Standardstämme N und P anhand der berechneten Fragmentgrößen (bp)

Standard ORT N	Standard ORT P
2513	2530
2279	2279
1736	1724
800	807
404	408

#### 4.2.3 Untersuchungen an ORT-Feldisolaten

Wird die anhand des AGPs ermittelte Serotypverteilung innerhalb der 88 deutschen Isolate herangezogen, so wird deutlich, dass 70,5% dieser Isolate den Serotypgruppen A, B, C oder E angehören. Aufgrund der häufigen Isolierung dieser Serotypen wurden innerhalb dieser Serotypgruppen Feldisolate zufällig ausgewählt und in das Fingerprinting einbezogen.

Hinsichtlich des Fragmentmusters zeigte der jeweilige mitgeführte Standardstamm für alle untersuchten Serotypen ein zu der initialen Untersuchung ähnlich reproduzierbares Ergebnis.

4.2.3.1 Feldisolate des Serotyps A

Die berechneten Fragmentgrößen der fünf untersuchten Feldisolate dieses Serotyps sind unter Tabelle 19 aufgeführt. Ein in der initialen Untersuchung (Tabelle 15) berechnetes, aber nicht deutlich sichtbares Fragment mit einer Größe von ca. 1500 bp wurde nicht ermittelt. Es traten Fragmente von ca. 1639 bp und 1256 bp auf. Leichte Abweichungen der verbleibenden Fragmentgrößen des Standardstammes ORT A im Vergleich zur initialen Untersuchung ließen sich auf die nicht exakt durchführbaren Berechnungen zurückführen.

Das Fragmentmuster (Abbildung 9) des Standardstammes ORT A (ORT-A Muster I) wurde auch bei den fünf anderen untersuchten, im AGP als Serotyp A charakterisierten Feldisolaten erzielt. Allerdings trat beim Standardstamm ORT A ein zusätzliches Fragment von ca. 1830 bp auf. Im erstellten Dendrogramm (Abbildung 10) wurde eine genetische Ähnlichkeit zwischen dem Standardstamm ORT A und den Feldisolaten von 79% ermittelt.

Mit einer genetischen Ähnlichkeit von 91% bis 97% wiesen die Feldisolate untereinander ein einheitliches Bandenmuster auf.

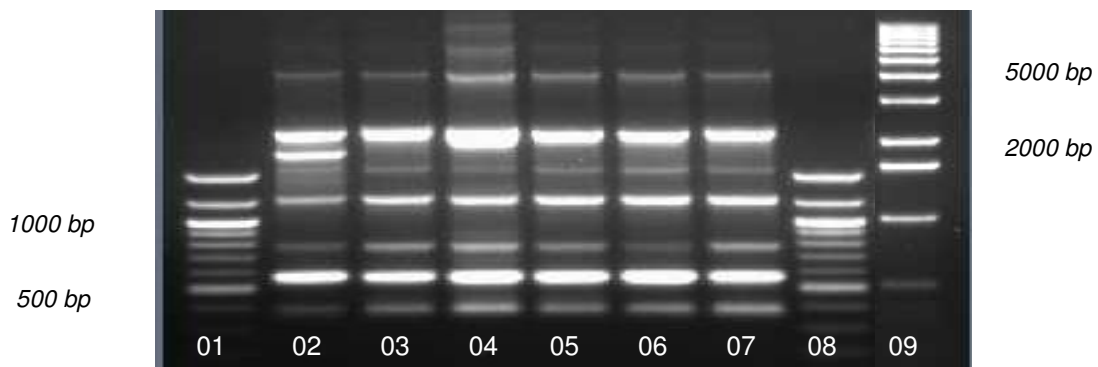


Abbildung 9: Fragment-Muster von Feldisolaten des Serotyps A erhalten durch Amplifizierung mit Primer M 13 (RAPD-PCR)

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Standard ORT A; Spur 03: GB 114/06/4; Spur 04: GB 1233/05; Spur 05:GB 1317/05/3; Spur 06: GB 1527/05/1; Spur 07: GB 1685/05/4; Spur 08: Marker (100 bp); Spur 09: Marker (1 kb)

Tabelle 19: Berechnete Fragmentgrößen (bp) von Feldisolaten des Serotyps A

Serotyp A (B3263/91)	GB 114/06/4	GB 1233/05	GB 1317/05/3	GB 1527/05/1	GB 1685/05/4
3673	3649	3528	3569	3546	3556
2158	2189	2102	2131	2122	2133
1830					
1639	1634	1644	1610	1605	1601
1256	1254	1241	1238	1236	1234
783	782	780	778	777	775
566	571	563	568	567	566
392	396	400	399	397	390
Muster I	Muster II				

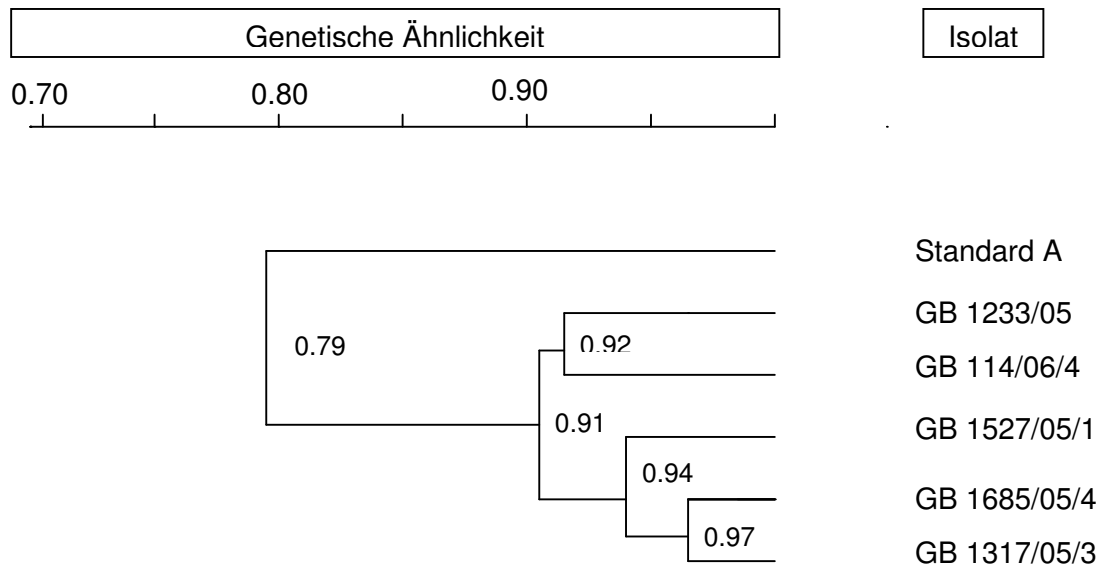


Abbildung 10: Dendrogramm von Feldisolaten des Serotyps A im Vergleich mit dem Standardstamm ORT A

#### 4.2.3.2 Feldisolate des Serotyps B

Die Fragmentmuster der vier untersuchten Feldisolate des Serotyps B und des Standardstammes ORT B sind unter Abbildung 11 dargestellt. Im Vergleich zu bereits durchgeführten Untersuchungen stellte sich das Fragmentmuster des Standardstammes ORT B sehr ähnlich dar. Bei der Berechnung der Fragmentgrößen traten Abweichungen auf, die sich auf die Software zurückführen ließen.

Beim Vergleich des Standardstammes ORT B mit den Feldisolaten traten nur zwei Fragmente in der ungefähren Größenordnung von 400 bp bzw. 800 bp in allen Mustern auf (Abbildung 11). Dies bestätigte sich mit Berechnung der Bandengrößen (Tabelle 20). Auch im zugehörigen Dendrogramm (Abbildung 12) wurde eine genetische Ähnlichkeit zwischen dem Standardstamm und den Feldisolaten von nur 10% ermittelt.

Neben dem ORT-B Muster I des Standardstammes führte die Verteilung der einzelnen Fragmente innerhalb der Feldisolate zur Erstellung weiterer Muster: so wurden die Isolate GB 1640/05, GB 144/06 und GB 157/06 dem ORT-B Muster II zugeordnet; das Isolat GB 114/06/6 bildete aufgrund des fehlenden Fragments im Größenbereich von ca. 3750 bp das ORT-B Muster III und wies zu den verbleibenden Isolaten GB 1640/05, GB 144/06 und GB 157/06 eine genetische Ähnlichkeit von 66% auf.

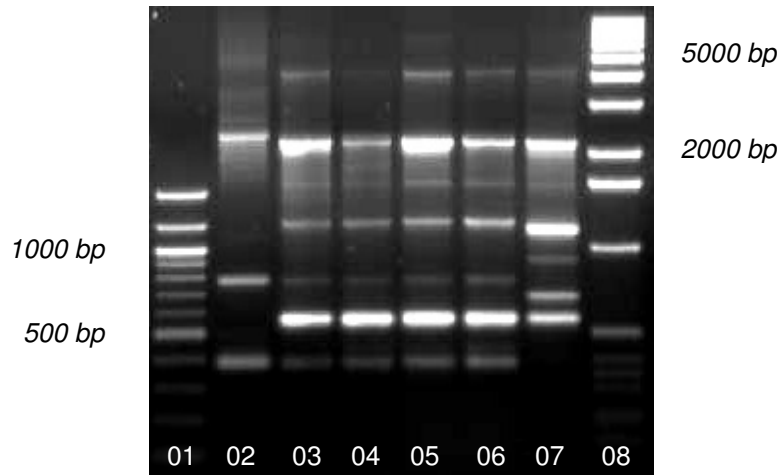


Abbildung 11: Fragment-Muster von Feldisolaten des Serotyps B erhalten durch Amplifizierung mit Primer M 13 (RAPD-PCR)

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Standard ORT B; Spur 03: GB 1640/05; Spur 04: GB 114/06/6; Spur 05: GB 144/06; Spur 06: GB 157/06; Spur 07: Standard ORT H; Spur 08: Marker (1 kb)

Tabelle 20: Berechnete Fragmentgrößen (bp) von Feldisolaten des Serotyps B

Serotyp B (GGD 1261/91)	GB 1640/05	GB 114/06/6	GB 144/06	GB 157/06
4145*				
	3754*		3754*	3816*
3261*				
2719*				
2422				
	2286	2324	2305	2324
	1769*	1784*	1784*	1769*
	1336	1347	1358	1347
862	862*	862*	871*	871*
	618	618	625	625
422	418	422	422	422
Muster I	Muster II	Muster III	Muster II	Muster II

\* berechnete, aber in Abbildung 11 nicht deutlich sichtbare Fragmente

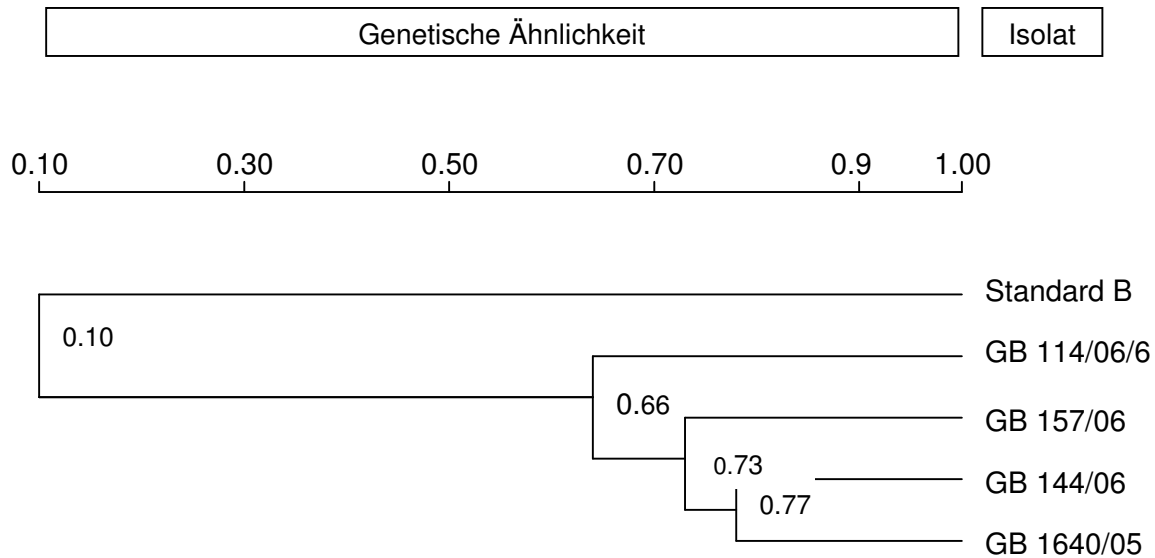


Abbildung 12: Dendrogramm von Feldisolaten des Serotyps B im Vergleich zum Standardstamm ORT B

#### 4.2.3.3 Feldisolate des Serotyps C

Beim visuellen Vergleich der Fragmentmuster der sieben Feldisolate des Serotyps C unter Abbildung 13 wurden Übereinstimmungen festgestellt: die Isolate GB 114/06/2, GB 114/06/3, GB 1685/05/1 und GB 1413/05/91 wiesen ein nahezu übereinstimmendes Muster auf. Zu den sich gleichenden Mustern der Isolate GB 1413/05/24 und GB 1413/05/37 wies das Muster des Isolates GB 1413/05/66 bis auf die fehlende Bande im Bereich von ca. 1150 bp eine große Übereinstimmung auf.

Bei Betrachtung der berechneten Fragmentgrößen (Tabelle 21) konnten jedoch innerhalb der Feldisolate vier verschiedene Bandenmuster detektiert werden. Das Fragment mit der ungefähren Größe von 400 bp war bei allen untersuchten Isolaten nachweisbar. Ebenso konnte eine Bande im Bereich von 1129-1187 bp bei allen Isolaten, außer GB 1413/05/66, nachgewiesen werden.

Auffällig waren die bei den Feldisolaten auftretenden zwei Doppelbanden im Bereich von 678-775 bp und 1129-1300 bp, die beim Standardstamm jeweils nur einzeln auftraten. Die in Form des Dendrogramms (Abbildung 14) dargestellte genetische Ähnlichkeit der Feldisolate in Bezug zum Standardstamm ORT C betrug 13%. Innerhalb der Feldisolate wurde die größte Ähnlichkeit zwischen den Isolaten GB 1413/05/66 und GB 1413/05/37 mit 79% ermittelt. Die verbliebenen Isolate wiesen untereinander Übereinstimmungen im Bereich von 45% bis 73% auf.

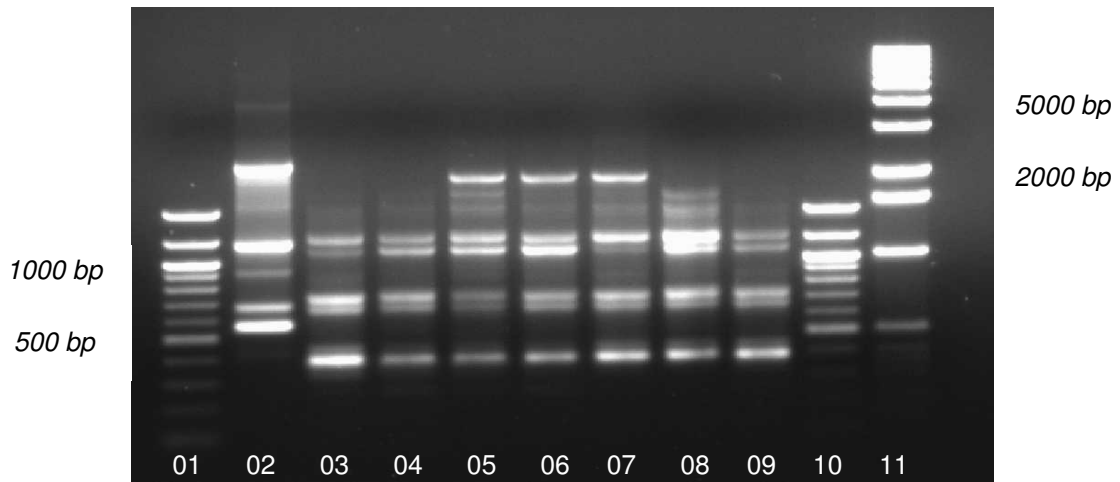


Abbildung 13: Fragment-Muster von Feldisolaten des Serotyps C erhalten durch Amplifizierung mit Primer M 13 (RAPD-PCR)

Spur 01: Marker (100 bp); Spur 02: Standard ORT C; Spur 03: GB 114/06/2; Spur 04: GB 114/06/3; Spur 05: GB 1413/05/24; Spur 06: GB 1413/05/37; Spur 07: GB 1413/05/66; Spur 08: GB 1413/05/91; Spur 09: GB 1685/05/1; Spur 10: Marker (100 bp); Spur 11: Marker (1 kb)

Tabelle 21: Berechnete Fragmentgrößen (bp) von Feldisolaten des Serotyps C

Serotyp C (K 91-201)	GB 114/06/2	GB 114/06/3	GB 1413/05/24	GB 1413/05/37	GB 1413/05/66	GB 1413/05/91	GB 1685/05/1
2105			2031	2031	2050		
			1809*			1777*	
1670*					1611*		
	1527*		1596*			1554*	
	1243	1254	1266	1254	1277	1277	1300
1187	1129	1140	1152	1152		1175	1187
938					928*		
	729	744	759	700, 752	700, 759	775	721, 775
685	678	692	692				
571							
	404	409	413	418	422	427	432
Muster I	Muster II		Muster III	Muster IV	Muster V	Muster VI	

\* berechnete, aber in Abbildung 13 nicht deutlich sichtbare Fragmente

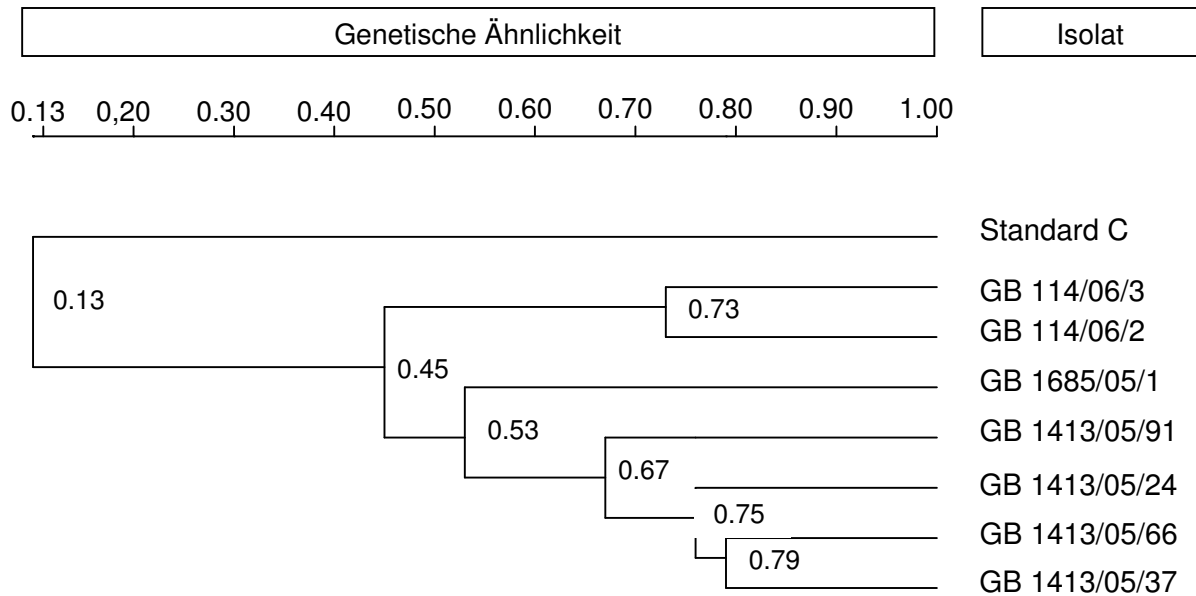


Abbildung 14: Dendrogramm von Feldisolaten des Serotyps C im Vergleich zum Standardstamm ORT C

#### 4.2.3.4 Feldisolate des Serotyps E

Es wurden fünf Isolate des Serotyps E untersucht. Im Vergleich zwischen den Bandenmustern des Standardstammes ORT E und den Feldisolaten wurde deutlich, dass allen Isolaten nur ein im Durchschnitt 387 bp großes Fragment gemein war. Alle anderen Fragmente des Standardstammes ORT E waren nicht bei allen Feldisolaten vorhanden bzw. wiesen die Feldisolate Banden auf, die nicht beim Standardstamm nachzuweisen waren.

Unter den Feldisolaten konnten anhand des Bandenprofils (Abbildung 15) und der mittels Software berechneten Fragmentgrößen (Tabelle 22) vier Muster festgestellt werden. Die Vielfältigkeit innerhalb der Feldisolate drückte sich auch in der genetischen Ähnlichkeit im Dendrogramm (Abbildung 16) mit Werten zwischen 50% und 74% aus. In Bezug auf den Standard ORT E wurde eine Ähnlichkeit von 27% ermittelt.

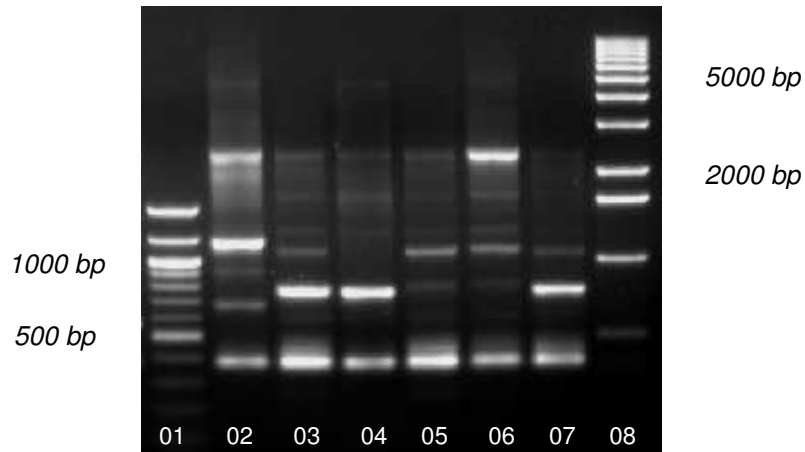


Abbildung 15: Fragment-Muster von Feldisolaten des Serotyps E erhalten durch Amplifizierung mit Primer M 13 (RAPD-PCR)  
 Spur 01: Marker (100 bp), Spur 02: Standard ORT E, Spur 03: GB 224/06;  
 Spur 04: GB 271/06, Spur 05: GB 58/06/1, Spur 06: GB 82/06, Spur 07: GB 114/06/8, Spur 08: Marker (1 kb)

Tabelle 22: Berechnete Fragmentgrößen (bp) von Feldisolaten des Serotyps E

Serotyp E (O-95029 nr.16279)	GB 224/06	GB 271/06/	GB 58/06/1	GB 82/06	GB 114/06/8
2241	2261*	2105*	2261*	2261	
	1684*	1669*	1699*	1714*	
				1568*	
	1300*		1300*	1312*	
1175	1106		1106	1140	1117
924					
	765	756	800*	826*	782
677	627*		606*	620*	
			441*		452*
383	383	378	383	394	400
Muster I	Muster II	Muster V	Muster III	Muster II	Muster IV

\* berechnete, aber in Abbildung 15 nicht deutlich sichtbare Fragmente



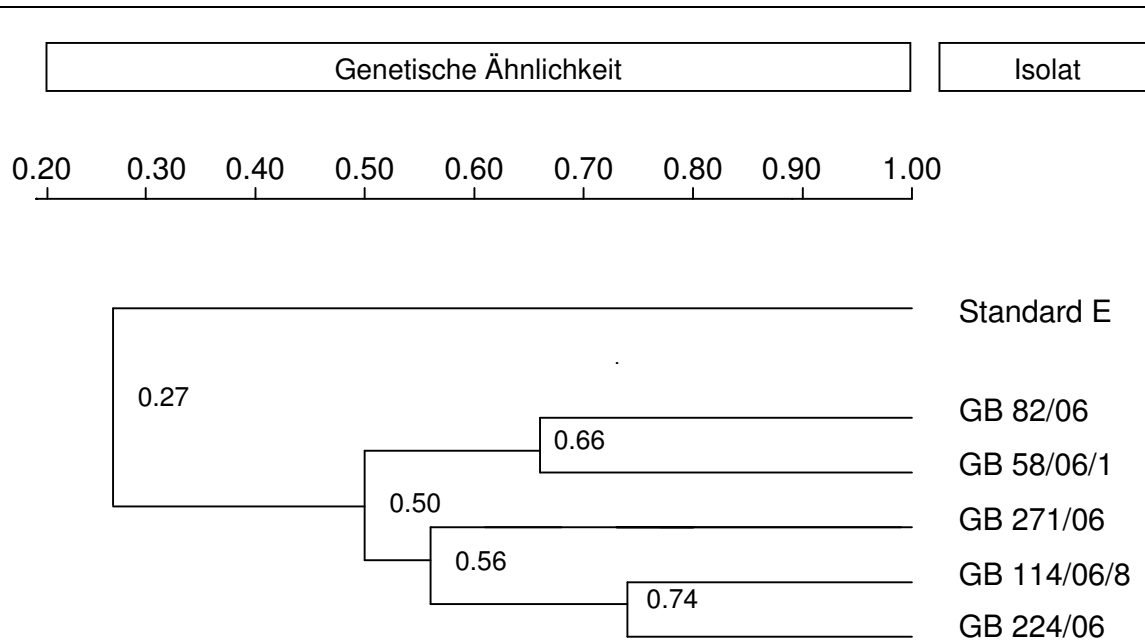


Abbildung 16: Dendrogramm von Feldisolaten des Serotyps E im Vergleich zum Standardstamm ORT E

#### 4.2.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der RAPD-PCR an ORT-Isolaten

Eine mögliche **Zusammenfassung** der Ergebnisse aus der Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting mit dem Primer M 13 an den Feldisolaten unterschiedlichen Serotyps ist in Tabelle 23 wiedergegeben. Die untersuchten Standardstämme ORT A, B, C und E wiesen untereinander differenzierbare Fragmentmuster auf. Bei Betrachtung der Fragmentmuster der Standardstämme und der zugehörigen Feldisolate wurde deutlich, dass nur die Feldisolate des Serotyps A annähernd das gleiche Muster wie ihr Standardstamm aufwiesen. Alle anderen Feldisolate wiesen im Vergleich zu den Profilen ihres Standards unterschiedliche Muster auf.

Die Feldisolate des Serotyps A zeigten untereinander alle das gleiche Fragmentmuster. Dies konnte - bis auf eine Ausnahme - auch bei den Feldisolaten des Serotyps B beobachtet werden. Auffällig war die Ähnlichkeit der Fragmentmuster der Feldisolate des Serotyps B mit dem Muster der Feldisolate des Serotyps A.

Basierend auf den errechneten Fragmentgrößen wurden innerhalb der untersuchten Feldisolate des Serotyps E vier verschiedene, innerhalb der Feldisolate des Serotyps C fünf verschiedene Fragmentmuster ermittelt.

Eine sichere Typisierung anhand der Genotypisierung unter Verwendung des Primers M 13 und der aufgeführten Amplifikationsbedingungen scheint nur für die Isolate des Serotyps A möglich.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung mit dem Primer M 13 (RAPD-PCR) an Feldisolaten

Getestete Standardstämme	Anzahl der getesteten ORT-Feldisolate	Anzahl der Isolate mit gleichem Muster des Standardstamms	Anzahl der Muster der Feldisolate innerhalb eines Serotyps
A	5	5	1
B	4	-	2
C	7	-	5
E	5	-	4

### 4.3 Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen

Die Verwendung des Embryoletalitätstestes scheint ein empfindliches Testsystem zur Bestimmung der Pathogenität von ORT darzustellen. Im dritten Teil der Arbeit wurden 88 ORT-Feldisolate deutscher Herkunft auf ihre letale Wirkung auf Hühnerembryonen untersucht.

#### 4.3.1 Vorausgehende Untersuchung

Zur Bestimmung einer geeigneten Inokulationsmenge pro Ei wurden in einer vorausgehenden Untersuchung SPF-Bruteier mit Suspensionen unterschiedlicher Keimzahl eines hoch- (GB 168/01/1) bzw. niedrig pathogenen (GB 70/94) Isolates beimpft. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 24 wiedergegeben.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die tatsächlich in das Ei verimpfte Keimmenge eines apathogenen ORT-Stammes keinen Einfluss auf die Mortalität hat, wohingegen bei einem pathogenen Isolat eine höhere Keimmenge im Ei (ca. 1000 KBE/Ei) eine Erhöhung der Mortalität gegenüber den niedrigeren Keimmengen (ca. 250 KBE/Ei bzw. ca. 500 KBE/Ei) bedeutet. Da die Pathogenitätsunterschiede am deutlichsten bei einer verimpften Keimmenge von ca. 1000 KBE/Ei hervortraten, wurde diese für die weitere Untersuchung angestrebt.

Tabelle 24: Mortalitätsrate und Überlebensindices der Isolate GB 168/01/1 und GB 70/94 unter Verwendung von Inokula verschiedener Keimmengen

Isolat	Inokulationsmenge	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 168/01/1 (hoch pathogen)	ca. 250 KBE/Ei	30%	57
	ca. 500 KBE /Ei	30%	58
	ca. 1000 KBE /Ei	60%	36
GB 70/94 (niedrig pathogen)	ca. 250 KBE /Ei	0%	80
	ca. 500 KBE /Ei	0%	80
	ca. 1000 KBE /Ei	0%	80

### 4.3.2 Embryonale Mortalität

Nach Ablauf des Embryoletalitätstestes wurden die während der Beobachtungszeit abgestorbenen Embryonen ermittelt und die Mortalitätsrate für jedes Isolat ermittelt. Für die getesteten 88 deutschen Isolate wurden Mortalitätsraten zwischen 0% bis 60% berechnet. Keine Mortalität wurde bei 14 (15,9%) der Isolate beobachtet. Dagegen wurden für 19 (21,6%) der Isolate eine Mortalitätsrate von 10%, für 21 (23,9%) eine Rate von 20% sowie für 18 (20,5%) der Isolate eine Rate von 30% ermittelt. Je 6 (6,8%) der Isolate wiesen Mortalitätsraten von 40% und 50% auf, wogegen für 4 (4,5%) Isolate eine Mortalitätsrate von 60% ermittelt wurde.

Der niedrigste ermittelte Überlebensindex betrug 34, dieser wurde von einem einzigen Isolat erreicht, der höchste 80, den 14 (15,9%) der untersuchten Isolate erreichten. Überlebensindices zwischen 61 und 80 wurden für 69 der 88 Isolate (78,4%) ermittelt (Abbildung 17).

Bei der Adspektion abgestorbener Embryonen konnten makroskopische Veränderungen in Form von Zwergwuchs, petechialen Blutungen in der Haut bzw. Hämorrhagien und eine spärlichere Befiederung im Vergleich zu Kontrollembryonen beobachten werden. Vereinzelt traten offene Schädel- oder offene Leibeshöhlen auf.

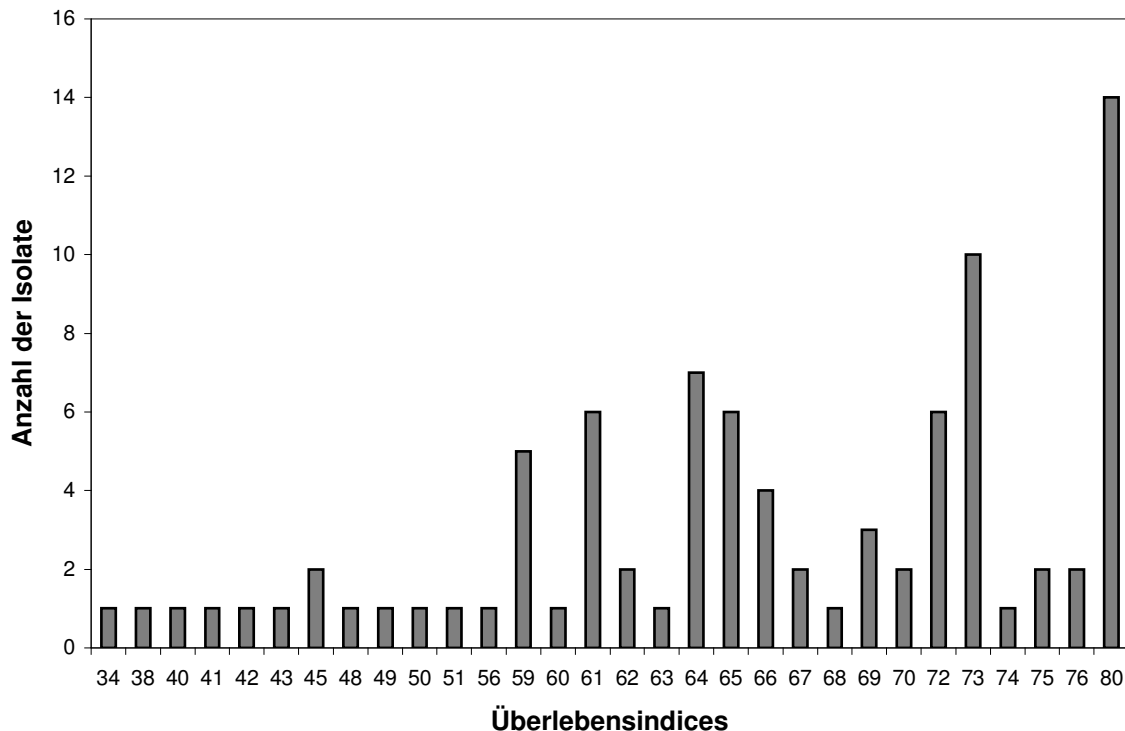


Abbildung 17: Spanne der aufgetretenen Überlebensindices und Anzahl der Isolate (n=88), die den jeweiligen Überlebensindex aufwiesen

Aus den ermittelten Werten zur Mortalitätsrate und Überlebensindex ergab sich die auf den in Tabelle 9 aufgeführten Bewertungsmaßstab basierende Klassifizierung der Isolate. Anhand der Mortalitätsrate wurden 54 (61,63%) der Isolate als niedrig pathogen und 34 (38,64%) als mäßig pathogen kategorisiert. Basierend auf den Überlebensindices wurden 69 (78,14%) der Kategorie „niedrig pathogen“ und 19 (21,59%) der Isolate der Kategorie „mäßig pathogen“ zugeordnet. Es wurden weder anhand der Mortalitätsrate noch anhand des Überlebensindex Isolate als „hoch pathogen“ bewertet (Abbildung 18).

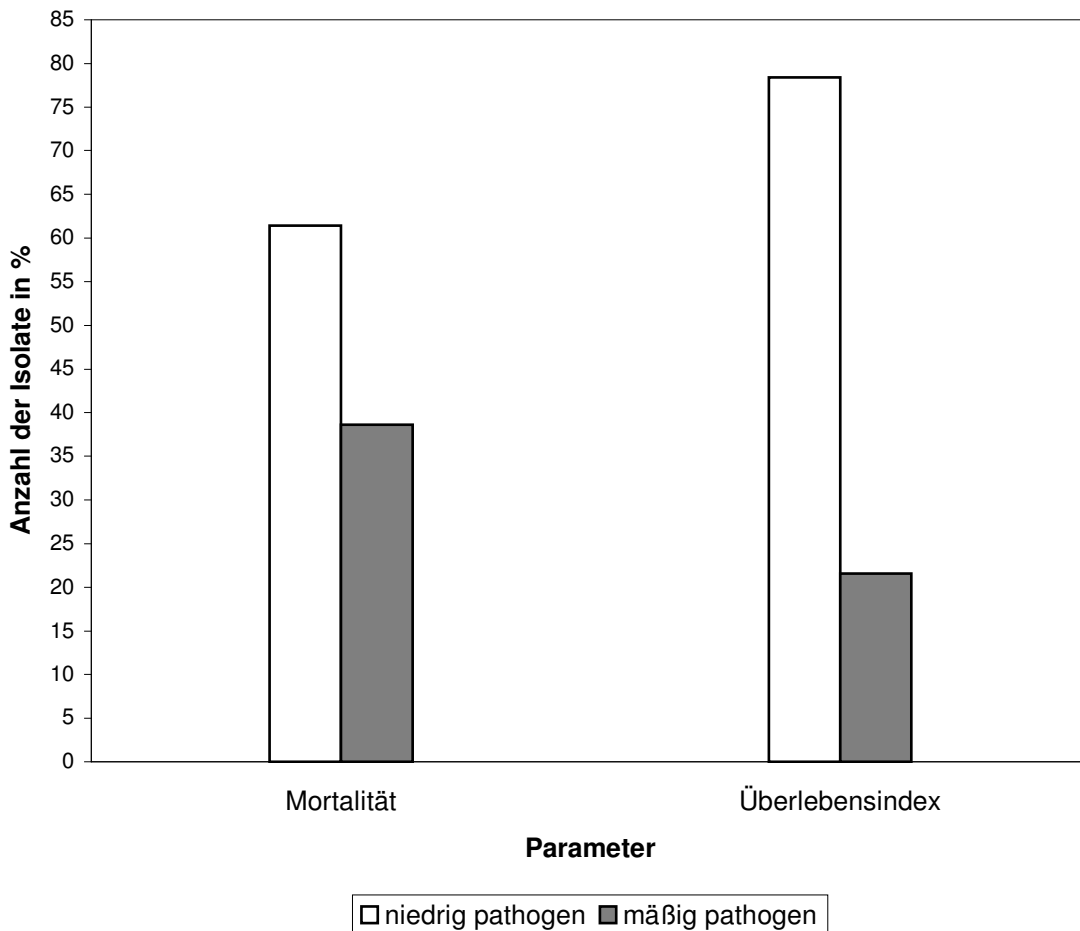


Abbildung 18: Klassifizierung der Isolate (n=88) anhand der Mortalitätsrate und des Überlebensindex

#### 4.3.3 Bewertung der Pathogenität innerhalb der Serotypengruppen

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob der Serotyp eines Isolats einen Einfluss auf die Pathogenität hat, werden im Folgenden die Ergebnisse des Embryoletalitätstests den Serotypgruppen nach dargestellt. Mit der statistischen Auswertung wurde die gleichmäßige Verteilung der Mortalitäts- und Überlebensraten über die Serotypgruppen geprüft.

4.3.3.1 Serotypgruppe A

Die ermittelten Mortalitätsraten und Überlebensindices der 32 Isolate, die als **Serotyp A** typisiert worden sind, wurden unter Tabelle 25 dargestellt. Die Mortalitätsrate betrug 0% bis 60%, wobei die meisten Isolate (12) eine Rate von 20% aufwiesen. Die Überlebensraten lagen im Bereich zwischen 40 und 80. Auf Grundlage der Mortalitätsrate waren 20 (62,5%) Isolate als niedrig pathogen und 12 (37,5%) als mäßig pathogen zu bewerten. Wurde der Überlebensindex herangezogen, so waren 24 (75%) Isolate als niedrig pathogen und 8 (25%) Isolate als mäßig pathogen einzustufen (Abbildung 19).

Tabelle 25: Darstellung der Mortalitätsraten und Überlebensindices der als Serotyp A charakterisierten Isolate (n=32)

Isolat	Mortalitätsrate	Überlebensindex	Isolat	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 1413/05/64	0%	80	GB 1233/05	20%	69
GB 1317/05/05	0%	80	GB 1527/05/03	20%	69
GB 1606/05	0%	80	GB 114/06/11	20%	72
GB 1413/05/62	10%	72	GB 114/06/01	20%	76
GB 65/06/12	10%	72	GB 114/06/10	30%	59
GB 1317/05/02	10%	73	GB 65/06/17	30%	61
GB 1527/05/02	10%	73	GB 1527/05/04	30%	63
GB 65/06/10	10%	73	GB 1527/05/01	30%	64
GB 1317/05/07	20%	64	GB 476/05/60	40%	50
GB 1317/05/09	20%	64	GB 1317/05/03	40%	51
GB 65/06/02	20%	66	GB 114/06/04	40%	61
GB 65/06/11	20%	66	GB 114/06/12	50%	41
GB 65/06/15	20%	66	GB 1685/05/04	50%	42
GB 1317/05/06	20%	67	GB 1319/05	50%	45
GB 65/06/04	20%	67	GB 114/06/09	50%	48
GB 114/06/05	20%	69	GB 65/06/13	60%	40

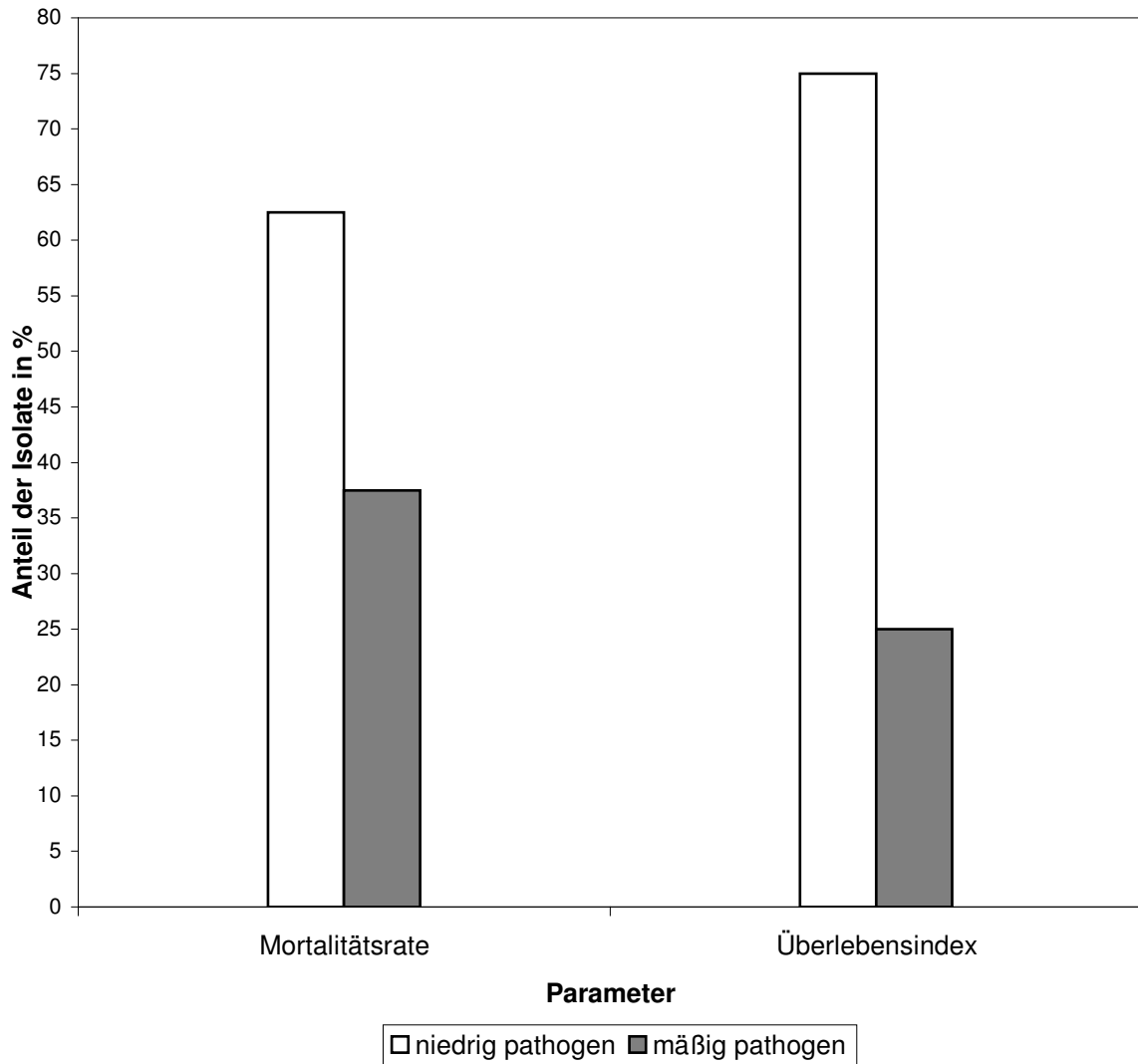


Abbildung 19: Bewertung der Pathogenität der deutschen Isolate des Serotyps A (n=32)

#### 4.3.3.2 Serotypgruppe B

Die insgesamt 12 Isolate des **Serotyps B** zeigten eine Spanne der Mortalitätsraten von 0% bis 60% und eine Spanne der Überlebensrate von 38 bis 80 (Tabelle 26). Basierend auf der Mortalitätsrate gab es 4 (33,3%) Isolate, die als niedrig pathogen und 8 (66,7%), die als mäßig pathogen betrachtet werden konnten. Die Bewertung bezüglich der Überlebensrate zeigte, dass 8 (66,7%) Isolate als niedrig und 4 (33,3%) Isolate mäßig pathogen waren (Abbildung 20).

Tabelle 26: Darstellung der Mortalitätsraten und Überlebensindices der als Serotyp B charakterisierten Isolate (n=12)

Isolat	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 1685/05/05	10%	73
GB 1317/05/01	10%	73
GB 157/06	10%	73
GB 1640/05	20%	65
GB 114/06/06	30%	56
GB 1685/05/08	30%	59
GB 144/06	30%	59
GB 1685/05/06	30%	64
GB 1413/05/56	30%	65
GB 1685/05/09	30%	70
GB 1685/05/02	50%	45
GB 1681/05	60%	38

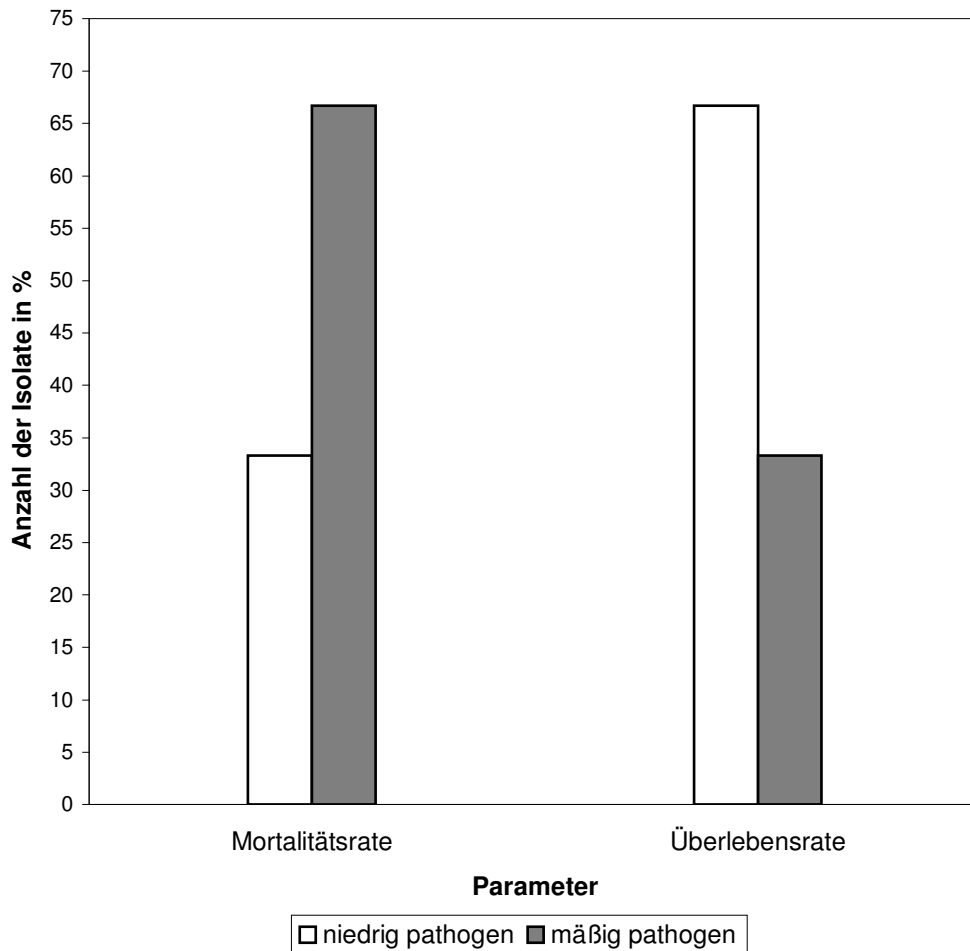


Abbildung 20: Bewertung der Pathogenität der deutschen Isolate des Serotyps B (n=12)

4.3.3.3 Serotypgruppe C

Bei den 13 Isolaten des **Serotyps C** konnte ein Bereich von 0% bis 50% bei der Mortalität, sowie ein Bereich von 52 bis 80 bei der Überlebensrate ermittelt werden (Tabelle 27). Hinsichtlich der Mortalitätsrate konnten 10 Isolate als niedrig pathogen und 3 Isolate als mäßig pathogen bestimmt werden. Dagegen gestaltete sich die Bewertung bezüglich der Überlebensrate wie folgt: 12 (92,3%) Isolate waren als niedrig pathogen, 1 (7,7%) Isolat als mäßig pathogen zu klassifizieren (Abbildung 21).

Tabelle 27: Darstellung der Mortalitätsraten und Überlebensindices der als Serotyp C charakterisierten Isolate (n=13)

Isolat	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 114/06/03	0%	80
GB 1689/05/12	0%	80
GB 1413/05/37	0%	80
GB 1413/05/24	0%	80
GB 65/06/06	10%	73
GB 1685/05/01	10%	73
GB 1685/05/03	10%	73
GB 114/06/02	10%	74
GB 1413/05/91	10%	75
GB 1413/05/66	20%	64
GB 65/06/05	30%	61
65/06/07	30%	68
65/06/09	50%	59

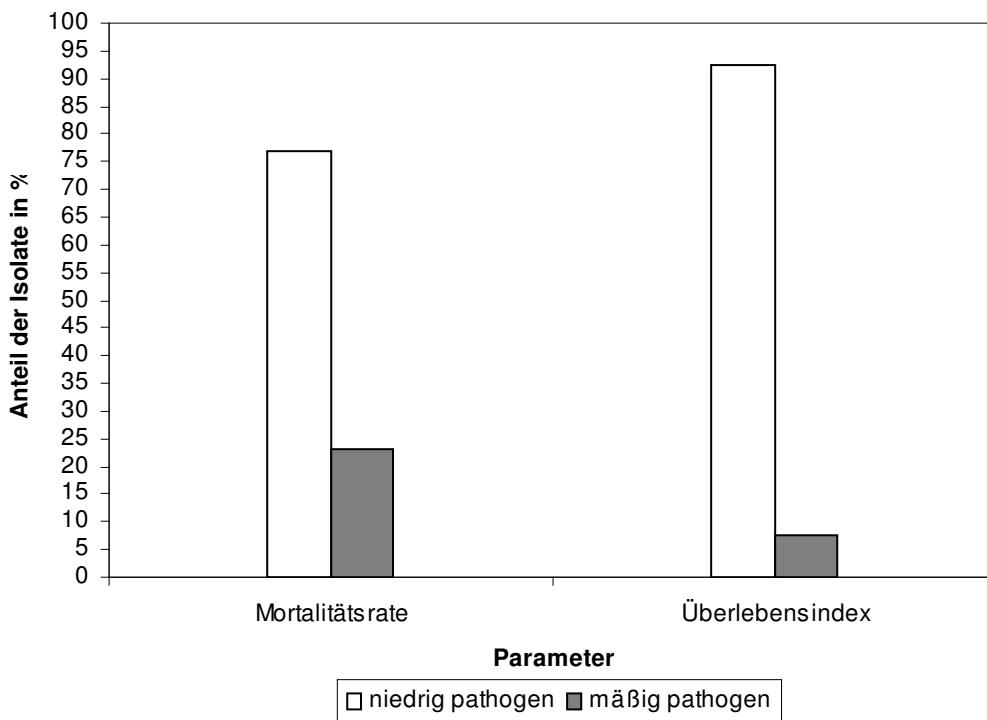


Abbildung 21: Bewertung der Pathogenität der deutschen Isolate des Serotyps C



4.3.3.4 Serotypgruppen D, E, I und J

Die Ergebnisse der Serotypgruppen D, E, I und J wurden aufgrund der geringen Anzahl der Isolate in der Tabelle 28 und der Abbildung 22 zusammengefasst. Die Anzahl der abgestorbenen Embryonen der 4 getesteten Isolate vom **Serotyp D** lag zwischen 0 und 2, die Mortalität damit zwischen 0% und 20%. Die Spanne der Überlebensrate konnte mit 64 bis 80 angegeben werden. Alle Isolate (100%) wurden somit als niedrig pathogen eingestuft.

Die 5 als **Serotyp E** typisierten Isolate wiesen eine embryonale Sterblichkeit im Bereich von 0% bis 30% auf. Die Überlebensrate erstreckte sich über den Bereich von 62 bis 80.

Auf Grundlage der Mortalitätsrate konnten 4 (80%) Isolate als niedrig pathogen und 1 Isolat (20%) als mäßig pathogen klassifiziert werden. Mittels Überlebensrate stellten sich alle Isolate (100%) als niedrig pathogen dar. Das auf Basis der Mortalitätsrate als mäßig pathogen eingestufte Isolat wurde mittels Überlebensindex als schwach pathogen eingestuft.

Bei den untersuchten 4 Isolaten des **Serotyps I** lag die Mortalitätsrate zwischen 0% und 40%, die Überlebensrate bei 65 bis 80. Drei (75%) Isolate waren aufgrund der Mortalitätsrate als schwach pathogen, ein (25%) Isolat als mäßig pathogen zu bewerten. Unter Verwendung der Überlebensrate waren alle 4 (100%) Isolate als niedrig pathogen zu bewerten.

Die embryonale Mortalität der 5 als **Serotyp J** bestimmten Isolate lag zwischen 30% und 60%, die Überlebensrate bei 34 bis 61. Mit der Bewertung der Mortalitätsrate sind alle 5 (100%) Isolate als mäßig pathogen zu betrachten. Wird die Überlebensrate bewertet, so stellte sich ein Isolat (20%) als niedrig pathogen, vier (80%) als mäßig pathogen dar.

Tabelle 28: Darstellung der Mortalitätsraten und Überlebensindices der als Serotyp D, E, I und J charakterisierten Isolate

(Serotyp D: n=4; Serotyp E: n=5; Serotyp I: n=4; Serotyp J: n=5)

Isolat	Serotyp	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 1413/05/99	D	0%	80
GB 1413/05/96	D	0%	80
GB 1413/05/54	D	20%	64
GB 114/06/07	D	20%	65
GB 271/06	E	0%	80
GB 58/06/01	E	10%	72
GB 82/06	E	10%	73
GB 224/06	E	10%	75
GB 114/06/08	E	30%	62
GB 65/06/14	I	0%	80
GB 1527/05/09	I	10%	76
GB 65/06/01	I	20%	65
GB 1527/05/06	I	40%	65
GB 1527/05/05	J	30%	59
GB 65/06/03	J	30%	60
GB 1527/05/11	J	30%	61
GB 1479/05	J	40%	49
GB 1527/05/10	J	60%	34

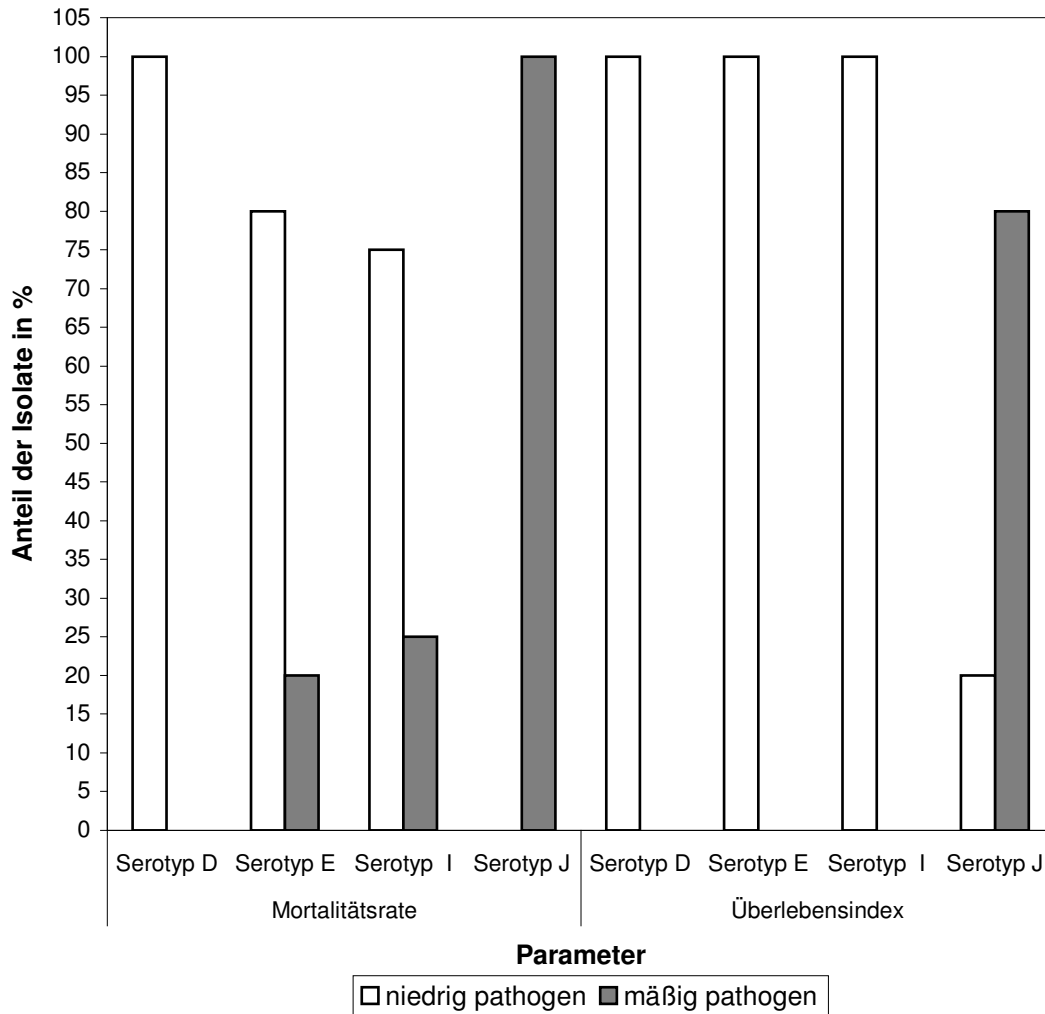


Abbildung 22: Bewertung der Pathogenität der deutschen Isolate des Serotyps D, E, I, J

#### 4.3.3.5 Sonstige Serotypgruppen bzw. Kreuzreagenten

Wie in Tabelle 29 ersichtlich, wurden für das eine Isolat einer weiteren Serotypgruppe (H) bzw. 12 Kreuzreagenten Mortalitätsraten von 0% bis 60% ermittelt. Die Überlebensraten umfassten den Bereich von 43 bis 80. Bezogen auf die Mortalitätsrate wurden 9 (69,2%) Isolate als schwach pathogen und 4 (30,8%) Isolate als mäßig pathogen klassifiziert. Aufgrund des Überlebensindexes wurden 12 (92,3%) Isolate als schwach pathogen und 1 (7,7%) Isolat als mäßig pathogen eingestuft (Abbildung 23).

Tabelle 29: Darstellung der Mortalitätsraten und Überlebensindices von Isolaten anderer Serotypgruppen bzw. Kreuzreagenten (n=13)

Isolat	Serotyp	Mortalitätsrate	Überlebensindex
GB 1413/05/100	A+B	10%	72
GB 1685/05/11	A+B	20%	70
GB 1685/05/10	A+B	30%	61
GB 1413/05/20	A+B	60%	43
GB 65/06/16	A+J	40%	62
GB 1413/05/16	D+E	30%	61
GB 58/06/02	E+A	20%	65
GB 1317/05/04	E+A	20%	66
GB 65/06/08	E+F	0%	80
GB 1317/05/08	H	10%	72
GB 339/06	J+A	20%	64
GB 1527/05/07	P+Q	0%	80
GB 1527/05/08	P+Q	0%	80

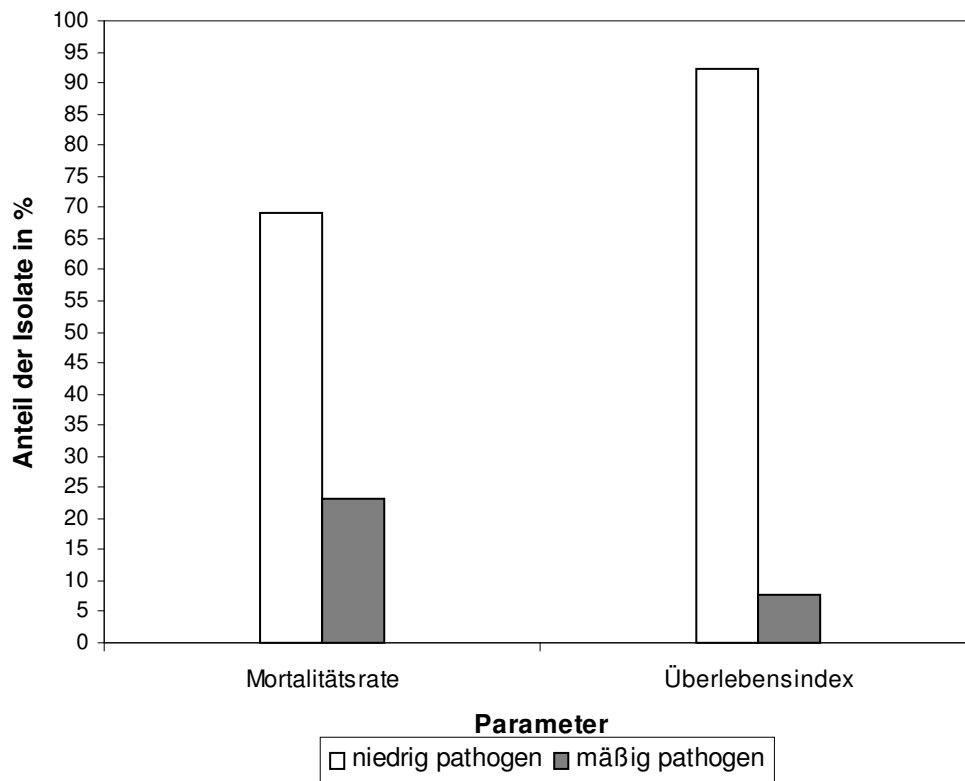


Abbildung 23: Bewertung der Pathogenität der deutschen Isolate sonstiger Serotypen (n=13)

4.3.4 Auswertung

Mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis wurde die gleichmäßige Verteilung der Mortalitätsraten und der Überlebensraten innerhalb der Serotypgruppen geprüft. Hinsichtlich der Mortalitätsraten ergab sich bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,01$  die Aussage, dass die Mortalitätsraten gleichmäßig über alle Serotypgruppen verteilt sind und der Serotyp eines Isolates somit keinen Einfluss auf die Mortalität hat. Bei der Anwendung dieses Testes auf die Verteilung der Überlebensraten trat unter einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,01$  ein signifikantes Ergebnis hervor; das heißt, die Überlebensraten sind über die Serotypgruppen ungleichmäßig verteilt. Der Serotyp scheint einen Effekt auf den Überlebensindex zu haben.

Mit dem sich anschließenden U-Test nach Mann-Whitney wurden die einzelnen Serotypgruppenpaarungen bezüglich ihres Überlebensindex untersucht (Tabelle 30). Dabei trat bei vier von 28 Paaren (14,3%) ein signifikanter Unterschied hervor. Da die Serotypgruppe J am häufigsten in diesen vier Paaren auftrat, kann vermutet werden, dass dieser Serotyp einen Effekt auf die Überlebensrate hat. Es muss jedoch betont werden, dass aus den untersuchten 88 Isolaten nur 5 dem Serotypen J zugeordnet werden konnten.

Tabelle 30: Signifikanzniveaus der paarweisen Untersuchung der Serotypgruppen hinsichtlich des Überlebensindex (U-Test nach Mann-Whitney)

Serotypgruppenpaare	Signifikanz	Serotypgruppenpaare	Signifikanz	Serotypgruppenpaare	Signifikanz
A+B	0,908	B+I	0,153	D+J	0,014
<b>A+C*</b>	<b>0,009</b>	B+J	0,114	D+Sonstige	0,455
A+D	0,203	B+Sonstige	0,382	E+I	0,902
A+E	0,063	C+D	0,862	<b>E+J*</b>	<b>0,009</b>
A+I	0,203	C+E	0,881	E+Sonstige	0,253
A+J	0,028	C+I	1,0	I+J	0,014
A+Sonstige	0,373	<b>C+J*</b>	<b>0,004</b>	I+Sonstige	0,53
B+C	0,032	C+Sonstige	0,177	<b>J+Sonstige*</b>	<b>0,006</b>
B+D	0,189	D+E	0,803		
B+E	0,102	D+I	1,0		

\* Serotypgruppen, bei denen bei  $p \leq 0,01$  ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebensindex vorliegt

4.3.5 Keimzahlbestimmung

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung sind im Anhang unter Tabelle 35 dargestellt. Angestrebt wurde eine zu verimpfende Keimmenge von ca.  $1 \times 10^3$  KBE/Ei. Die niedrigste Keimdichte betrug  $4,5 \times 10^2$  KBE/Ei, die höchste  $2,05 \times 10^4$  KBE/Ei. Nach Verarbeitung der Daten in einem Streudiagramm (Abbildung 24) konnte entgegen der Vermutung beim

untersuchten Stamm GB 168/01/1 (Tabelle 24) keine Korrelation zwischen der tatsächlich ins Ei verbrachten Bakterienmenge und der Mortalitätsrate festgestellt werden.

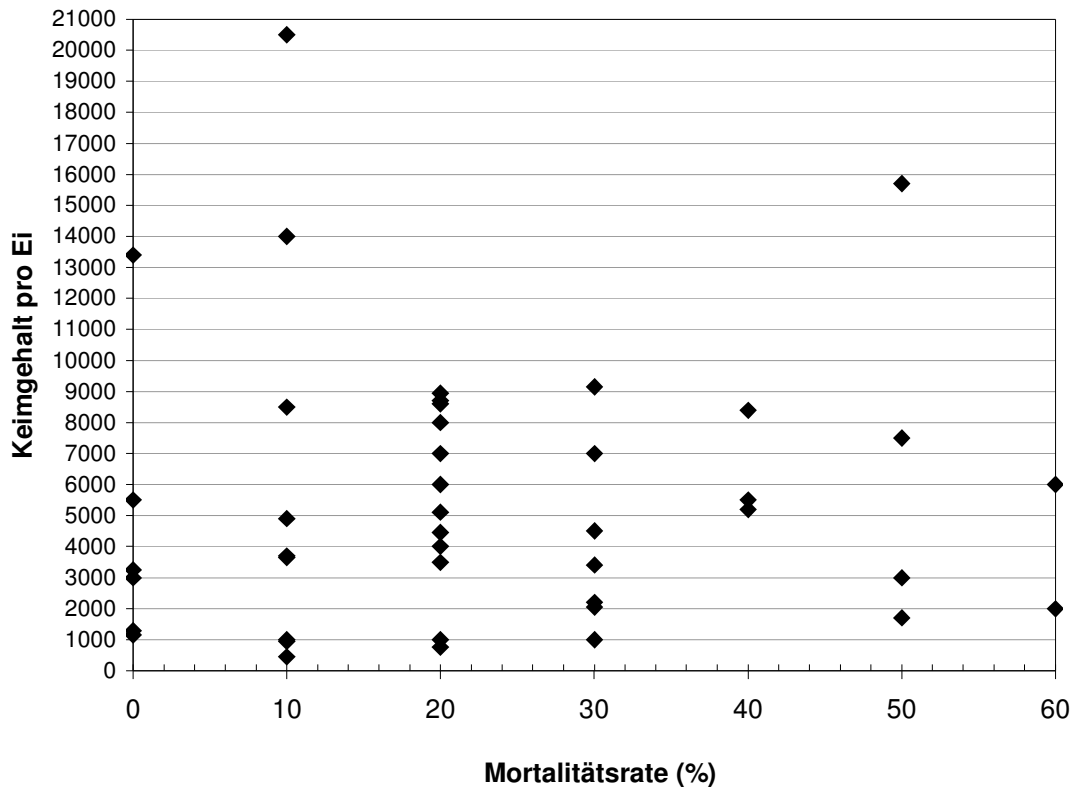


Abbildung 24: Streudiagramm der Wertepaare der Mortalitätsrate und des Keimgehalts pro Ei (KBE/100 µl)

#### 4.3.6 Bakteriologische Untersuchung

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung der Allantoisflüssigkeit sowie des Dottermaterials abgestorbener und überlebender Embryonen sind im Anhang (Tabelle 36, Tabelle 37) aufgeführt.

Die ORT-Reisolierung aus Allantoisflüssigkeit und Dottermaterial **abgestorbener** Embryonen war bis zum 8. d p.i. möglich. Hierbei lag die Reisolierungsrate von ORT aus Allantoisflüssigkeit zwischen 66,7% und 100%, bei der Reisolierung aus Dottermaterial betrug diese 0% bis 100%. Die Reisolierungsrate von ORT aus Allantoisflüssigkeit **überlebender** Embryonen erstreckte sich von 14,3% bis 100%, die Rate bezüglich der Reisolierung aus Dottermaterial lag in einem Bereich von 0% bis 100%. Von den 10 überlebenden Embryonen eines Isolates (GB 65/06/14) konnte aus technischen Gründen keine Reisolierung durchgeführt werden.

Aus den mit PBS beimpften SPF-Eiern, die als Negativ-Kontrolle dienten, konnten weder ORT noch sonstige Keime nachgewiesen werden. Ebenso konnten aus den mit ORT beimpften Bruteiern keine Fremdkeime nachgewiesen werden.

## 4.4 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK)

Zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentrationen der unter 3.1.4 aufgeführten 117 ORT-Feldisolate wurde die Mikrobouillondilutionsmethode angewendet.

### 4.4.1 Vorausgehende Untersuchung

Zur Abschätzung der Inkubationsdauer beimpfter Mikrotiterplatten wurden einige Platten probeweise mit ORT-Suspensionen beimpft und in bestimmten Intervallen auf ein Wachstum in den dafür vorgesehenen Vertiefungen kontrolliert. Parallel zu dieser Verfahrensweise wurde des Weiteren zur Orientierung eine Wachstumskurve erstellt (Abbildung 25). Wie aus der Abbildung ersichtlich, dauerte die Anlaufphase (lag-Phase) ca. 8 Stunden. Die sich anschließende exponentielle Phase dauerte beim Isolat GB 65/06/12 ca. 12 h, beim Isolat GGD 1261/91 ca. 18 h. Die stationäre Phase hielt beim Isolat GGD 1261/91 für 8 Stunden, beim Isolat GB 65/06/06 für ca. 12 Stunden an, bevor die Absterbephase begann. Basierend auf den Ergebnissen aus den Wachstumskurven muss die Inkubation für mindestens 20 bis 32 Stunden andauern. Zur Bestätigung wurden Mikrotiterplatten mit Suspensionen - eingestellt auf McFarlandStandard 0,5 - dieser Isolate beimpft. Nach einer 24stündigen Inkubation konnte auf diesen Platten in den Wachstumskontroll-Vertiefungen kein Wachstum festgestellt werden. Aufgrund der positiven Bewertung der Wachstumskontrollen nach einer 44stündigen Inkubation wurde diese Dauer für die nachfolgende Untersuchung gewählt.

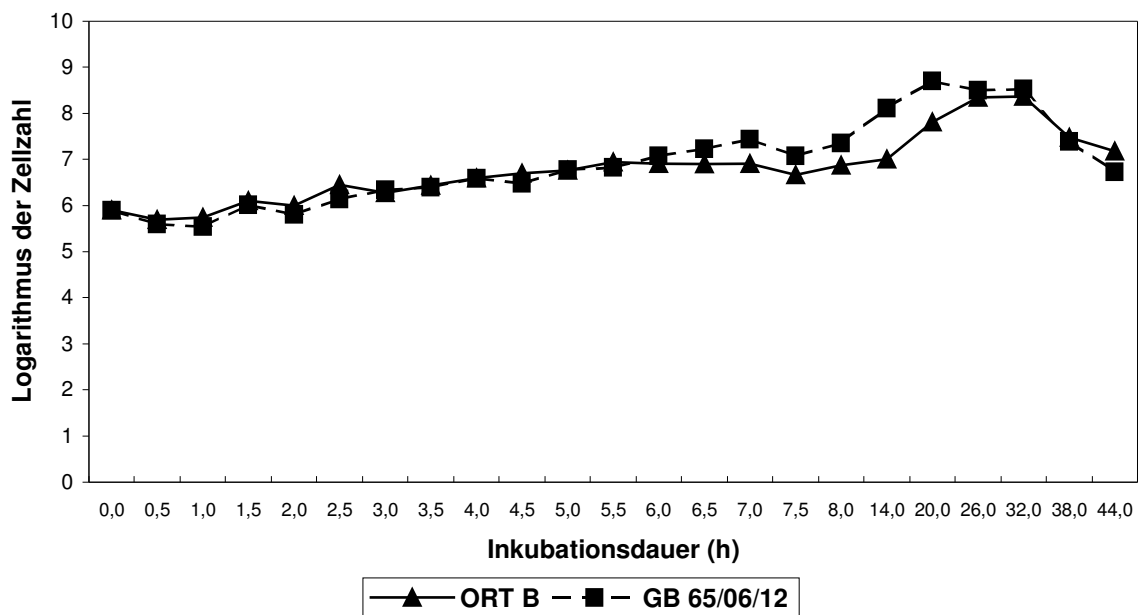


Abbildung 25: Wachstumskurven der Isolate GB 65/06/12 und GGD 1261/91 (ORT B)

#### 4.4.2 Mikrobouillondilutionsmethode

Es wurden die minimalen Hemmstoffkonzentrationen (MHK-Werte) von 88 Feldisolaten deutscher sowie 29 Feldisolate französischer Herkunft ermittelt; die Werte für jedes getestete Isolat werden im Anhang (Tabelle 38) aufgeführt.

Für eine geeignete Beurteilung der Empfindlichkeit der Isolate gegenüber den getesteten Wirkstoffen werden im Folgenden die ermittelten Minimal-, Maximal- sowie Modalwerte, anschließend die  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte der deutschen bzw. der französischen Isolate vorgestellt.

##### 4.4.2.1 Empfindlichkeitstestung der Isolate deutscher Herkunft

In der Tabelle 31 sind die für die deutschen Isolate ermittelten Minimal- ( $MHK_{Min}$ ), Maximalwerte ( $MHK_{Max}$ ), Modal- ( $MHK_{Modal}$ ) sowie die  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ -Werte aufgeführt.

Die Minimalwerte aller Wirkstoffe befanden sich im Bereich der niedrigsten verfügbaren Konzentrationen.

Bis auf Ceftiofur (16 µg/ml) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (16/304 µg/ml) wurden Maximalwerte ermittelt, die für Erythromycin (> 32 µg/ml), Lincomycin (>8 µg/ml), Tetracyclin (> 16 µg/ml) und Tiamulin (> 32 µg/ml) die verfügbaren Höchstkonzentrationen erreichten. Bezüglich Erythromycin, Ceftiofur, Lincomycin und Tetracyclin stellen die Maximalwerte gleichzeitig die Modalwerte dar. Der Maximalwert für Penicillin G lag bei einer Wirkstoffkonzentration von > 8 µg/ml, für Ampicillin bei > 64 µg/ml und für Enrofloxacin bei > 8 µg/ml. Die Modalwerte dieser Substanzen lag durchweg mindestens eine Verdünnungsstufe unter dem Maximalwert: der am häufigsten für Penicillin G und Ampicillin ermittelte MHK-Wert betrug je 4 µg/ml, der für Enrofloxacin 2 µg/ml und für Tiamulin ≤ 0,5 µg/ml.

Die berechneten Wirkstoffkonzentrationen, bei denen mindestens 50% der untersuchten Isolate in ihrem Wachstum gehemmt wurden ( $MHK_{50}$ ), wiesen - bis auf Tiamulin - Werte im mittleren bis hohen Bereich der verfügbaren Konzentrationen auf. So wurden für Erythromycin (> 32 µg/ml), Lincomycin (> 8 µg/ml) und Tetracyclin (> 16 µg/ml)  $MHK_{50}$ -Werte ermittelt, die über der höchsten auf der Mikrotiterplatte verfügbaren Konzentration lagen. Tiamulin wies den kleinsten  $MHK_{50}$ -Wert aller getesteten Wirkstoffe auf (≤ 0,5 µg/ml).

Es wurden für Penicillin G, Erythromycin, Lincomycin und Tetracyclin  $MHK_{90}$  -Werte von > 8 µg/ml, > 32 µg/ml, > 8 µg/ml bzw. > 16 µg/ml ermittelt, die wieder über der höchsten, auf der Mikrotiterplatte vorhandenen Wirkstoffkonzentration lag. Im hohen Konzentrationsbereich fanden sich die  $MHK_{90}$ -Werte für Ampicillin (64 µg/ml), Ceftiofur (16 µg/ml) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (8/152 µg/ml) wieder.

Tabelle 31: Darstellung der Minimal-, Maximal- und Modalwerte sowie der  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte der Isolate deutscher Herkunft

Wirkstoff	Deutschland (n=88)				
	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
Penicillin G	$\leq 0,06$	$> 8$	4	8	$> 8$
Erythromycin	$\leq 0,12$	$> 32$	$> 32$	$> 32$	$> 32$
Ampicillin	$\leq 0,5$	$> 64$	4	4	64
Ceftiofur	$\leq 0,12$	16	16	8	16
Enrofloxacin	$\leq 0,06$	$> 8$	2	2	$> 8$
Lincomycin	0,12	$> 8$	$> 8$	$> 8$	$> 8$
Tetracyclin	0,25	$> 16$	$> 16$	$> 16$	$> 16$
Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1:19	$\leq 0,25/4,75$	16/304	4/76	4/76	8/152
Tiamulin	$\leq 0,5$	$> 32$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	2

Da die Empfindlichkeiten von ORT gegenüber Antibiotika abhängig von den in einem Gebiet eingesetzten Wirkstoffen sind, erfolgt eine tabellarische Darstellung der Parameter  $MHK_{Min}$ ,  $MHK_{Max}$ ,  $MHK_{Modal}$ ,  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  für die deutschen Isolate getrennt nach ihrer regionalen Herkunft (Bundesländer) im Anhang (Tabelle 39, Tabelle 40). Aufgrund der überwiegend geringen Anzahl an Isolaten ist eine Auswertung und Bewertung der Empfindlichkeiten gegenüber den Wirkstoffen nicht aussagekräftig. Für aus Niedersachsen stammende Isolate erfolgt die Darstellung jedoch aufgrund der vergleichsweise hohen Anzahl an Isolaten (n=67).

Bis auf Ampicillin (2  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden Minimalwerte im niedrigen Konzentrationsbereich festgestellt. Der  $MHK_{50}$ -Wert betrug für Penicillin G 8  $\mu\text{g/ml}$ , für Erythromycin  $> 32$   $\mu\text{g/ml}$ , für Ampicillin 4  $\mu\text{g/ml}$ , für Ceftiofur 8  $\mu\text{g/ml}$ , für Enrofloxacin 2  $\mu\text{g/ml}$ , für Lincomycin  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ , für Tetracyclin  $> 16$   $\mu\text{g/ml}$  und für Trimethoprim/Sulfamethoxazol 4/76  $\mu\text{g/ml}$ . Die  $MHK_{Max}$ - sowie die  $MHK_{90}$ -Werte befanden sich für alle Wirkstoffe im höchsten verfügbaren Konzentrationsbereich (Penicillin  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ , Erythromycin  $> 32$   $\mu\text{g/ml}$ , Ceftiofur 16  $\mu\text{g/ml}$ , Enrofloxacin  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ , Lincomycin  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ , Tetracyclin  $> 16$   $\mu\text{g/ml}$ , Trimethoprim/Sulfamethoxazol 16/304  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 8/152  $\mu\text{g/ml}$ ). Für die niedersächsischen Isolate wurde bezüglich Tiamulin ein  $MHK_{Max}$ - sowie  $MHK_{90}$ -Wert von  $> 32$   $\mu\text{g/ml}$  festgestellt. Isolate aus den verbleibenden Bundesländern wiesen hier eine Konzentration von  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  auf.

#### 4.4.2.2 Empfindlichkeitstestung der Isolate französischer Herkunft

Die niedrigsten  $MHK$ -Werte ( $MHK_{Min}$ ), die für Isolate französischer Herkunft ermittelt wurden, lagen für Penicillin G ( $\leq 0,06$   $\mu\text{g/ml}$ ), Ampicillin ( $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ ), Ceftiofur ( $\leq 0,12$   $\mu\text{g/ml}$ ), Enrofloxacin ( $\leq 0,06$   $\mu\text{g/ml}$ ), Trimethoprim/Sulfamethoxazol ( $\leq 0,25/4,75$   $\mu\text{g/ml}$ ) und Tiamulin ( $\leq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$ ) im niedrigsten Konzentrationsbereich. Lincomycin und Tetracyclin wiesen als



niedrigsten MHK-Wert eine Konzentration von 0,25 µg/ml auf, gefolgt von Erythromycin mit einem Wert von 0,5 µg/ml (Tabelle 32).

Die  $MHK_{Max}$ - und  $MHK_{Modal}$ -Werte von Penicillin, Erythromycin, Ceftiofur, Lincomycin und Tiamulin waren äquivalent und betragen 8 µg/ml, > 32 µg/ml, 16 µg/ml, > 8 µg/ml bzw. ≤ 0,5 µg/ml. Die höchsten ermittelten MHK-Werte ( $MHK_{Max}$ ) für Trimethoprim/Sulfamethoxazol betrug 8/152 µg/ml, jedoch gab es eine Häufung der MHK-Werte ( $MHK_{Modal}$ ) bei einer Konzentration von ≤ 0,25/4,75 µg/ml. Für Ampicillin und Enrofloxacin betragen die Maximalwerte 8 bzw. 4 µg/ml, die Modalwerte lagen je eine Verdünnungsstufe darunter (4 µg/ml, 2 µg/ml).

Die Wirkstoffe Erythromycin, Ceftiofur, Enrofloxacin, Lincomycin, Tetracyclin und Tiamulin wiesen einen Wert auf, der gleichzeitig der  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  entsprach. Im Fall von Erythromycin (> 32 µg/ml), Ceftiofur (16 µg/ml), Lincomycin (> 8 µg/ml) und Tetracyclin (16 µg/ml) befand sich dieser Wert im höheren bzw. höchsten verfügbaren Konzentrationsbereich, im Fall von Tiamulin lag er im untersten Konzentrationsbereich (≤ 0,5 µg/ml). Die Wirkstoffe Penicillin G und Ampicillin wiesen einen  $MHK_{50}$ -Wert von 4 µg/ml und einen  $MHK_{90}$ -Wert von 8 µg/ml auf.

Wie bereits für die deutschen Isolate erfolgt die tabellarische Darstellung der Parameter  $MHK_{Min}$ ,  $MHK_{Max}$ ,  $MHK_{Modal}$ ,  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  für die französischen Isolate getrennt nach ihrer regionalen Herkunft im Anhang (Tabelle 41, Tabelle 42). Aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten ist eine Auswertung und Bewertung der Empfindlichkeiten gegenüber den Wirkstoffen nicht aussagekräftig.

Tabelle 32: Darstellung der Minimal-, Maximal- und Modalwerte sowie der  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte der Isolate französischer Herkunft

Wirkstoff	Frankreich (n=29)				
	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
Penicillin G	≤ 0,06	8	8	4	8
Erythromycin	0,5	> 32	> 32	> 32	> 32
Ampicillin	≤ 0,5	8	4	4	8
Ceftiofur	≤ 0,12	16	16	16	16
Enrofloxacin	≤ 0,06	4	2	2	2
Lincomycin	0,25	> 8	> 8	> 8	> 8
Tetracyclin	0,25	> 16	16	16	16
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol 1:19	≤ 0,25/4,75	8/152	≤ 0,25/4,75	1/19	4/76
Tiamulin	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5

#### 4.4.2.3 Vergleich der Empfindlichkeit der deutschen und französischen Isolate

Eine Gegenüberstellung der  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte für die deutschen und französischen Isolate erfolgt unter Tabelle 43 im Anhang.

$MHK_{50}$ -Werte im hohen Konzentrationsbereich ließen sich bei Isolaten aus beiden Ländern für Erythromycin, Ceftiofur, Lincomycin und Tetracyclin beobachten. Zusätzlich konnte dieser Sachverhalt gegenüber Penicillin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol im Zusammenhang mit den deutschen Isolaten festgestellt werden. Im mittleren Bereich der Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika fanden sich die  $MHK_{50}$ -Werte für Ampicillin und Enrofloxacin für alle Isolate. Mindestens 50% der französischen Isolate wurden gegenüber Penicillin G und Trimethoprim/Sulfamethoxazol mit jeweiligen mittleren Konzentrationen in ihrem Wachstum gehemmt. Mit  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  für Tiamulin wiesen die französischen Isolate  $MHK_{50}$ -Werte im niedrigen Konzentrationsbereich auf. Ein niedriger  $MHK_{50}$ -Wert im Zusammenhang mit den deutschen Isolaten wurde nur bei Tiamulin erfasst.

Die Konzentrationen der jeweiligen Antibiotika, die das Wachstum von mindestens 90% der Bakterien hemmten, befanden sich im Fall der deutschen Isolate bis auf Tiamulin alle im hohen Bereich. Hinsichtlich der Wirkstoffe Penicillin G, Erythromycin, Ceftiofur, Lincomycin, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol traf dieser Sachverhalt auch für die französischen Isolate zu. Die französischen  $MHK_{90}$ -Werte von Ampicillin, Enrofloxacin und Tiamulin waren deutlich niedriger als die deutschen  $MHK_{90}$ -Werte.

Insgesamt ließ sich bei allen untersuchten Isolaten feststellen, dass die  $MHK$ -Werte über einen großen Bereich verteilt waren. Einzig die französischen Isolate wiesen hinsichtlich Tiamulin einen konstanten  $MHK$ -Wert von  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$  auf.

#### 4.4.3 Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit

Die  $MHK$ -Werte der zur Qualitätssicherung mitgeführten Bakterienstämme *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 und *Staph. aureus* ATCC<sup>®</sup> 29213 sind unter Tabelle 33 aufgeführt und lagen innerhalb der erlaubten Spannweite. Die in dieser Studie ermittelten  $MHK$ -Werte der ORT-Isolate können demzufolge bewertet werden.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde mit den aus vier Durchgängen erzielten und nahezu konstanten  $MHK$ -Werten des Standardstammes ORT B (GGD 1261/91) bestätigt.

Ergebnisse

Tabelle 33: MHK-Werte der Qualitätsstämme *E. coli* ATCC® 25922 und *Staph. aureus* ATCC® 29213 sowie des Referenzstammes GGD 1261/91 (ORT B)

Isolat	Pen G	Ery	Amp	Cef	Enro	Lin	Tet	SXT	Tia
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	≤ 0,12	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	4	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	0,12	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>E. coli</i>	> 8	> 32	2	0,25	≤ 0,06	> 8	1	≤ 0,25/4,75	> 32
<i>Staph. aureus</i>	0,5	0,5	≤ 0,5	0,5	0,12	1	0,25	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	0,5	0,5	≤ 0,5	0,5	0,12	1	0,25	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	0,5	1	≤ 0,5	1	0,12	1	0,25	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
<i>Staph. aureus</i>	0,5	0,5	≤ 0,5	0,5	0,12	1	0,5	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	0,5	0,5	≤ 0,5	0,5	0,12	0,5	0,5	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
<i>Staph. aureus</i>	0,5	≤ 0,12	≤ 0,5	0,5	0,12	1	0,25	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	4	0,5	1	0,5	0,12	1	0,5	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	0,5	≤ 0,12	≤ 0,5	0,5	0,12	1	0,25	≤ 0,25/4,75	1
<i>Staph. aureus</i>	1	1	1	0,5	0,25	1	0,5	≤ 0,25/4,75	1
ORT B	1	1	≤ 0,5	4	8	0,25	0,5	16/304	≤ 0,5
ORT B	2	1	1	4	8	0,25	0,5	8/152	≤ 0,5
ORT B	1	2	1	4	8	0,25	0,25	8/152	≤ 0,5
ORT B	1	1	≤ 0,5	4	8	0,25	0,25	4/76	≤ 0,5

## 5 Diskussion

### 5.1 Erregercharakterisierung und Typisierung

Im ersten Teil der Arbeit galt es, die eingesandten Isolate eindeutig als ORT zu identifizieren sowie bei Bestätigung diese mittels Serotypisierung zu charakterisieren.

Die Vielzahl der auf Columbia-Agar kultivierten ORT-Isolate wiesen runde, glatte, opaque, nicht hämolysierende Kolonien auf, deren Durchmesser ca. 2-3 mm betrug. Daneben existierten auch Stämme, deren Kolonien Durchmesser von ca. 1 mm aufwiesen und die nahezu farblos wirkten. In der verfügbaren Literatur beschrieben bereits Vandamme *et al.* (1994), Travers (1996) und Post *et al.* (1999) variierende Koloniegrößen bzw. Durchmesser. Ebenso stellten Tsai und Huang (2006) bei taiwanesischen Hühner- und Taubenisolaten Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 1,5-2 mm fest, wobei die Taubenisolate einen signifikant höheren Prozentsatz an Isolaten mit kleineren Kolonien aufwiesen.

In der anschließenden Gramfärbung, in der sich alle Isolate als gramnegativ darstellten, wurde die von Charlton *et al.* (1993) und Hafez *et al.* (1993) beschriebene pleomorphe Morphologie der Bakterien bestätigt.

Unter Verwendung des DrySlide™Oxidase-Tests gelang für 90,91% der deutschen und 100% der französischen Isolate der Nachweis des Enzyms Cytochromoxidase. Vandamme *et al.* (1994) ermittelte unter Verwendung verschiedener Verfahren (Pathotec System; Kovacs´ Reagenz) Isolate, bei denen dieses Enzym nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen gelang es den Autoren unter Anwendung nach der von Kersters und De Ley (1971; zitiert nach Vandamme *et al.*, 1994) und Mannheim *et al.* (1980; zitiert nach Vandamme *et al.*, 1994) beschriebenen Methode bei allen Isolaten Cytochromoxidase nachzuweisen. Mit der letztgenannten Methode gelangen Ryll *et al.* (2002) die Erstbeschreibung eines deutschen, aus der Pute isolierten ORT-Stammes mit nicht nachweisbarer Cytochromoxidase. Travers *et al.* (1996) beschrieben ohne Nennung der angewendeten Methode die Isolierung eines Cytochromoxidase-negativen Stammes aus Masthähnchen in Südafrika.

Die Verwendung der biochemischen Testreihe API NE 20 zur Identifizierung von Mikroorganismen setzt das Vorhandensein des Enzyms Cytochromoxidase voraus. Aufgrund der beschriebenen Isolierungen von Isolaten, bei denen dieses Enzym nicht nachgewiesen worden ist, wurden auch in der gegenwärtigen Studie Cytochromoxidase-negative Isolate mittels API NE 20 biochemisch identifiziert.

Für 77,27% der deutschen sowie 96,55% der französischen Isolate wurde das Reaktionsprofil 0-0-2-0-0-4 ermittelt, das das Vorhandensein der Enzyme  $\beta$ -Galaktosidase und Cytochromoxidase, aber eine negative Reaktion für die Ureaseaktivität beinhaltet.

Dieses Profil ist in der Datenbank des Herstellers zwar nicht für ORT hinterlegt, traf jedoch für 34% der Isolate in der Untersuchung von van Empel *et al.* (1997) zu. Ein weiterer, bei 65% der untersuchten Isolate ermittelter Reaktionscode, der die Präsenz der Urease belegt, lautete 0-2-2-0-0-4 (van Empel *et al.*, 1997). Dieses Profil wurde in der gegenwärtigen Untersuchung für 12 (13,64%) der deutschen sowie für 1 (3,45%) der französischen Isolate ermittelt. In der Untersuchung von Vandamme *et al.* (1994) wurde unter Verwendung des Lautrops-Test bei allen untersuchten Isolaten Ureaseaktivität nachgewiesen, jedoch nicht unter Nutzung des Christensen-Mediums. Des Weiteren zeigte das Enzym Urease temperatur-abhängige Reaktionen (Van Beek *et al.*, 1994) auch im API 20 NE (van Empel *et al.*, 1997). In der gegenwärtigen Untersuchung ergab sich aufgrund des Fehlens der Cytochromoxidase und der negativen Reaktion für Ureaseaktivität für 8 (9,1%) der deutschen Isolate ein dritter Reaktionscode 0-0-2-0-0-0.

Mit der von van Empel (1998b) beschriebenen spezifischen PCR zur Identifizierung von ORT wurden alle mittels Kultivierung, Gramfärbung und biochemischer Testreihe verdächtigen Isolate eindeutig als ORT identifiziert. Er empfahl zur Durchführung der PCR die Verwendung von Kolonien, die nicht älter als 48 h waren. Unter Verwendung älterer Kulturen gelang in den meisten Fällen, ohne Nennung möglicher Gründe, kein positiver Nachweis. In der gegenwärtigen Untersuchung wurde dieser Zeitraum nicht immer eingehalten. Wenn es sich aber bei dem Isolat tatsächlich um ORT handelte, wurde auch mit älterem Koloniematerial ein positives Ergebnis erzielt.

In der anschließenden Serotypisierung unter Verwendung des AGP wurden innerhalb der deutschen Isolate die acht Serotypen A, B, C, D, E, H, I, J, innerhalb der französischen Isolate die vier Serotypen A, C, I, J unterschieden. In der gegenwärtigen Studie war die Mehrheit der deutschen Isolate (32; 36,4%) dem Serotypen A zuzuordnen. Die verbleibenden 58 deutschen Isolate verteilten sich auf die Serotypgruppen B (12; 13,6%), C (13; 14,8%), D und I (je 4; je 4,6%), E und J (je 5; je 5,7%) sowie H (1; 1,1%). Bezüglich der französischen Isolate lag der Anteil an der Serotypgruppe A mit 58,6% (17 Isolate) weitaus höher als die Anteile an den Serotypgruppen C, I und J (je 3; je 10,3%). Wie bereits van Empel *et al.* (1997) feststellten, gestaltete sich damit die Verteilung der Serotypen innerhalb der Putenisolate als heterogen, jedoch mit der größten Häufigkeit von Serotyp A. Dagegen ermittelte Popp (2003) unter 72 deutschen Putenisolaten unter anderem 19-mal den Serotyp A und 21-mal den Serotypen B. Sowohl innerhalb der deutschen als auch innerhalb der französischen Gruppe wurden Isolate als Serotyp C charakterisiert. Dieses Ergebnis steht Literaturangaben entgegen, die vom Nachweis dieses Serotyps nur in der Geflügelpopulation der USA berichten (van Empel *et al.*, 1997; Chin und Charlton, 1998; Hafez, 1998a; van Empel, 1998b) bzw. den Serotyp C neben den Serotypen A und I als dominierend in der Putenpopulation der Mittleren Staaten betrachten (Nagaraja, zitiert nach Thachil *et al.*, 2007).

Wahrscheinliche Gründe für die Verbreitung des Serotyps C könnten in der herrschenden Globalisierung mit den zunehmenden Ex- und Importen sämtlicher Geflügelprodukte und der von van Veen *et al.* (2004) nachgewiesenen vertikalen Übertragung von ORT von (Puten-) Elterntieren auf die Nachkommen liegen.

Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen A, B, D, E, F, I, J, P und Q traten bei 12 (13,6%) deutschen Isolaten auf. Von drei französischen Isolaten kam es bei 2 (6,9%) zu beobachteten Kreuzreaktionen zwischen I und J; das dritte Isolat wies eine Kreuzreaktion zwischen den Serotypen B und C auf. Vom Auftreten dieser Reaktionen, besonders zwischen den Serotypen A, B und E, berichteten bereits van Empel *et al.* (1997) sowie Hafez und Sting (1999). Auch bei den Serotypen D, F und G traten diese Reaktionen auf (van Empel, 1998a). Berichte von Kreuzreaktionen unter Beteiligung der Serotypen C, I, J, P und Q sind der verfügbaren Literatur nicht zu entnehmen.

## 5.2 Untersuchung zur Genotypisierung mittels Fingerprinting

Aus epidemiologischer Sicht haben die in einem Ausbruch involvierten Organismen einen gemeinsamen Ursprung und werden deshalb als Klone bezeichnet. Diese Klone gehören der gleichen Spezies mit den gleichen Virulenzfaktoren, biochemischen Eigenschaften und genomischen Charakteristika an. Trotzdem ist aufgrund bestehender Unterschiede auf dem Speziesniveau eine Differenzierung oder eine Klassifizierung in Subtypen oder Stämmen möglich. Dabei ist die Subtypisierung bedeutend für die Epidemiologie, ermöglicht sie doch das Erkennen von Infektionsausbrüchen, die Bestimmung der Infektionsquelle und die Erkennung virulenter Organismen (Olive und Bean, 1999).

Die Unzulänglichkeiten phänotypisch-basierender Typisierungsmethoden führte zur Entwicklung von Methoden, die auf DNA-Sequenzen des Mikroorganismus beruhen. Zwei dieser Methoden sind die Rep-PCR und die RAPD-PCR, die in dieser Arbeit auf die Fähigkeit zur Differenzierung von ORT-Isolaten untersucht worden sind.

Dabei werden mittels Rep-PCR DNA-Fingerprints hervorgerufen, die die Diskriminierung zwischen Bakterienstämmen erlaubt (de la Puente-Redondo *et al.*, 2000). Hierbei binden Primer an repetitiven Elementen des prokaryotischen Genoms. Die nach Fraktionierung der Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese erhaltenen Muster bzw. Fingerprints erlauben eine klare Unterscheidung zwischen verschiedenen eubakteriellen Spezies und Stämmen (Versalovic *et al.*, 1991). Die am häufigsten genutzten repetitiven Elemente, die für Genotypisierungszwecke eingesetzt werden, stellen die 126 bp-großen „enterobacterial repetitive intergenic consensus“ (ERIC)-Elemente dar (de la Puente-Redondo *et al.*, 2000). In dieser PCR werden die Distanzen zwischen den ERIC-Sequenzen ermittelt, die dann spezifisch für eine Bakterienspezies oder einen einzelnen Stamm sein können (Versalovic *et al.*, 1991). Eine Identifikation bzw. Klassifikation von Bakterien ist somit möglich.

Die RAPD als weitere Möglichkeit der Genotypisierung von Mikroorganismen wurde erstmals von Williams *et al.* (1990) sowie Welsh und McClelland (1990) beschrieben. Dieser Ansatz basiert auf der Nutzung kurzer 10-20 bp Primer mit zufälliger Sequenz (short random sequence primers), die mit genügender Affinität zu chromosomalen DNA-Sequenzen bei niedrigen Annealing-Temperaturen hybridisieren (de la Puente-Redondo *et al.*, 2000). Aufgrund der variierenden Anzahl und Position der Bindungsstellen der Primer innerhalb verschiedener Stämme einer Spezies resultiert die anschließende Auftrennung des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese in ein charakteristisches Bandenmuster für jeden Bakterienstamm (Olive und Bean, 1999).

Primersequenzen, die das beste DNA-Bandenmuster zur Differenzierung erzeugen, müssen normalerweise empirisch bestimmt werden. Allerdings wurde in den letzten Jahren eine einheitliche M 13-Sequenz als Primer in den RAPD-Untersuchungen zwecks Standardisierung genutzt (Olive und Bean, 1999). Der in der gegenwärtigen Studie verwendete Primer M 13 stellt die Core-Sequenz des Bakteriophagen M 13 dar.

Bisher wurde mit diesen beiden Methoden eine Vielzahl von Bakterien typisiert. So erlaubt die Rep-PCR die Differenzierung von Spezies und Stämmen von beispielsweise *Bartonella* (Rodriguez-Barradas *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 1998), *Bacillus subtilis* (Versalovic *et al.*, 1991), *Enterobacter aerogenes* (Georghiou *et al.*, 1994), *Helicobacter pylori* (Kwon *et al.*, 1998), methillin-resistenten *Staph. aureus* (Del Vecchio *et al.*, 1995), *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* (Hulton *et al.*, 1991; Lopez-Molina *et al.*, 1998) und *Francisella tularensis* (de la Puente-Redondo *et al.*, 2000). Zur Unterscheidung von *Acinetobacter baumannii* (Gräser *et al.*, 1993; Reboli *et al.*, 1994), *Leptospiren* (Ralph *et al.*, 1993), *Helicobacter pylori* (Akopyanz *et al.*, 1992), *Proteus mirabilis* (Bingen *et al.*, 1993), *Haemophilus somnus* (Myers *et al.*, 1993), *Staph. aureus* (Saulnier *et al.*, 1993) wurde die RAPD erfolgreich eingesetzt. Jedoch zeigten Vila *et al.* (1996) mit ihrer Studie, dass die Unterscheidungskraft zwischen Isolaten des *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii*-Komplexes mittels ERIC-PCR größer war als für die RAPD-PCR unter Nutzung von M 13.

Die generelle Anwendbarkeit der ERIC-PCR in Bezug auf ORT, die unter Nutzung des Primers ERIC 1R durchgeführt wurde und die unterschiedliche Fragmentmuster der getesteten Standardserotypen A, B, C, D, E und G hervorbrachte, zeigten Hafez und Beyer (1997). Amonsin *et al.* (1997) ordneten mittels dieser Methode 55 ORT-Isolate aus acht Ländern und vier Kontinenten sieben verschiedenen Fragmentmustern zu. Die Autoren leiteten aus ihren Ergebnissen eine eher klonale Populationsstruktur innerhalb von ORT sowie eine geographische Komponente in dieser Populationsstruktur ab. Basierend auf der Phylogenie, die durch Analyse der Rep-PCR-Bandenmuster entstand, vermuteten die Autoren eine Wirtsspezifität unter den ORT-Klonen; so zeigten Klone, die *Passeriformes* infizierten, genetische Unterschiede im Vergleich zu den Klonen, die *Galliformes* infizierten.

Koga und Zavaleta (2005) wiesen mit den gleichen Primern bei 25 ORT-Isolaten von Masthähnchen, Legehennen, Mastelertieren und Puten ein vergleichbares genetisches Profil nach wie beim Standardstamm ORT ATCC 51463, Serotyp A.

Nachdem in der gegenwärtigen Untersuchung aufgrund des Vorversuches die Eignung des Primers M 13 in der RAPD-PCR ermittelt wurde, folgte die Anwendung der RAPD-PCR an allen verfügbaren ORT-Standardserotypen (A-Q). Differenzierbare Bandenmuster wurden für die Standardstämme ORT A, B, D, E, F, G, I, K, M und O festgestellt. Da sich unter ihnen die am häufigsten auftretenden Serotypen befinden (van Empel *et al.*, 1997), wäre eine Typisierung anhand dieser Methode denkbar. Nahezu identische Bandenmuster wurden dagegen für die Standardstämme ORT C, H und Q, ORT J und L sowie ORT N und P festgestellt. Die mangelnde Differenzierbarkeit der Serotypen N und P wäre aufgrund des seltenen Auftretens dieser Serotypen eventuell vernachlässigbar, bedarf aber weiterer Untersuchungen. Besonders im Hinblick auf die Serotypen C und J, die im Rahmen dieser Arbeit sehr häufig charakterisiert wurden, ist die fehlende Unterscheidbarkeit als Nachteil zu werten. Hafez und Beyer (1997) erhielten in ihrer Studie unter Anwendung des Primers M 13 sowie des Primers ERIC 1R für die getesteten Standardstämme A, B, C, D, E und G unterscheidbare Fragmentmuster (Hafez und Hess, 1999). In Bezug auf den Primer M 13 traf dieser Sachverhalt bis auf den Standardstamm ORT C auch in der gegenwärtigen Studie zu. Der Grund der ungleichen Ergebnisse liegt sehr wahrscheinlich in den unterschiedlichen Amplifikationsbedingungen. Auf leichte Veränderungen der Annealing-Temperatur reagiert die Amplifikation der RAPD-PCR gemäß Olive und Bean (1999) sehr empfindlich und mit variierenden Bandenmustern. Um die Reproduzierbarkeit der RAPD-PCR in der aktuellen Arbeit zu überprüfen, wurde immer ein Vergleichsstamm mitgeführt.

Zu ebenfalls unterschiedlichen Ergebnissen kamen Thachil *et al.* (2007). Sie differenzierten mittels des Universalprimers M 13 (andere Sequenz als die Core-Sequenz des Phagen M 13) die Standardserotypen C, D, E, I, J und K; dagegen waren die Standardserotypen A und F anhand ihres Bandenmusters nicht zu unterscheiden. Auch das von Popp (2003) durchgeführte DNA-Fingerprinting mittels Pulsfeldgelelektrophorese ließ verschiedene Serotypen mit geringer genetischer Abweichung erkennen. Dabei erwiesen sich die Serotypen P und O, E und N sowie C, D, F, H, J, L und Q als nah verwandt, was die Autorin vermuten ließ, dass diese eher als Subtypen anzusehen sind.

Anschließend wurden zufällig ausgewählte Feldisolate der Serotypgruppen A, B, C und E mittels der RAPD-PCR untersucht und die erhaltenen Bandenmuster mit dem jeweiligen Standardstamm sowie innerhalb der Feldisolatgruppen verglichen. Dabei wiesen die Feldisolate des Serotyps A ein nahezu identisches Bandenmuster auf und auch die ermittelte genetische Ähnlichkeit von 91% war bedeutend höher als die von Feldisolaten anderer Serotypgruppen untereinander, die mehrere verschiedene Bandenmuster aufwiesen. Im



Vergleich der Fragmentmuster der Standardstämme zu den Fragmentmustern der zugehörigen Feldisolate wurden die geringsten Unterschiede ebenfalls in der Serotypgruppe ORT A festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen die Muster der Standardstämme B, C und E nur sehr wenige Übereinstimmungen zu denen der Feldisolate auf, was durch die geringe genetische Ähnlichkeit ebenso deutlich wurde. Die geringe Diskrepanz zwischen den Isolaten des Serotyp A bestätigen auch die Ergebnisse von Thachil *et al.* (2007), wenn auch unter Nutzung einer anderen M 13-Sequenz. Von 32 Feldisolaten des Serotyps A wiesen 30 Isolate das Fragmentmuster des Standardstammes auf; wogegen zwei Isolate ein anderes Muster aufwiesen. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von Popp (2003), die eine große Vielfalt an Fragmentmustern innerhalb der Isolate des Serotyps A von deutschen Puten erkennen ließen, wobei die genetische Ähnlichkeit mit 84% dennoch groß war. Weiterhin beobachteten Thachil *et al.* (2007) im Rahmen ihrer Studie, dass von 11 Isolaten des Serotyps C nur ein Isolat das Fragmentmuster des Standardstammes aufwies. Auch in der vorliegenden Arbeit betrug die genetische Ähnlichkeit der Feldisolatmuster in Bezug auf den Standardstamm C nur 13% und es wurden fünf verschiedene Muster innerhalb der Feldisolate ermittelt.

Unter Nutzung der MRA stellte Popp (2003) eine größere Anzahl Isolate des Serotyps B fest, deren Fragmentmuster zum Teil in Bezug auf den Standardstamm und untereinander identisch waren. Interessanterweise wiesen die in der gegenwärtigen Untersuchung mittels AGP eindeutig als Serotyp B charakterisierten Feldisolate in Bezug auf ihren Standardstamm mit 10% die geringste genetische Ähnlichkeit auf. Bei Betrachtung der Fragmentmuster dieser Isolate mit denen der Isolate des Serotyps A zeigte sich dagegen ein nahezu identisches Muster. Die Gründe dafür sind spekulativ. Die betroffenen Isolate stellen sich als genetisch sehr ähnlich dar, sind antigenetisch aber scheinbar unterschiedlich, da sich aus dem AGP ein anderer Serotyp ergibt. Für die genetische Ähnlichkeit sprechen auch die Ableitungen aus den Ergebnissen von Amonsin *et al.* (1997), die feststellten, dass der Hauptteil der ORT-Isolate durch eine kleine Gruppe eng verwandter Klone repräsentiert wird und die meisten Ausbrüche einer Erkrankung in der domestizierten Geflügelpopulation der ganzen Welt aus der Infektion mit einem einzelnen Klon-Komplex resultiert. Zum anderen könnten regionale bzw. geographische Aspekte zugrunde liegen: so sind in beiden Serotypgruppen hauptsächlich Isolate aus Regionen Niedersachsens mit einer konzentrierten Putenhaltung und zu einem geringen Teil Isolate aus Baden-Württemberg und Brandenburg vertreten. Ein Einfluss der Wirtsspezies ist ausgeschlossen, da alle verwendeten Isolate aus Mastputen isoliert worden sind. Für weitere Untersuchungen wäre es denkbar, Feldisolate der Serotypen A und B in größerer Anzahl als in der gegenwärtigen Arbeit der RAPD-PCR zu unterziehen, um genetische Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede zu detektieren.

Mit der RAPD-PCR unter Nutzung des M 13-Primers war es möglich, unterscheidbare Fragmentmuster der meisten ORT-Standardstämme zu produzieren. Innerhalb der Feldisolate der einzelnen Serotypgruppen traten allerdings mehrere verschiedene Muster auf, die nur eine geringe genetische Ähnlichkeit mit dem betreffenden Standardstamm aufwiesen. Somit ist in der Routinediagnostik zumindest unter den aufgeführten Amplifikationsbedingungen mit der RAPD-PCR keine zufrieden stellende Charakterisierung in Serotypen möglich bzw. bietet die RAPD-PCR keinen adäquaten Ersatz für den AGP zur Serotypisierung. Eine Fortführung der Untersuchung an einer größeren Anzahl von Feldisolaten verschiedener Serotypen mittels RAPD-PCR wäre im Hinblick auf die Zeit- und Materialersparnis im Vergleich zum AGP wünschenswert.

### **5.3 Bestimmung der Embryoletalität deutscher Isolate an Hühnerembryonen**

Die Infektion von Hühnerembryonen wurde als eine empfindliche Methode zur Ermittlung der Embryoletalität bzw. Virulenz von Bakterien wie beispielsweise *E. coli* (Nolan *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 2000) und *Campylobacter jejuni* bzw. *coli* (Sturzenhecker, 1995), *Listerien* (Basher *et al.*, 1984) sowie ORT (Popp, 2003) angewandt. Dabei wurde häufig zu bestimmten Zeitpunkten der Anteil der abgestorbenen Embryonen p.i. ermittelt und die Pathogenität über die Mortalitätsrate bestimmt (Wooley *et al.*, 2000). Auch die letale Dosis (LD<sub>50</sub>) sowie der kulturelle Nachweis der Bakterien im Ei oder im Embryo können als weitere Kriterien zur Beurteilung der Virulenz herangezogen werden (Sturzenhecker, 1995). Eine Infektion der Hühnerembryonen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: über die Allantoishöhle, Dottersack, Chorioallantoismembran, Amnionhöhle (Senne, 1998), intravenös (Bumgarner und Finkelstein, 1973) oder des Eintauchverfahrens („Dipping“) (Clark und Buschkens, 1985).

Der Untersuchung zur Embryoletalität der 88 deutschen Isolate ging eine Voruntersuchung bezüglich der geeigneten Beimpfungsrouten sowie der geeigneten Infektionsdosis pro Ei voraus. Dabei wurde deutlich, dass die Beimpfung der Allantoishöhle mit einer ungefähren Infektionsdosis von 1000 KBE pro Ei im Vergleich zur Dottersackbeimpfung die aussagekräftigsten Ergebnisse erzielte. Wooley *et al.* (2000) kamen in ihrer Untersuchung mit *E. coli* ebenfalls zu diesem Schluss, allerdings reichte eine Infektionsdosis von ca. 100 KBE, um zwischen avirulenten und virulenten *E. coli*-Isolaten zu unterscheiden. Popp (2003) nutzte gleichfalls diese Route und strebte eine Infektionsdosis von ca. 500 KBE pro Ei an. Die tatsächlich in das Ei verbrachte Keimmenge wurde jedoch nicht weiter berücksichtigt.

Sowohl niedrig pathogene als auch mäßig pathogene Isolate wiesen tatsächliche Infektionsdosen unter- und oberhalb der angestrebten Infektionsdosis von 1000 KBE pro Ei auf. Im erstellten Streudiagramm ließ sich keine Korrelation zwischen der tatsächlich ins Ei verbrachten Bakterienmenge und der resultierenden Mortalitätsrate feststellen. Dies lässt vermuten, dass die tatsächlich verimpfte Keimmenge eines Stammes scheinbar keinen Einfluss auf die Mortalitätsrate hatte. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch Wooley *et al.* (2000), legten aber eine möglichst stabile Inokulationsmenge zur besseren Vergleichbarkeit nahe.

Die deutschen ORT-Isolate ließen sich anhand des Bewertungsmaßstabes von Popp (2003) in zwei Kategorien einteilen. Basierend auf Bewertung der erzielten Mortalitätsraten wurden 54 (61,4%) der Kategorie „niedrig pathogen“ und 34 (38,6%) Isolate der Kategorie „mäßig pathogen“ zugeordnet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Popp (2003) wurden in der vorliegenden Untersuchung mehr Isolate als „niedrig pathogen“ und keine Isolate als „hoch pathogen“ klassifiziert. Da der Bewertungsmaßstab der Mortalitätsraten gleich und die Rahmenbedingungen beider Studien ähnlich waren, könnte eine mögliche Erklärung in der Infektionsdosis pro Ei liegen. Angestrebt wurden 500 KBE pro Ei (Popp, 2003) bzw. 1000 KBE pro Ei. Eine Keimzahlbestimmung der tatsächlichen Infektionsdosis führte Popp (2003) nicht durch. Aufgrund der Vermutung, dass die Keimmenge eines verimpften Isolates keinen Einfluss auf die Mortalitätsrate hat, wäre es jedoch wahrscheinlicher, dass die Pathogenität der in der gegenwärtigen Studie verwendeten ORT-Isolate abnahm bzw. zumindest nicht zunahm. Es muss jedoch betont werden, dass die von Popp (2003) verwendeten Isolate aus den Jahren 1991-2001 stammten, die der vorliegenden Untersuchung jedoch zwischen 2003 und 2006 isoliert wurden. In verschiedenen Regionen Deutschlands wurden stallspezifische Vakzine und Therapieverfahren angewendet, die zu einer Abnahme pathogener ORT-Stämme geführt haben könnten. Darüber hinaus ist das Auftreten von klinischen Erscheinungen und der Verlauf einer ORT-Infektion von verschiedenen Faktoren bestimmt.

Eine Überarbeitung des Bewertungsmaßstabes der Mortalitätsrate für ORT wäre ratsam. Wie unterschiedlich diese Maßstäbe und damit die Beurteilung ausfallen können, zeigte die Arbeit von Wooley *et al.* (2000): *E. coli*-Isolate mit Mortalitätsraten von < 10% wurden als apathogen, Isolate mit Raten zwischen 10% und 29% wurden als sekundäre Pathogene und Isolate mit einer Mortalität > 29% als pathogen klassifiziert. Zum besseren Verständnis der pathogenen Wirkung von ORT am embryonierten Hühnerei sind Untersuchungen hinsichtlich eventuell vorhandener Virulenzmechanismen und der Schwere der Schäden an den Embryonen notwendig.

Ein Einfluss des Serotyps auf die Mortalitätsrate wurde nicht nachgewiesen. Die Ursache für dieses Ergebnis könnte in der zum Teil sehr geringen Anzahl der Isolate in den einzelnen Serotypgruppen liegen. Ebenso vermuteten mehrere Autoren aufgrund der Ergebnisse aus

Tiermodellen keine deutlichen Unterschiede im Ausmaß der Pathogenität zwischen den verschiedenen Serotypen (van Empel und Hafez, 1999).

Die Reisolierungsraten von ORT aus Dottermaterial überlebender und abgestorbener Embryonen lagen in einem Bereich zwischen 0% und 100%. Die Reisolierungsrate aus Allantoisflüssigkeit abgestorbener Embryonen betrug zwischen 66,7% und 100%, die der überlebenden Embryonen erstreckte sich von 14,3% bis 100%. Eine Reisolierung von ORT aus den genannten Materialien war bis zum 8. Tag p.i. möglich. Varga *et al.* (2001) gelang die Reisolierung bis zum 13. Tag p.i. - hier war die gesamte Beobachtungsperiode von 3 Wochen länger als die der gegenwärtigen Untersuchung (8 Tage).

#### **5.4 Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK)**

In die Untersuchung zum Resistenzverhalten, dem vierten Teil der Arbeit, wurden alle 88 aus Deutschland sowie die 29 aus Frankreich stammenden ORT-Isolate, die alle aus Mastputen verschiedenen Alters isoliert worden waren, einbezogen. Um quantitative Ergebnisse in Form von MHK-Werten zu erzielen, wurde aus wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Gründen die Mikrobouillondilutionsmethode angewendet, die zwecks Standardisierung und hinsichtlich einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Anlehnung an die Vorgaben des CLSI (2002) durchgeführt wurde und an die Anforderungen von ORT angepasst worden ist.

Zur Ermittlung aussagefähiger Daten im Rahmen von Empfindlichkeitsprüfungen spielt die anzuwendende Methodik eine bedeutende Rolle (Rocksinn *et al.*, 2007). Da sowohl auf nationaler wie auch auf internationaler Ebene das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren als Methode der Wahl zur Empfindlichkeitsbestimmung bakterieller Infektionserreger gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen angesehen wird (Luhofner *et al.*, 2004), stand die Erprobung der Eignung der Mikrobouillondilutionsmethode für ORT in Anlehnung an die Durchführungsvorschriften des CLSI und die Erhebung von MHK-Werten zur Beobachtung der Resistenzlage.

Eine Beurteilung der Empfindlichkeit auf Grundlage der MHK-Werte in die Kategorien resistent, sensibel bzw. intermediär ist aufgrund fehlender Grenzwerte (breakpoints) nicht möglich. Diese Grenzwerte werden für Wirkstoffe erarbeitet, gelten jedoch nur für das im Einzelfall originäre pharmazeutische Produkt im zugelassenen Applikations- und Dosierungsschema für die beanspruchten Indikationen und Tierarten (Boettner *et al.*, 2000). So existieren für Hühner und Puten mit einer *Pasteurella multocida*- bzw. *E. coli*-Infektion Grenzwerte für Enrofloxacin (NCCLS, 2002); hinsichtlich einer ORT-Infektion existieren keine Grenzwerte. Aus diesem Grund werden die erzielten Ergebnisse mit MHK-Werten aus der Literatur verglichen.

Fitzgerald *et al.* (1998), Soriano *et al.* (2003) und Popp (2003) bestimmten die Empfindlichkeit von ORT mittels Mikrobouillondilutionsmethode. Allerdings unterschieden sich diese Studien in der geographischen Herkunft sowie des Isolierungszeitraumes der ORT-Isolate, der verwendeten Inokulationsmedien (Herz-Hirn-Bouillon mit bzw. ohne Zusatz von Serum; Pasteurellabouillon) und in den Inkubationsbedingungen der beimpften Mikrotiterplatten, sodass ein Vergleich der Ergebnisse untereinander nur bedingt möglich ist. Soriano *et al.* (2003) bewiesen die Reproduzierbarkeit ihrer Methode mit stabilen MHK-Werten der Kontrollstämme (*E. coli*, *Staph. aureus*) und der ORT-Referenzstämme. Da Popp (2003) im Gegensatz zu Soriano *et al.* (2003) und Fitzgerald *et al.* (1998) unter anderem deutsche Putenisolate in ihrer Untersuchung verwendete und gemäß van Empel und Hafez (1999) die Empfindlichkeit von ORT gegenüber Antibiotika schwankt und von dem Ursprung des Isolates (Land, Spezies) abhängig zu sein scheint, werden die erzielten MHK-Werte mit denen von Popp (2003) verglichen, allerdings immer unter der Beachtung der Verwendung eines anderen Inokulationsmediums. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von Popp (2003) wurden für die einzelnen getesteten Antibiotika in Bezug auf die deutschen Putenisolate die  $MHK_{50}$ ,  $MHK_{90}$  und die Modalwerte ermittelt und mit den Kennzahlen aus der gegenwärtigen Studie verglichen.

Für die Antibiotika Lincomycin und Tetracyclin wurden in beiden Studien die jeweils höchsten verfügbaren Wirkstoffkonzentrationen als  $MHK_{50}$ ,  $MHK_{90}$  und Modalwert erzielt. Mit Anwendung der Agardilution wurde von Devriese *et al.* (1995) und Devriese *et al.* (2001) für belgische ORT-Isolate bezüglich Lincomycin ebenfalls eine Unempfindlichkeit festgestellt. Unter Verwendung der Makrodilutionsmethode stellten Varga *et al.* (2001) eine Wachstumshemmung von Lincomycin erst im oberen Konzentrationsbereich fest.

Das in der gegenwärtigen Untersuchung getestete Makrolid-Antibiotika Erythromycin wies mit  $MHK_{50}$ -,  $MHK_{90}$ - sowie Modalwerten von  $> 32 \mu\text{g/ml}$  einen sehr hohen Wert auf, der auf eine Unwirksamkeit hindeutet. Die *in vitro*-Wirksamkeit von Makrolid-Antibiotika ist gegenüber dem pH-Wert dem Medium, in dem die Bakterien wachsen, empfindlich. Eine Reduktion des pH-Wertes führt zu einer Ionisierung der Makrolid-Moleküle. Aufgrund dieses Vorgangs erfolgt der Eintritt der Makrolide in die Bakterienzellen verlangsamt, dies resultiert wiederum in einem Anstieg der MHK dieses Antibiotikums (Retsema, 1999). Eine Inkubation während der Empfindlichkeitstestung unter  $\text{CO}_2$  führt zu einem Absinken des pH-Wertes und wird demzufolge mit einer signifikanten Reduktion der Wirksamkeit von Makrolid-Antibiotika assoziiert (Retsema, 1999). Ob die unter  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre durchgeführte Inkubation, verbunden mit einem Absinken des pH-Wertes die Ursache für diese Ergebnisse ist oder ob ORT aufgrund bestehender Resistenz gegen dieses Antibiotika unempfindlich ist, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen unter den o. g. Bedingungen sein. Allerdings stellten

bereits van Veen *et al.* (2001) sowie Devriese *et al.* (2001) in der Agardilution eine hohe Anzahl unempfindlicher ORT-Isolate gegenüber Makrolid-Antibiotika fest.

In Bezug auf Penicillin G wurden MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte von 8 mg/ml bzw. > 8 µg/ml festgestellt, die auf eine geringe Empfindlichkeit hindeuten. Popp (2003) stellte für Penicillin G ebenfalls MHK-Werte fest, aus denen MHK<sub>50</sub>- bzw. MHK<sub>90</sub>-Werte von 0,5 µg/ml und 2 µg/ml hervorgehen. In einem in letzter Zeit vermehrten Auftreten der Nekrotisierenden Enteritis (NE) in Geflügelbeständen, verursacht durch *Clostridien*-Infektion, und dem Verbot antibiotischer Leistungsförderer (Anonymus, 2003b) sowie stetiger Behandlung der klinischen Fälle der NE mittels Penicillin könnte eine mögliche Erklärung für die abnehmende Empfindlichkeit von ORT gegenüber Penicillin liegen.

Die ermittelten MHK-Kennzahlen hinsichtlich Ceftiofur ließen in der gegenwärtigen Untersuchung eine zunehmende Unempfindlichkeit der Isolate im Vergleich zu den Ergebnissen von Popp (2003) erkennen. Allerdings berichteten Devriese *et al.* (2001) ebenfalls bei aus Broilern isolierten Stämmen von Unempfindlichkeiten gegenüber Ceftiofur sowie Ampicillin. Letztgenannter Wirkstoff wies in der gegenwärtigen Studie eine höhere MHK<sub>50</sub> und eine hohe MHK<sub>90</sub> auf, sodass von einer sehr geringen Empfindlichkeit ausgegangen werden kann. Der gleiche Sachverhalt traf für die Wirkstoffkombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol zu. Eine Vielzahl von Autoren ermittelten unter Anwendung verschiedener Empfindlichkeitstests die *in vitro* Unempfindlichkeit potenziertester Sulfonamide (Hafez *et al.*, 1993; De Rosa *et al.*, 1996; Odor *et al.*, 1997; Hafez und Friedrich, 1998; El-Sukhon *et al.*, 2002; Popp, 2003; Soriano *et al.*, 2003; Tsai und Huang, 2006; Bostvironnois und Zadjian, 2008).

Die für Enrofloxacin erzielten Ergebnisse mit daraus resultierenden MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werten befanden sich im höheren Konzentrationsbereich und ähnelten denen von Popp (2003). Auf geringe Empfindlichkeiten von ORT hinsichtlich diesen Wirkstoffes schlussfolgerten bereits Devriese *et al.* (1995), Devriese *et al.* (2001), Varga *et al.* (2001) und Soriano *et al.* (2003) aus den Untersuchungen mittels Bouillondilutionsverfahren. Anhand der Ergebnisse aus dem Agardiffusionstest leiteten Hafez *et al.* (1993) eine scheinbare Primärresistenz von ORT gegenüber Enrofloxacin ab. Dagegen stellte Behr (2007) für deutsche Isolate eine rückläufige Sensitivität fest. Marien *et al.* (2006) gelang es, bei ORT-Feldisolaten mit geringer Empfindlichkeit gegenüber Enrofloxacin Punktmutationen auf einem für Fluorochinolon-Resistenzen bekannten Genabschnitt nachzuweisen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der gegenwärtigen Studie ergab sich für den Wirkstoff Tiamulin der geringste MHK<sub>50</sub>- und geringste MHK<sub>90</sub>-Wert von allen getesteten Antibiotika. Im Gegensatz zu den mituntersuchten französischen Stämmen, bei denen alle bereits bei der geringsten Wirkstoffkonzentration in ihrem Wachstum gehemmt wurden, traten unter den deutschen Isolaten auch MHK-Werte auf, die oberhalb der höchsten verfügbaren

Wirkstoffkonzentration lagen ( $> 32 \mu\text{g/ml}$ ). Diese Isolate stellen Ausreißer dar, zeigen aber die enorme Bedeutung eines Antibioogramms vor einer Behandlung. Sehr niedrige MHK-Werte wurden von Devriese *et al.* (2001), Varga *et al.* (2001) sowie Popp (2003) unter Anwendung der Bouillondilutionsverfahren ermittelt. Ein Grund für diese *in vitro* Wirksamkeit von Tiamulin könnte im selteneren Einsatz dieses Wirkstoffes in der Geflügelhaltung liegen, obwohl er in einigen Arzneimitteln für die Metaphylaxe der Mykoplasmenpneumonie, Infektiösen Sinusitis und Infektiösen Synovitis für Hühner und Puten zugelassen ist ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de); Stand vom 08.03.2009). Der Wirkungsmechanismus von Tiamulin, die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen, wäre ein weiterer Ansatzpunkt. Es muss jedoch beachtet werden, dass auch Makrolide (Erythromycin) und Lincosamide (Lincomycin) an diese Untereinheit binden und in der vorliegenden Untersuchung hohe MHK-Werte hervorbrachten. Eine Empfehlung zur Durchführung einer klinischen Studie an mit ORT experimentell infizierten Tieren zur Bestätigung der *in vitro* Wirksamkeit kann ausgesprochen werden.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Ergebnisse aus der Mikrobouillondilutionsmethode unter Verwendung französischer Isolate. Neueste Ergebnisse zur Empfindlichkeit französischer Isolate brachten Bostvironnois und Zadjian (2008). Allerdings wurden zur angewendeten Methode und zum Bereich der getesteten Antibiotika keine Angaben gemacht.

Die  $\text{MHK}_{50}$ -Werte für Erythromycin, Ampicillin, Enrofloxacin, Lincomycin und Tetracyclin der 29 französischen Isolate waren gleich den Werten der deutschen Isolate und befanden sich im mittleren bis hohen Konzentrationsbereich. Die geringe bzw. abnehmende Empfindlichkeit von ORT gegenüber Tetracyclin und Enrofloxacin beobachteten auch Bostvironnois und Zadjian (2008). Hinsichtlich Trimethoprim/Sulfamethoxazol wurden im Vergleich zu den deutschen Isolaten  $\text{MHK}_{50}$ - bzw.  $\text{MHK}_{90}$ -Werte ermittelt, die ein bis zwei Verdünnungsstufen unter den Werten der deutschen Stämme lagen. Diese Werte befinden sich jedoch auch im mittleren bis hohen Konzentrationsbereich, sodass auch hier wie von Bostvironnois und Zadjian (2008) eine geringe Empfindlichkeit vermutet werden kann.

Werden die MHK-Werte der deutschen Isolate mit den Werten für den Referenzstamm ORT B (GGD 1261/91) verglichen, so wird deutlich, dass ORT B nahezu (bis auf Trimethoprim/Sulfamethoxazol) MHK-Werte im niedrigen Konzentrationsbereich aufweist. Es wäre denkbar, dass ORT B (GGD 1261/91) die natürliche Sensitivität repräsentiert, obwohl diese Werte bereits im höheren Konzentrationsbereich liegen als die von Wildvögeln (Krähen) stammenden Isolate, die von Devriese *et al.* (1995) auf die natürliche Sensitivität untersucht worden sind. Die bereits von Devriese *et al.* (1995) geäußerte Schlussfolgerung des häufigen Auftretens der erworbenen Antibiotikaresistenz kann auch mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden.

Die Einstellung einer Bakteriensuspension auf den McFarland-Standard 0,5, der einen bestimmten Lebendkeimgehalt impliziert, wurde unter den Dilutionsverfahren - insbesondere bei der Agardilution - vorgenommen (Devriese *et al.*, 1995; Devriese *et al.*, 2001). Soriano *et al.* (2003) verdünnten die Bakteriensuspension so weit, dass der Lebendkeimgehalt pro Kavität der verwendeten Mikrotiterplatten ca.  $5 \times 10^4$  KBE betrug. Dieser Lebendkeimgehalt wurde in den meisten Fällen in der gegenwärtigen Studie ebenfalls erzielt. Eine Abhängigkeit der zwischen dem Lebendkeimgehalt und der erzielten MHK-Werte scheint nicht zu existieren.

Die beschriebenen Inkubationsbedingungen erwiesen sich für die Empfindlichkeitsbestimmung von ORT mittels Mikrobouillondilution als geeignet. Die Arbeit von Popp (2003) bestätigte ebenfalls diese Bedingungen. Im Gegensatz dazu gelang die Empfindlichkeitstestung mittels Mikrobouillondilution auch unter einer 24stündigen Inkubation unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Fitzgerald *et al.*, 1998) bzw. unter einer 48stündigen Inkubation ohne CO<sub>2</sub>-Zusatz (Soriano *et al.*, 2003). In der von Varga *et al.* (2001) angewendeten Makrodilution genügte eine 48stündige Inkubation ohne CO<sub>2</sub>-Zusatz für die Ermittlung von MHK-Werten. Einigkeit unter den Autoren herrscht dagegen bei Anwendung der Agardilution zur Bestimmung der Empfindlichkeit: die Inkubation wurde für 48 Stunden unter 5-10% CO<sub>2</sub> durchgeführt (Devriese *et al.*, 1995; Devriese *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2001). Eine einheitliche Methodik, die auch einen bestimmten Lebendkeimgehalt sowie einheitliche Inkubationsbedingungen beinhaltet, wäre zur Vergleichbarkeit ermittelter MHK-Werte von ORT auf nationaler und internationaler Ebene erstrebenswert.



## **6 Zusammenfassung**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung und Charakterisierung von ORT-Isolaten deutscher und französischer Herkunft, die im Zeitraum zwischen 2003 und 2006 aus erkrankten Mastputen unterschiedlichen Alters isoliert worden waren, im Vordergrund.

Mittels Kultivierung sowie der Anwendung biochemischer und molekularbiologischer Methoden wurden insgesamt 117 Feldisolate eindeutig als ORT identifiziert, die sich zum Teil in ihrer Kolonimorphologie und den biochemischen Merkmalen wie Cytochromoxidase- bzw. Ureaseaktivität unterschieden. In der sich anschließenden Serotypisierung mittels AGP wurden die 88 deutschen Isolate den Serotypgruppen A, B, C, D, E, H, I und J sowie die 29 französischen den Gruppen A, C, I und J zugeordnet. Innerhalb dieser heterogenen Verteilung trat der Serotyp A jedoch am häufigsten auf. Auffällig war das vermehrte Auftreten des Serotyps C sowohl innerhalb der deutschen (14,8%) als auch der französischen (10,3%) Isolate. Ebenso wurden in beiden Isolatgruppen Isolate mit Kreuzreaktionen festgestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit, der Genotypisierung mittels Fingerprinting, wurde zunächst die Eignung der Primer ERIC 1R und ERIC 2 sowie des Primers M 13 und der zugehörigen PCR-Methode (ERIC-PCR bzw. RAPD-PCR) ermittelt. Die RAPD unter Nutzung des Primers M 13 war geeignet, unterscheidbare Fragmentmuster der Standardserotypen A, B, D, E, F, G, I, K, M und O zu produzieren. Dagegen wiesen die Fragmentmuster der Standardstämme C, H und Q, J und L sowie N und P große Ähnlichkeit zueinander auf, sodass eine Differenzierung zwischen diesen Serotypen nicht möglich war. Im weiteren Verlauf wurden ausgewählte deutsche ORT-Isolate der Serotypgruppen A, B, C und E der RAPD-PCR unterzogen. Es wurde festgestellt, dass die Fragmentmuster der Feldisolate des Serotyps A sowohl untereinander als auch im Hinblick auf das Muster ihres Standardstammes die größte genetische Ähnlichkeit aufwiesen (92% bzw. 79%). Die als Serotyp B charakterisierten Feldisolate wiesen eine sehr geringe genetische Ähnlichkeit zu ihrem Standardstamm (10%) auf und zeigten zwei unterschiedliche Fragmentmuster, die wiederum eine große Vergleichbarkeit mit den Mustern der Feldisolate des Serotyps A offenbarten. Für die verbleibenden Isolate der Serotypgruppen C und E wurde eine Vielzahl an Fragmentmustern erstellt. Die genetische Ähnlichkeit zwischen den Mustern der Feldisolate und ihrer Standardstämme war mit 13% (Serotyp C) und 27% (Serotyp E) als gering einzustufen. Eine sichere Typisierung mittels Fingerprinting unter Verwendung des Primers M 13 scheint nur für die Isolate des Serotyps A möglich und ist in der Routinediagnostik noch nicht anwendbar.

Der dritte Teil der Arbeit umfasste die Bestimmung der Embryoletalität der 88 deutschen ORT-Isolate an Hühnerembryonen. Die Infektion von Hühnerembryonen erfolgte mit ca.

1000 KBE/Ei über die Allantoishöhle. Anhand der Parameter Mortalitätsrate und Überlebensindex wurden 54 bzw. 69 Isolate als niedrig pathogen sowie 34 bzw. 19 Isolate als mäßig pathogen bewertet. Es wurden keine hoch pathogenen Isolate nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen der tatsächlich verimpften Keimmenge und der aufgetretenen Mortalitätsrate wurde nicht nachgewiesen. Mit der zum Teil sehr geringen Anzahl an Isolaten der einzelnen Serotypgruppen wurde kein Einfluss des Serotyps auf die Mortalitätsrate festgestellt; ein Effekt des Serotyps auf die Überlebensrate kann aufgrund der statistischen Daten dagegen vermutet werden, bedarf aber weiterer Untersuchungen. Mit der Kultivierung von Allantoisflüssigkeit und Dottermaterial abgestorbener und die Beobachtungszeit überlebender Embryonen verlief die Reisolierung von ORT in den meisten Fällen erfolgreich.

Gegenstand des vierten Teils der Arbeit war die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von 88 deutschen und 29 französischen ORT-Feldisolaten unter Anwendung der an die Wachstumsbedingungen von ORT angepassten Mikrobouillondilutionsmethode in Anlehnung an die Protokolle des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Unter Nutzung kommerzieller Sensititre<sup>®</sup>-Mikrotiterplatten wurden MHK-Werte von 9 antimikrobiellen Wirkstoffen gegen ORT ermittelt und diese aufgrund fehlender Grenzwerte in Form von Minimal-, Maximal und Modalwerten sowie der  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$ , getrennt nach beiden Ländern, dargestellt. Mit  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werten im niedrigen Konzentrationsbereich ließen sich alle Isolate gegenüber dem Wirkstoff Tiamulin als empfindlich einstufen. Für die verbleibenden Wirkstoffe Penicillin G, Ampicillin, Enrofloxacin, Erythromycin, Ceftiofur, Lincomycin, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol wurden größtenteils MHK-Werte in sehr hohen Konzentrationsbereichen ermittelt, sodass hier von einer Unempfindlichkeit von ORT sowohl in Deutschland als auch in Frankreich gegenüber diesen Substanzen ausgegangen werden kann.

## 7 Summary

### **Investigations into the embryo lethality, genotyping and resistance to antibiotics of current *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates**

The first part of the present study focussed on the identification and characterisation of German and French ORT isolates, which were isolated between 2003 and 2006 from affected turkeys of different age. By using cultivation as well as biochemical and molecular biological methods, 117 field isolates were unambiguously identified as ORT. The isolates differed in their colony morphology and biochemical characteristics like cytochromoxidase- and urease activity, respectively. After the identification the isolates were serotyped by AGP test. The German isolates were classified as serotypes A, B, C, D, E, H, I or J, while the French isolates were classified as serotypes A, C, I or J. Within this heterogeneous distribution the serotype A appeared most often. The frequent occurrence of serotype C within the German (14,8%) and the French (10,3%) isolates was surprising. In both groups isolates showing cross reactions occurred.

In the second part two fingerprinting methods for ORT genotyping were evaluated. The suitability of primers ERIC 1R and ERIC 2 as well as of primer M 13 and the corresponding PCRs (ERIC-PCR or RAPD-PCR) was determined. RAPD-PCR by using primer M 13 was able to distinguish reference strains of serotypes A, B, D, E, F, G, I, K, M and O based on fragment patterns. In contrast fragment patterns of reference serotypes C, H and Q, J and L as well as N and P were very similar so that a differentiation between these serotypes was not possible. Based on these results selected German isolates of serotype A, B, C and E were investigated by RAPD-PCR. Of all serotypes the patterns of the field isolates of serotype A showed the highest genetic similarity to each other as well as to the pattern of reference serotype A (92% and 79%, respectively). The field isolates characterized as serotype B showed two different patterns which could hardly be differentiated from patterns of serotype A field isolates and had only a slight similarity to the reference serotype B (10%). For the remaining isolates of serotypes C and E a large number of fragment patterns was produced. The genetic similarity between the patterns of the field isolates and their reference serotypes was very low (13%, serotype C; 27%, serotype E). A reliable fingerprinting by RAPD-PCR seems to be possible only for isolates of serotype A.

The third part comprised the determination of embryo lethality of the 88 German ORT isolates. Eggs were inoculated with 1000 cfu *Ornithobacterium rhinotracheale* via allantoic cavity. Based on mortality rate and survival rate 54 and 69 isolates respectively were categorized as low pathogen and 34 and 19 isolates, respectively were categorized as

medium pathogen. No high pathogen isolates were detected. In contrast to former results an increased pathogenicity between 2003 and 2006 was not observed. A correlation between the inoculation dose and the observed mortality rate was not found. Because of the low number of isolates within some serotypes an influence on the serotype on the mortality rate could not be shown. Based on the statistical data an effect of the serotype on the survival rate was suggested, but further investigations are necessary. The reisolation of ORT out of allantoic fluid and yolk material was successful in most cases.

Subject of the fourth part was the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of 88 German and 29 French ORT field isolates using the microbouillon dilution method based on the protocols of Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly: National Committee for Clinical Laboratory Standards). By using commercial Sensititre<sup>®</sup> micro titre plates MIC values of 9 antimicrobial substances against ORT were estimated. Because of missing breakpoints these values were presented as minimal-, maximal- and modal-value as well as MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>. All isolates showed low MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for tiamulin. For the remaining substances penicillin, ampicillin, enrofloxacin, erythromycin, ceftiofur, lincomycin, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole MIC values of high concentrations were estimated. Consequently a resistance so that an insusceptibility of ORT in Germany as well as in France could be assumed.

## 8 Literatur

- Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, S. Kresovich und D. E. Berg (1992): DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 20 (19): 5137-5142
- Allymehr, M. (2006): Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler and broiler breeder chickens in West Azerbaijan Province, Iran. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53 (1): 40-42
- Amonsin, A., J. F. Wellehan, L. L. Li, P. Vandamme, C. Lindeman, M. Edman, R. A. Robinson und V. Kapur (1997): Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* 35 (11): 2894-2898
- Anonymus (1995): *Ornithobacterium rhinotracheale* in ostrich. Khangela quarterly report on animal disease surveillance. National Department of Agriculture, Pretoria, South Africa: 11
- Anonymus (2003a): Erste Ergebnisse des Internationalen Symposiums über Risikoanalyse der Antibiotikaresistenz. Berlin, Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Stand 12.03.2009 ([http://www.bfr.bund.de/cm/232/erste\\_ergebnisse\\_des\\_internationalen\\_symposiums\\_ueber\\_risikoanalyse\\_der\\_antibiotikaresistenz.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/232/erste_ergebnisse_des_internationalen_symposiums_ueber_risikoanalyse_der_antibiotikaresistenz.pdf) Stand 12.03.2009)
- Anonymus (2003b): Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung vom 22. September 2003, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 268, S. 29 vom 18.10.2003
- Anonymus (2005): Zukunft der Nutztierhaltung. *Angewandte Wissenschaft*, Heft 508. Stand 12.03.2009 ([http://www.bmelv.de/nn\\_1132960/SharedDocs/downloads/13-Service/AnWis/Heft508,templatelD=raw,property=publicationFile.pdf/Heft508.pdf](http://www.bmelv.de/nn_1132960/SharedDocs/downloads/13-Service/AnWis/Heft508,templatelD=raw,property=publicationFile.pdf/Heft508.pdf))
- Back, A., R. Gireesh, D. Halvorson und K. Nagaraja (1997): Experimental studies on *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection. *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA*: 7-8
- Back, A., D. Halvorson, G. Rajashekara und K. V. Nagaraja (1998a): Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Vet Diagn Invest* 10 (1): 84-86
- Back, A., G. Rajashekara, R. B. Jeremiah, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (1998b): Tissue distribution of *Ornithobacterium rhinotracheale* in experimentally infected turkeys. *Vet Rec* 143 (2): 52-53
- Back, A., Y. D. Halvorsen, G. Rajashekara, V. C. B. A. Lopes, H. J. Shin und K. V. Nagaraja (1999): Development and evaluation of a polyvalent serum plate agglutination test for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin*. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-75-4: 95-100
- Basher, H. A., D. R. Fowler, F. G. Rodgers, A. Seaman und M. Woodbine (1984): Pathogenesis and growth of *Listeria monocytogenes* in fertile hens' eggs. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 256: 497-509

- Behr, K.-P. (2007): Bacterial colonisation of the respiratory tract: observations in commercial turkey flocks. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Production, Berlin. H. M. Hafez (Ed.). Mensch und Buch Verlag. ISBN: 3-86664-356: 317-324
- Bingen, E., C. Boissinot, P. Desjardins, H. Cave, N. Lambert-Zechovsk, E. Denamur, P. Blot und J. Elion (1993): Arbitrary primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. J Clin Microbiol. 31: 1055-1059
- Bock, R., P. Freidlin, S. Tomer, M. Manoim, A. Inbar, A. Frommer, E. Bermann und S. Pokamunsky (1998): *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT): Current status in Israel. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-53-3: 151-162
- Boettner, A., A. de Jong, P. Schmid, S. Schüller, W. Traeder und S. Weiskopf (2000): Zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (Breakpoints) für veterinärmedizinisch relevante Antibiotika zur Resistenzbeurteilung bei tierpathogenen Erregern. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 113: 344-347
- Bostvironnois, C., und C. Zadjan (2008): ORT-experience from a database on the French Turkey Production. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez (Ed.). Mensch und Buch Verlag, Berlin. ISBN: 978-3-939902-96-6: 102-107
- Bumgarner, L. R., und R. A. Finkelstein (1973): Pathogenesis and immunology of experimental gonococcal infection: virulence of colony types of *Neisseria gonorrhoeae* for chicken embryos. Infect Immun 8 (6): 919-924
- Canal, C. W., J. A. Leao, D. J. Ferreira, M. Macagnan, C. T. P. Salle und A. Back (2003): Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in Southern Brazil. Avian Dis 47: 731-737
- Chansiripornchai, N. (2004): Molecular interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* with eukaryotic cells. Thesis, University of Utrecht. ISBN 90-393-3667-9
- Charlton, B. R., S. E. Channing-Santiago, A. A. Bickford, C. J. Cardona, R. P. Chin, G. L. Cooper, R. Droual, J. S. Jeffrey, C. U. Meteyer, H. L. Shivaprasad und R. Walter (1993): Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. J Vet Diagn Invest 5 (1): 47-51
- Chin, R. , und B. Charlton (1998): Ornithobacteriosis. In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens (4. Edition). Swayne, D. S., J. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson und W. M. Redd (Eds.). American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, USA: 89-91
- Chin, R., P. C. M. van Empel und H. M. Hafez (2003): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Diseases of Poultry (11. Edition). Saif, Y. M., H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald und D. E. Swayne (Eds.). Iowa State University Press, Ames: 683-690
- Clark, A. G., und D. H. Buschkens (1985): Laboratory infection of chicken eggs with *Campylobacter jejuni* by using temperature or pressure differentials. Appl Environ Microbiol 49 (6): 1467-1471

- Clark, S. (1996): The Turkey ORT Scientific Symposium: Summary. Proceedings of the Turkey ORT Scientific Symposium, Roche Animal Nutrition and Health, Minneapolis, Minnesota, USA: 7-11
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS, 22 No. 6, M31-A2
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004): Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS, 24 No. 2, M11-A6
- de la Puente-Redondo, V. A., N. G. del Blanco, C. B. Gutierrez-Martin, F. J. Garcia-Pena und E. F. Rodriguez Ferri (2000): Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J Clin Microbiol 38 (3): 1016-1022
- De Rosa, M., R. Droual, R. P. Chin, H. L. Shivaprasad und R. L. Walker (1996): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. Avian Dis 40 (4): 865-874
- De Rosa, M., R. Droual und R. P. Chin (1997): Interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium* in turkey poults. Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA: 52-53
- Del Vecchio, V. G., J. M. Petroziello, M. J. Gress, F. K. McCleskey, G. P. Melcher, H. K. Crouch und J. R. Lupski (1995): Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. J Clin Microbiol 33 (8): 2141-2144
- Devriese, L. A., J. Hommez, P. Vandamme, K. Kersters und F. Haesebrouck (1995): In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. Vet Rec 137 (17): 435-436
- Devriese, L. A., P. De Herdt und F. Haesebrouck (2001): Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. Avian Pathol 30: 197-200
- Dudouyt, J., J. Leorat, P. van Empel, Y. Gardin und C. Dore (1995): Isolement d'un nouvel agent pathogène chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale*; conduite à tenir. Proceedings des Journées de la recherche avicole, Centre de Congress d'Anger : 240-243
- El-Gohary, A. A. (1998): *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with hatching problems in chicken and turkey eggs. Vet Med J (Giza) 46: 183-191
- El-Gohary, A. A., und M. H. H. Awaad (1998): Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and *E.coli* infection in chicken broilers. Vet Med J (Giza) 46 (1): 67-75
- El-Gohary, A. A., H. A. Sultan und H. M. Hafez (1998): Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and *Pasteurella haemolytica* from commercial chickens. Journal of Egyptian Veterinary Poultry Association: 21-39

- El-Sukhon, S. N., A. Musa und M. Al-Attar (2002): Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in northern and middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. Avian Dis 46 (3): 605-612
- Erganis, O., H. H. Hadimli, K. Kav, M. Corlu und D. Ozturk (2002): A comparative study on detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in meat-type turkeys by dot immunobinding assay, rapid agglutination test and serum agglutination test. Avian Pathol 31 (2): 201-204
- Fitzgerald, S. L., J. M. Greyling und R. R. Bragg (1998): Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomycin. Onderstepoort J Vet Res 65 (4): 317-320
- Georghiou, P. R., A. M. Doggett, M. A. Kielhofner, J. E. Stout, D. A. Watson, J. R. Lupski und R. J. Hamill (1994): Molecular fingerprinting of *Legionella* species by repetitive element PCR. J Clin Microbiol 32 (12): 2989-2994
- Ghazikhanian, G. Y. (1996): *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. Proceedings of the Turkey ORT Scientific Symposium, Roche Animal and Nutrition Health, Minneapolis, Minnesota, USA: 55-59
- Goovaerts, D., M. Vrijenhoek und P. Van Empel (1999): Immunohistochemical and bacteriological investigation of the pathogenesis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens with osteitis and encephalitis syndrome. Proceedings of the 48<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Vancouver, Canada: 79
- Gräser, Y., I. Klare, E. Halle, R. Gantenberg, P. Buchholz, H. D. Jacobi, W. Presber und G. Schonian (1993): Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by using polymerase chain reaction fingerprinting. J Clin Microbiol 31 (9): 2417-2420
- Hafez, H. M., W. Kruse, J. Emele und R. Sting (1993): Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch *Pasteurella*-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases, Potsdam, Deutschland: 105-112
- Hafez, H. M. (1994): Respiratory disease conditions in meat turkeys caused by *Ornithobacterium rhinotracheale*: clinical signs, diagnostics and therapy. Proceedings of the 43<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA: 113-114
- Hafez, H. M. (1996): Current status on the role of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. Arch Geflügelk 60: 208-211
- Hafez, H. M. (1997): *Ornithobacterium rhinotracheale*-Infektion. In: Putenkrankheiten. H. M. Hafez und S. Jodas (Eds.). F. Enke Verlag, Stuttgart: 62-66
- Hafez, H. M., und W. Beyer (1997): Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates using PCR-fingerprints. Proceedings of the XI<sup>th</sup> International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest: 51
- Hafez, H. M., und S. Friedrich (1998): Isolierung von *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) aus Mastputen in Österreich. Tierärztl Umschau 53: 500-504
- Hafez, H. M. (1998a): Current status on the laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" in poultry. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 111 (4): 143-145



- Hafez, H. M. (1998b): Respiratory diseases in turkey: Serological surveillance for antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" and Turkey rhinotracheitis (TRT). Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-53-3: 138-145
- Hafez, H. M. (1998c): *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Poultry Health Conference: Respiratory Diseases, Hannover: 20-29
- Hafez, H. M., S. Jodas, A. Stadler und P. Van Empel (1999): Efficacy of an *Ornithobacterium rhinotracheale* inactivated vaccine in commercial turkey under field condition. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-93-0511-75-4: 107-117
- Hafez, H. M., und R. Sting (1999): Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. Avian Dis 43 (1): 1-7
- Hafez, H. M., und M. Hess (1999): Modern techniques in diagnosis of poultry diseases: Review. Arch Geflügelk 63 (6): 237-245
- Hafez, H. M., A. Mazaheri und R. Sting (2000): Efficacy of ELISA for detection of antibodies against several *Ornithobacterium rhinotracheale* serotypes. Dtsch Tierärztl Wochenschr 107 (4): 142-143
- Hafez, H. M. (2002): Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. International Journal of Poultry Science 1(5): 114-118
- Hafez, H. M., und D. Schulze (2003): Examinations on the efficacy of chemical disinfectants on *Ornithobacterium rhinotracheale* in vitro. Arch Geflügelk 67: 153-156
- Heeder, C. J., V. C. Lopes, K. V. Nagaraja, D. P. Shaw und D. A. Halvorson (2001): Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying hens in the north central region of the United States. Avian Dis 45 (4): 1064-1067
- Hinz, K. H., C. Blome und M. Ryll (1994): Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. Vet Rec 135 (10): 233-234
- Hulton, C. S., C. F. Higgins und P. M. Sharp (1991): ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol Microbiol 5 (4): 825-834
- Hung, A. L., und A. Alvarado (2001): Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. Avian Dis 45 (4): 999-1005
- Jansen, R., N. Chansiripornchai, W. Gaastra und J. P. van Putten (2004): Characterization of plasmid pOR1 from *Ornithobacterium rhinotracheale* and construction of a shuttle plasmid. Appl Environ Microbiol 70 (10): 5853-5858
- Joubert, P., R. Higgins, A. Laperle, I. Mikaelian, D. Venne und A. Silim (1999): Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. Avian Dis 43 (3): 622-626
- Karaca, K., J. M. Sharma und R. Nordgren (1995): Nitric oxide production by chicken macrophages activated by Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. Int J Immunopharmacol 17 (3): 183-188

- Koga, Y., und A. I. Zavaleta (2005): Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Dis* 49 (1): 108-111
- Korbel, R. T., und H. M. Hafez (2001): Blepharokonjunktivitis in einem Putenbestand (*Meleagris gallopavo*). *Tierärztl Prax* 29 (G): 336-338, 381-383
- Kwon, D.-H., F. A. K. El-Zaatari, J.-S. Woo, C.-L. Perng, D. Y. Graham und M. F. Goo (1998): Rep-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* 43: 980-987
- Leorat, J., und L. Mogenet (1998): Bacterial origins of respiratory diseases in turkeys. Practical use of an injectable combination of colistin and spectinomycin. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-53-3: 163-179
- Leroy-Setrin, S., G. Flaujac, K. Thenaisy und E. Chalus-Dancla (1998): Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Lett Appl Microbiol* 26 (3): 189-193
- Lopes, V., G. Rajashekara, A. Back, D. P. Shaw, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (2000): Outer membrane proteins for serologic detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys. *Avian Dis* 44 (4): 957-962
- Lopes, V. C., A. Back, H. J. Shin, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (2002a): Development, characterization, and preliminary evaluation of a temperature-sensitive mutant of *Ornithobacterium rhinotracheale* for potential use as a live vaccine in turkeys. *Avian Dis* 46 (1): 162-168
- Lopes, V., A. Back, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (2002b): Minimization of pathologic changes in *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys by temperature-sensitive mutant strain. *Avian Dis* 46 (1): 177-185
- Lopes, V. C., B. Velayudhan, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (2002c): Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter. *Avian Dis* 46 (4): 1011-1014
- Lopez-Molina, N., I. Laconcha, A. Rementeria, A. Audicana, I. Perales und J. Garaizar (1998): Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. *J Appl Microbiol* 84 (5): 877-882
- Luhofner, G., A. Böttner, H. M. Hafez, M. Kaske, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, A. Richter, C. Sigge, W. Traeder, K.-H. Waldmann, J. Wallmann, C. Werckenthin und S. Schwarz (2004): Vorschläge der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik-Mastitis- und Großtierlayouts. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 120 (1/2): 50-60
- Malik, Y. S., K. Olsen, K. Kumar und S. M. Goyal (2003): In vitro antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Minnesota turkeys during 1996-2002. *Avian Dis* 47 (3): 588-593
- Marien, M., A. Decostere, A. Martel, K. Chiers, R. Froyman und H. Nauwynck (2005): Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Avian Pathol* 34 (3): 204-211

- Marien, M., A. Decostere, H. Nauwynck, R. Froyman, L. Devriese und F. Haesebrouck (2006): In vivo selection of reduced enrofloxacin susceptibility in *Ornithobacterium rhinotracheale* and its resistance-related mutations in *gyrA*. *Microb Drug Resist* 12 (2): 140-144
- Marien, M., A. Decostere, L. Duchateau, K. Chiers, R. Froyman und H. Nauwynck (2007): Efficacy of enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Escherichia coli* O2:K1 dual infection in turkeys following APV priming. *Vet Microbiol* 121 (1-2): 94-104
- Misirlioglu, Ö. Z., S. Türkyilmaz und H. M. Hafez (2006): Report on isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler flocks in Izmir, Turkey. *Arch Geflügelk* 70: 134-138
- Myers, L. E., S. V. Silva, J. D. Procnier und P. B. Little (1993): Genomic fingerprinting of "*Haemophilus somnus*" isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. *J Clin Microbiol* 31 (3): 512-517
- Naeem, K., A. Malik und A. Ullah (2003): Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Pakistan. *Vet Rec* 153 (17): 533-534
- Nagaraja, K., A. Back, S. Sorenger, G. Rajashekara und D. Halvorson (1998): Tissue distribution post-infection and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Proceedings of the 47<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA: 57-60
- Nagaraja, K. V., S. Sprenger, A. Back, D. Shaw und D. Halvorson (1999): *Ornithobacterium rhinotracheale* as a primary pathogen of respiratory disease in turkeys. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-75-4: 101-106
- Nolan, L. K., R. E. Wooley, J. Brown, K. R. Spears, H. W. Dickerson und M. Dekich (1992): Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 36 (2): 395-397
- Odor, E. M., M. Salem, C. R. Pope, B. Sample, M. Primm, K. Vance und M. Murphy (1997): Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva peninsula. *Avian Dis* 41 (1): 257-260
- Olive, D. M., und P. Bean (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37 (6): 1661-1669
- Popp, C., und H. M. Hafez (2003): *Ornithobacterium rhinotracheale*: Differenzierung verschiedener Isolate mittels Serotypisierung und Pulsfeldgelelektrophorese. Tagungsbericht des 64. Geflügelfachgesprächs der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Hannover: 70-78
- Popp, C. (2003): *Ornithobacterium rhinotracheale*: Typisierung, Pathogenität, Resistenzverhalten und Bekämpfung. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin
- Post, K. W., S. C. Murphy, J. B. Boyette und P. M. Resseguie (1999): Evaluation of a commercial system for the identification of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Vet Diagn Invest* 11 (1): 97-99

- Qureshi, M. A., J. A. Marsh, R. R. Dietert, Y. J. Sung, C. Nicolas-Bolnet und J. N. Petite (1994): Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poult Sci* 73 (7): 1027-1034
- Ralph, D., M. McClelland, J. Welsh, G. Baranton und P. Perolat (1993): *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J Bacteriol* 175 (4): 973-981
- Reboli, A. C., E. D. Houston, J. S. Monteforte, C. A. Wood und R. J. Hamill (1994): Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 32 (11): 2635-2640
- Refai, M., A. El-Gohary, S. A. Attia und R. A. Khalifa (2005): Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens by ELISA. *Egypt J Immunol* 12 (1): 87-93
- Retsema, J. A. (1999): Susceptibility and resistance emergence studies with macrolides. AccessionNr.10204635 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10204635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10204635))
- Rocksin, A., G.-F. Gerlach und S. Schwarz (2007): Untersuchungen zur Implementierung des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 120: 42-49
- Rodriguez-Barradas, M. C., R. J. Hamill, E. D. Houston, P. R. Georghiou, J. E. Clarridge, R. L. Regnery und J. E. Koehler (1995): Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol* 33 (5): 1089-1093
- Roepke, D. C., A. Back, D. P. Shaw, K. V. Nagaraja, S. J. Sprenger und D. A. Halvorson (1998): Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. *Avian Dis* 42 (1): 219-221
- Roger, M. F., und J. Leorat (1997): A l'origine de troubles respiratoires chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale* est mieux maîtrisé. *Filières Avicoles Juin 1997*: 62-63
- Ryll, M., K. H. Hinz, H. Salisch und W. Kruse (1996): Pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale* for turkey poults under experimental conditions. *Vet Rec* 139 (1): 19
- Ryll, M., R. Günther, H. M. Hafez und K. H. Hinz (2002): Isolation and differentiation of a cytochrome oxidase-negative strain of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 115 (7-8): 274-277
- Sakai, E., Y. Tokuyama, F. Nonaka, S. Ohishi, Y. Ishikawa, M. Tanaka und A. Taneno (2000): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. *Vet Rec* 146 (17): 502-503
- Salem, M., E. Odor, B. Sample, M. Murphy und G. Franz (1997): *Ornithobacterium rhinotracheale*, update and field survey in the Delmarva Peninsula. *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA*: 59-60

- Sander, A., M. Ruess, S. Bereswill, M. Schuppler und B. Steinbrueckner (1998): Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. J Clin Microbiol 36 (10): 2973-2981
- Saulnier, P., C. Bourneix, G. Prevost und A. Andremont (1993): Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 31 (4): 982-985
- Schuijffel, D. F., P. C. van Empel, A. M. Pennings, J. P. van Putten und P. J. Nuijten (2005a): Passive immunization of immune-suppressed animals: chicken antibodies protect against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Vaccine 23 (26): 3404-3411
- Schuijffel, D. F., P. C. van Empel, A. M. Pennings, J. P. van Putten und P. J. Nuijten (2005b): Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Infect Immun 73 (10): 6812-6821
- Senne, D. A. (1998): Virus propagation in embryonating eggs. In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens (4. Edition). Swayne, D. S., J. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson und W. M. Redd (Eds.). American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, USA: 235-240.
- Sommer, F., und C. Gabler (2000): Detection of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in austrian turkey flocks by ELISA. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez (Ed.). ISBN 3-930511-92-4: 273-280
- Soriano, V. E., M. G. Longinos, P. G. Navarrete und R. P. Fernandez (2002): Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis 46 (3): 686-690
- Soriano, V. E., N. A. Vera, C. R. Salado, R. P. Fernandez und P. J. Blackall (2003): In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. Avian Dis 47 (2): 476-480
- Sprenger, S. J., A. Back, D. P. Shaw, K. V. Nagaraja, D. C. Roepke und D. A. Halvorson (1998): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. Avian Dis 42 (1): 154-161
- Sprenger, S. J., D. A. Halvorson, D. P. Shaw und K. V. Nagaraja (2000a): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: immunoprophylaxis studies. Avian Dis 44 (3): 549-555
- Sprenger, S. J., D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, R. Spasojevic, R. S. Dutton und D. P. Shaw (2000b): *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. Avian Dis 44 (3): 725-729
- Sturzenhecker, K. (1995): Untersuchungen zur Virulenz von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* am standardisierten Infektionsmodell "bebrütetes Hühnerei". Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin
- Szalay, D., R. Glavits, C. Nemes, A. Kosa und L. Fodor (2002): Clinical signs and mortality caused by *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey flocks. Acta Vet Hung 50 (3): 297-305

- Tanyi, J., A. Bistyak, E. Aszanyitzky, F. Vetesi und M. Dobos-Kovacs (1995): Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens, hens and turkeys showing respiratory symptoms. *Magyar Állatorvosok Lapja* 50: 328-330
- Thachil, A. J., B. T. Velayudhan, V. C. Lopes-Berkas, D. A. Halvorson und K. V. Nagaraja (2007): Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. *J Vet Diagn Invest* 19 (4): 417-420
- Timms, L. M., K. L. Jahans und R. N. Marshall (1986): Evidence of immunosuppression in turkey poults affected by rhinotracheitis. *Vet Rec* 119: 91-92
- Travers, A. F. (1996): Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Dis* 40 (2): 488-490
- Travers, A. F., L. Coetzee und G. Gummow (1996): Pathogenicity differences between South African isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Onderstepoort J Vet Res* 63: 197-207
- Trolldenier, H. (1999): Zu Begriffen in der Resistenzbestimmung von Mikroorganismen. *Tierärztl Prax* 27 (K): 163-166
- Tsai, H. J., und C. W. Huang (2006): Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Dis* 50 (4): 502-507
- Türkyilmaz, S. und O. Kaya (2005): Detection of Antibodies produced against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium* by Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Hens and Turkeys in Aydin Province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 29: 897-902
- Van Beek, P., P. Van Empel, G. Van den Bosch, P. Storm, J. Bongers und J. Dupreez (1994): Ademhalingsproblemen, groeivertraging en gewichtsonsteking bij kalkoenen en vleeskoikens door een Pasteurella-achtige bacterie: *Ornithobacterium rhinotracheale* of "Taxon 28". *Tijdschr Diergeneesk* 119: 99-101
- van den Bosch, G. (2001): *Ornithobacterium rhinotracheale*: the current status. Proceedings of the 24<sup>th</sup> Technical Turkey Conference, Manchester. ISSN 0041-428X: 1-5
- van Empel, P., G. van den Bosch, D. Goovaerts und P. Storm (1996): Experimental infection in turkeys and chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Avian Dis* 40: 858-864.
- van Empel, P., H. van den Bosch, P. Loeffen und P. Storm (1997): Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Clin Microbiol* 35 (2): 418-421
- van Empel, P. (1998a): *Ornithobacterium rhinotracheale*: Current status and control. Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H. M. Hafez und A. Mazaheri (Eds.). ISBN 3-930511-53-3: 129-133
- van Empel, P. (1998b): *Ornithobacterium rhinotracheale*. Thesis, University of Utrecht. ISBN 90-393-1574-4
- van Empel, P., und H. van den Bosch (1998): Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Avian Dis* 42 (3): 572-578

- van Empel, P., und H. M. Hafez (1999): *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathol 28: 217-227
- van Empel, P., M. Vrijenhoek, D. Goovaerts und H. van den Bosch (1999): Immunohistochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. Avian Pathol 28: 187-193
- Van Loock, M., T. Geens, L. De Smit, H. Nauwynck, P. Van Empel, C. Naylor, H. M. Hafez, B. M. Goddeeris und D. Vanrompay (2005): Key role of *Chlamydophila psittaci* on Belgian turkey farms in association with other respiratory pathogens. Vet Microbiol 107 (1-2): 91-101
- van Veen, L., C. P. van Empel und T. Fabria (2000a): *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. Avian Dis 44 (4): 896-900
- van Veen, L., E. Gruys, K. Frik und P. van Empel (2000b): Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Vet Rec 147 (15): 422-423
- van Veen, L., E. Hartman und T. Fabri (2001): In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in The Netherlands between 1996 and 1999. Vet Rec 149 (20): 611-613
- van Veen, L., M. Vrijenhoek und P. van Empel (2004): Studies of the transmission routes of *Ornithobacterium rhinotracheale* and immunoprophylaxis to prevent infection in young meat turkeys. Avian Dis 48 (2): 233-237
- van Veen, L., J. Nieuwenhuizen, D. Mekkes, M. Vrijenhoek und P. van Empel (2005): Diagnosis and incidence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections in commercial broiler chickens at slaughter. Vet Rec 156 (10): 315-317
- Vandamme, P., P. Segers, M. Vancanneyt, K. van Hove, R. Mutters, J. Hommez, F. Dewhirst, B. Paster, K. Kersters, E. Falsen, L. A. Devriese, M. Bisgaard, K.-H. Hinz und W. Mannheim (1994): *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. Int J Syst Bacteriol 44 (1): 24-37
- Vandamme, P., M. Vancanneyt, P. Segers, M. Ryll, B. Kohler, W. Ludwig und K. H. Hinz (1999): *Coenonia anatina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2: 867-874
- Varga, J., L. Fodor und L. Makrai (2001): Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs. Acta Vet Hung 49 (2): 125-130
- Vega, V., A. Zepeda, S. Ramirez, V. Morales, P. Fernandez, R. M. de Oca, F. M. Guerra-Infante, M. de Jesus de Haro-Cruz, P. J. Blackall und E. V. Soriano (2008): Hemagglutinating activity of serovar reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Vet Diagn Invest 20 (3): 353-355
- Versalovic, J., T. Koeuth und J. R. Lupski (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 19 (24): 6823-6831
- Vila, J., M. A. Marcos und M. T. Jimenez de Anta (1996): A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. J Med Microbiol 44 (6): 482-489

- Volksbeck, U. (2006): Antibiotikaresistenz von *S. agalactiae*-Molekulargenetische Grundlagen, Sero- und Genotypisierung. Inaugural-Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- Welsh, J., und M. McClelland (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 (24): 7213-7218
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski und S. V. Tingey (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 (22): 6531-6535
- Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown und J. J. Maurer (2000): Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis* 44 (2): 318-324
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner und W. Miller (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7 (1-2):203-214
- Zorman-Rojs, O., I. Zdovc, D. Bencina und I. Mrzel (2000): Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis* 44 (4): 1017-1022



---

Ein Teil der Versuchsergebnisse wurde bereits auf den unten genannten Kongressen/Tagungen vorgestellt und in den entsprechenden Proceedings/Tagungsberichten veröffentlicht:

Waldow, K., und H. M. Hafez (2007): Untersuchungen zur Pathogenität und Resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale* Isolate. Tagungsbericht des 72. Geflügelfachgesprächs der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Hannover: 53-59

Hafez, H. M., und K. Waldow (2007): Investigations on recent isolated *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from turkeys in Germany and France. Proceedings of the XV<sup>th</sup> Congress of the World Veterinary Poultry Association, Peking, China: 257

## 9 Anhang

Tabelle 34: Auflistung der Ergebnisse der Identifizierung und Typisierung aller  
ORT-Feldisolate (n=117)

Isolat (GB)	Herkunft	Cytochromoxidase- aktivität nachgewiesen?	Identifizierungsprofil (API NE 20)	Serotyp
04/06/03	Frankreich	ja	0020004	A
04/06/05	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/01	Frankreich	ja	0020004	J
1312/05/02	Frankreich	ja	0020004	C
1312/05/03	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/04	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/05	Frankreich	ja	0020004	J
1312/05/06	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/07	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/08	Frankreich	ja	0020004	I
1312/05/09	Frankreich	ja	0020004	I
1312/05/11	Frankreich	ja	0020004	I
1312/05/12	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/13	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/14	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/17	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/18	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/20	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/21	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/22	Frankreich	ja	0220004	J
1312/05/23	Frankreich	ja	0020004	B+C
1312/05/24	Frankreich	ja	0020004	I+J
1312/05/25	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/26	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/27	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/28	Frankreich	ja	0020004	A
1312/05/30	Frankreich	ja	0020004	C
1312/05/32	Frankreich	ja	0020004	C
1312/05/33	Frankreich	ja	0020004	I+J
114/06/01	Deutschland	ja	0020004	A
114/06/02	Deutschland	ja	0220004	C
114/06/03	Deutschland	ja	0220004	C
114/06/04	Deutschland	nein	0020000	A
114/06/05	Deutschland	ja	0020004	A
114/06/06	Deutschland	nein	0020000	B
114/06/07	Deutschland	ja	0220004	D
114/06/08	Deutschland	ja	0020004	E
114/06/09	Deutschland	ja	0020004	A
114/06/10	Deutschland	ja	0220004	A
114/06/11	Deutschland	ja	0020004	A
114/06/12	Deutschland	ja	0220004	A
1233/05	Deutschland	ja	0020004	A
1317/05/01	Deutschland	ja	0020004	B

## Anhang

Isolat (GB)	Herkunft	Cytochromoxidase-aktivität nachgewiesen?	Identifizierungsprofil (API NE 20)	Serotyp
1317/05/02	Deutschland	ja	0020004	A
1317/05/03	Deutschland	ja	0020004	A
1317/05/04	Deutschland	ja	0020004	E+A
1317/05/05	Deutschland	ja	0020004	A
1317/05/06	Deutschland	ja	0220004	A
1317/05/07	Deutschland	ja	0020004	A
1317/05/08	Deutschland	ja	0020004	H
1317/05/09	Deutschland	ja	0020004	A
1319/05	Deutschland	ja	0020004	A
1413/05/100	Deutschland	ja	0020004	A+B
1413/05/99	Deutschland	ja	0220004	D
1413/05/96	Deutschland	ja	0020004	D
1413/05/91	Deutschland	ja	0020004	C
1413/05/66	Deutschland	ja	0220004	C
1413/05/64	Deutschland	ja	0220004	A
1413/05/62	Deutschland	nein	0020000	A
1413/05/56	Deutschland	ja	0020004	B
1413/05/54	Deutschland	nein	0020000	D
1413/05/37	Deutschland	ja	0220004	C
1413/05/24	Deutschland	ja	0220004	C
1413/05/20	Deutschland	ja	0020004	A+B
1413/05/16	Deutschland	ja	0020004	D+E
144/06	Deutschland	ja	0020004	B
1479/05	Deutschland	ja	0020004	J
1527/05/01	Deutschland	ja	0020004	A
1527/05/02	Deutschland	ja	0020004	A
1527/05/03	Deutschland	ja	0020004	A
1527/05/04	Deutschland	ja	0020004	A
1527/05/05	Deutschland	ja	0020004	J
1527/05/06	Deutschland	nein	0020000	I
1527/05/07	Deutschland	ja	0020004	P+Q
1527/05/08	Deutschland	ja	0020004	P+Q
1527/05/09	Deutschland	ja	0020004	I
1527/05/10	Deutschland	ja	0020004	J
1527/05/11	Deutschland	ja	0020004	J
157/06	Deutschland	ja	0020004	B
1606/05	Deutschland	ja	0020004	A
1640/05	Deutschland	ja	0020004	B
1681/05	Deutschland	ja	0020004	B
1685/05/01	Deutschland	ja	0020004	C
1685/05/02	Deutschland	ja	0020004	B
1685/05/03	Deutschland	ja	0020004	C
1685/05/04	Deutschland	ja	0020004	A
1685/05/05	Deutschland	nein	0020000	B
1685/05/06	Deutschland	nein	0020000	B
1685/05/08	Deutschland	ja	0020004	B
1685/05/09	Deutschland	ja	0020004	B
1685/05/10	Deutschland	ja	0020004	A+B
1685/05/11	Deutschland	ja	0020004	A+B
1685/05/12	Deutschland	ja	0020004	C

Anhang

Isolat (GB)	Herkunft	Cytochromoxidase- aktivität nachgewiesen?	Identifizierungsprofil (API NE 20)	Serotyp
224/06	Deutschland	ja	0020004	E
271/06	Deutschland	ja	0020004	E
339/06	Deutschland	ja	0020004	J+A
476/05/60	Deutschland	ja	0020004	A
58/06/01	Deutschland	ja	0020004	E
58/06/02	Deutschland	ja	0020004	E+A
65/06/01	Deutschland	ja	0020004	I
65/06/02	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/03	Deutschland	ja	0020004	J
65/06/04	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/05	Deutschland	ja	0020004	C
65/06/06	Deutschland	ja	0220004	C
65/06/07	Deutschland	ja	0020004	C
65/06/08	Deutschland	nein	0020000	E+F
65/06/09	Deutschland	ja	0020004	C
65/06/10	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/11	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/12	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/13	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/14	Deutschland	ja	0020004	I
65/06/15	Deutschland	ja	0020004	A
65/06/16	Deutschland	ja	0020004	A+J
65/06/17	Deutschland	ja	0020004	A
82/06	Deutschland	ja	0020004	E

Tabelle 35: Ergebnisse der Keimzahlbestimmung im Rahmen des Embryoletalitätstestes an Hühnerembryonen

Isolat (GB)	Keimgehalt der Inokulumsuspension (KBE/ml)	Keimgehalt pro Ei (KBE/100 µl)
1685/05/10	$2,20 \times 10^4$	$2,20 \times 10^3$
1685/05/7	$1,15 \times 10^4$	$1,15 \times 10^3$
1640/05	$4,45 \times 10^4$	$4,45 \times 10^3$
1685/05/3	$9,50 \times 10^3$	$9,50 \times 10^2$
1685/05/9	$2,05 \times 10^4$	$2,05 \times 10^3$
1685/05/5	$3,70 \times 10^4$	$3,70 \times 10^3$
1413/05/54	$8,60 \times 10^4$	$8,60 \times 10^3$
1413/05/62	$1,40 \times 10^5$	$1,40 \times 10^4$
1413/05/66	$5,10 \times 10^4$	$5,10 \times 10^3$
1413/05/91	$3,65 \times 10^4$	$3,65 \times 10^3$
1413/05/99	$1,34 \times 10^5$	$1,34 \times 10^4$
1413/05/100	$4,90 \times 10^4$	$4,90 \times 10^3$
1413/05/16	$4,50 \times 10^4$	$4,50 \times 10^3$
1317/05/8	$8,50 \times 10^4$	$8,50 \times 10^3$
1317/05/1	$4,50 \times 10^3$	$4,50 \times 10^2$
1317/05/3	$5,20 \times 10^4$	$5,20 \times 10^3$
1317/05/5	$1,29 \times 10^4$	$1,29 \times 10^3$
1319/05	$1,70 \times 10^4$	$1,70 \times 10^3$
1233/05	$7,50 \times 10^3$	$7,50 \times 10^2$
58/06/2	$6,00 \times 10^4$	$6,00 \times 10^3$
1685/05/12	$3,25 \times 10^4$	$3,25 \times 10^3$
339/06	$8,00 \times 10^4$	$8,00 \times 10^3$
65/06/2	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$
65/06/4	$7,00 \times 10^4$	$7,00 \times 10^3$
65/06/5	$7,00 \times 10^4$	$7,00 \times 10^3$
65/06/7	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$
65/06/9	$3,00 \times 10^4$	$3,00 \times 10^3$
65/06/11	$4,00 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$
65/06/13	$2,00 \times 10^4$	$2,00 \times 10^3$
65/06/16	$8,40 \times 10^4$	$8,40 \times 10^3$
224/06	$2,05 \times 10^5$	$2,05 \times 10^4$
114/06/1	$8,70 \times 10^4$	$8,70 \times 10^3$
114/06/3	$1,15 \times 10^4$	$1,15 \times 10^3$
114/06/5	$8,95 \times 10^4$	$8,95 \times 10^3$
114/06/7	$3,50 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$
114/06/9	$1,57 \times 10^5$	$1,57 \times 10^4$
114/06/10	$3,40 \times 10^4$	$3,40 \times 10^3$
114/06/12	$7,15 \times 10^4$	$7,15 \times 10^3$
1527/05/2	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^3$
1527/05/4	$9,15 \times 10^4$	$9,15 \times 10^3$
1527/05/6	$5,50 \times 10^4$	$5,50 \times 10^3$
1527/05/8	$5,50 \times 10^4$	$5,50 \times 10^3$
1527/05/10	$6,00 \times 10^4$	$6,00 \times 10^3$

Anhang

Tabelle 36: Ergebnisse der Reisolierung von ORT von im Embryoletalitatstest *abgestorbenen* Embryonen

Isolat (GB)	Anzahl gestorbener Embryonen									Reisolierung ORT		Isolat (GB)	Anzahl gestorbener Embryonen									Reisolierung ORT					
	Tage p.i.								Σ	Allantois-flussigkeit	Dotter-material		Tage p.i.								Σ	Allantois-flussigkeit	Dotter-material				
	1	2	3	4	5	6	7	8					1	2	3	4	5	6	7	8							
1527/05/1	1	0	0	0	2	0	0	0	3	3/3	3/3	1413/05/37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
1527/05/2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1	1413/05/54	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2
1527/05/3	0	1	0	0	1	0	0	0	2	2/2	2/2	1413/05/56	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	3/3	3/3	
1527/05/4	1	0	0	1	1	0	0	0	3	3/3	3/3	1413/05/62	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1	
1527/05/5	0	3	0	0	0	0	0	0	3	3/3	3/3	1413/05/64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1527/05/6	0	1	0	0	3	0	0	0	4	4/4	4/4	1413/05/66	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	1/2	
1527/05/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0			1413/05/91	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1		
1527/05/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0			1413/05/96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1527/05/9	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1/1	1/1	1413/05/99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1527/05/10	4	2	0	0	0	0	0	0	6	6/6	6/6	1413/05/100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	0/1		
1527/05/11	0	2	0	1	0	0	0	0	3	3/3	3/3	1317/05/1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1		
1479/05	3	1	0	0	0	0	0	0	4	4/4	4/4	1317/05/2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1		
114/06/1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2/2	2/2	1317/05/3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4/4	4/4		
114/06/2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1	1317/05/4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		
114/06/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0			1317/05/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
114/06/4	1	0	0	0	2	1	0	0	4	2/4	3/4	1317/05/6	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		
114/06/5	1	0	0	0	0	1	0	0	2	2/2	2/2	1317/05/7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	1/2		
114/06/6	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3/3	3/3	1317/05/8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1		
114/06/7	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2	1317/05/9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		
114/06/8	2	0	0	0	0	0	1	0	3	3/3	3/3	1233/05	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		
114/06/9	3	0	0	0	2	0	0	0	5	5/5	5/5	1319/05	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	5	5/5	5/5		
114/06/10	0	3	0	0	0	0	0	0	3	3/3	3/3	1640/05	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		
114/06/11	0	1	0	0	0	0	0	1	2	2/2	2/2	1681/05	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	6	6/6	4/6		
114/06/12	4	1	0	0	0	0	0	0	5	5/5	5/5	476/05/60	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4/4	4/4		
65/06/1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2	224/06	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1/1	0/1		
65/06/2	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2	82/06	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1/1	1/1		
65/06/3	0	2	1	0	0	0	0	0	3	3/3	3/3	339/06	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2/2	2/2		

Anhang

Isolat (GB)	Anzahl gestorbener Embryonen									Reisolierung ORT		Isolat (GB)	Anzahl gestorbener Embryonen									Reisolierung ORT			
	Tage p.i.								Σ	Allantois- flüssigkeit	Dotter- material		Tage p.i.								Σ	Allantois- flüssigkeit	Dotter- material		
	1	2	3	4	5	6	7	8					1	2	3	4	5	6	7	8					
65/06/4	0	1	1	0	0	0	0	0	2		2/2	2/2	157/06	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1
65/06/5	0	2	0	1	0	0	0	0	3		3/3	2/3	1606/05	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
65/06/6	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1	271/06	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
65/06/7	0	0	0	2	0	0	1	0	3		3/3	3/3	144/06	0	3	0	0	0	0	0	0	3		3/3	3/3
65/06/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0				58/06/1	1	0	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1
65/06/9	0	1	0	2	1	0	0	0	4		4/4	3/4	58/06/2	1	1	0	0	0	0	0	0	2		2/2	2/2
65/06/10	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1	1685/05/1	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1
65/06/11	0	2	0	0	0	0	0	0	2		2/2	2/2	1685/05/2	0	5	0	0	0	0	0	0	5		5/5	5/5
65/06/12	1	0	0	0	0	0	0	0	1		1/1	0/1	1685/05/3	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	0/1
65/06/13	2	1	2	1	0	0	0	0	6		6/6	6/6	1685/05/4	3	2	0	0	0	0	0	0	5		5/5	5/5
65/06/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0				1685/05/5	0	1	0	0	0	0	0	0	1		1/1	1/1
65/06/15	1	0	1	0	0	0	0	0	2		2/2	2/2	1685/05/6	1	1	0	0	0	0	0	1	3		3/3	3/3
65/06/16	0	1	0	0	2	1	0	0	4		4/4	3/4	1685/05/8	1	1	1	0	0	0	0	0	3		3/3	3/3
65/06/17	2	0	0	0	0	1	0	0	3		3/3	3/3	1685/05/9	0	1	0	0	0	0	1	1	3		3/3	3/3
1413/05/16	1	0	1	1	0	0	0	0	3		3/3	2/3	1685/05/10	0	2	0	1	0	0	0	0	3		3/3	3/3
1413/05/20	2	1	0	2	1	0	0	0	6		4/6	4/6	1685/05/11	1	0	0	0	0	0	1	0	1		2/2	2/2
1413/05/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0				1685/05/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

## Anhang

Tabelle 37: Ergebnisse der Reisolierung von ORT aus *überlebenden* Embryonen

Isolat (GB)	Anzahl überlebende Embryonen	Reisolierung ORT		Isolat (GB)	Anzahl überlebende Embryonen	Reisolierung ORT	
		Allantoisflüssigkeit	Dottermaterial			Allantoisflüssigkeit	Dottermaterial
1527/05/1	7	2/7	4/7	1413/05/37	10	10/10	6/10
1527/05/2	9	6/9	2/9	1413/05/54	8	6/8	3/8
1527/05/3	8	6/8	6/8	1413/05/56	7	4/7	2/7
1527/05/4	7	5/7	0/7	1413/05/62	9	7/9	0/9
1527/05/5	7	6/7	4/7	1413/05/64	10	9/10	7/10
1527/05/6	6	1/6	1/6	1413/05/66	8	7/8	4/8
1527/05/7	10	7/10	3/10	1413/05/91	9	8/9	8/9
1527/05/8	10	2/10	6/10	1413/05/96	10	10/10	3/10
1527/05/9	9	3/9	1/9	1413/05/99	10	10/10	8/10
1527/05/10	4	1/4	1/4	1413/05/100	9	7/9	6/9
1527/05/11	7	2/7	3/7	1317/05/1	9	5/9	3/9
1479/05	6	3/6	4/6	1317/05/2	9	4/9	0/9
114/06/1	8	5/8	3/8	1317/05/3	6	2/6	2/6
114/06/2	9	8/9	2/9	1317/05/4	8	4/8	2/8
114/06/3	10	9/10	7/10	1317/05/5	10	6/10	0/10
114/06/4	6	4/6	1/6	1317/05/6	8	2/8	2/8
114/06/5	8	4/8	7/8	1317/05/7	8	5/8	4/8
114/06/6	7	1/7	4/7	1317/05/8	9	8/9	4/9
114/06/7	8	5/8	3/8	1317/05/9	8	3/8	2/8
114/06/8	7	5/7	1/7	1233/05	8	5/8	3/8
114/06/9	5	1/5	0/5	1319/05	5	3/5	1/5
114/06/10	7	5/7	5/7	1640/05	8	8/8	3/8
114/06/11	8	3/8	3/8	1681/05	4	2/4	3/4
114/06/12	5	3/5	3/5	476/05/60	6	5/6	3/6
65/06/1	8	8/8	8/8	224/06	9	9/9	8/9
65/06/2	8	6/8	5/8	82/06	9	9/9	7/9
65/06/3	7	7/7	3/7	339/06	8	8/8	5/8



Anhang

Isolat (GB)	Anzahl überlebende Embryonen	Reisolierung ORT		Isolat (GB)	Anzahl überlebende Embryonen	Reisolierung ORT	
		Allantois-flüssigkeit	Dotter-material			Allantois-flüssigkeit	Dotter-material
65/06/4	8	8/8	6/8	157/06	9	7/9	4/9
65/06/5	7	6/7	3/7	1606/05	10	8/10	6/10
65/06/6	9	9/9	6/9	271/06	10	10/10	5/10
65/06/7	7	7/7	5/7	144/06	7	7/7	4/7
65/06/8	10	10/10	7/10	58/06/1	9	9/9	8/9
65/06/9	6	6/6	4/6	58/06/2	8	6/8	6/8
65/06/10	9	9/9	7/9	1685/05/1	9	8/9	8/9
65/06/11	8	8/8	6/8	1685/05/2	5	5/5	2/5
65/06/12	9	7/9	7/9	1685/05/3	9	4/	6/9
65/06/13	4	3/4	2/4	1685/05/4	5	5/5	2/5
65/06/14	keine Reisolierung durchgeführt			1685/05/5	9	5/9	5/9
65/06/15	8	8/8	4/8	1685/05/6	7	3/7	1/7
65/06/16	6	4/6	3/6	1685/05/8	7	5/7	2/7
65/06/17	7	6/7	2/7	1685/05/9	7	7/7	7/7
1413/05/16	7	5/7	5/7	1685/05/10	7	5/7	6/7
1413/05/20	4	4/4	4/4	1685/05/11	8	8/8	3/8
1413/05/24	10	9/10	4/10	1685/05/12	10	10/10	9/10

Anhang

Tabelle 38: Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung der deutschen (n=88) und französischen (n=29) Isolate mittels Mikrobouillondilutionsmethode (MHK-Werte in µg/ml)

Isolat (GB)	Keimzählung	MHK (µg/ml)								
		Penicillin	Erythromycin	Ampicillin	Ceftiofur	Enrofloxacin	Lincomycin	Tetracyclin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Tiamulin
04/06 Nr. 03	12	8	≥ 32	8	16	≤ 0,06	≥ 8	8	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
04/06 Nr. 05	27	2	32	2	8	2	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 01	65	≤ 0,06	1	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,5	0,5	4/76	≤ 0,5
1312/05 Nr. 02	101	1	≥ 32	1	4	≤ 0,06	≥ 8	16	2/38	≤ 0,5
1312/05 Nr. 03	91	2	≥ 32	2	8	2	≥ 8	16	4/76	≤ 0,5
1312/05 Nr. 04	70	≤ 0,06	1	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,5	0,25	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 05	77	8	≥ 32	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 06	70	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,25	4	2/38	≤ 0,5
1312/05 Nr. 07	102	8	≥ 32	8	16	≤ 0,06	≥ 8	16	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 08	121	8	≥ 32	4	16	≤ 0,06	≥ 8	≥ 16	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 09	71	8	≥ 32	8	16	≤ 0,06	≥ 8	16	8/152	≤ 0,5
1312/05 Nr. 11	20	4	≥ 32	4	16	2	≥ 8	≥ 16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 12	81	≤ 0,06	≥ 32	≤ 0,5	≤ 0,12	1	0,5	0,5	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 13	76	4	2	4	8	1	8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 14	31	≤ 0,06	32	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,5	0,5	4/76	≤ 0,5
1312/05 Nr. 17	34	8	1	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 18	91	8	≥ 32	4	16	4	≥ 8	16	2/38	≤ 0,5
1312/05 Nr. 20	63	≤ 0,06	≥ 32	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,5	0,25	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 21	39	≤ 0,06	2	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,25	0,25	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 22	109	8	1	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	0,5/9,5	≤ 0,5
1312/05 Nr. 23	15	4	≥ 32	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	0,5/9,5	≤ 0,5
1312/05 Nr. 24	33	4	≥ 32	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 25	26	4	≥ 32	4	16	2	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 26	88	8	≥ 32	8	16	4	≥ 8	16	1/19	≤ 0,5
1312/05 Nr. 27	68	8	32	4	8	2	≥ 8	16	2/38	≤ 0,5
1312/05 Nr. 28	36	4	≥ 32	4	16	≤ 0,06	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1312/05 Nr. 30	88	8	≥ 32	4	8	2	≥ 8	16	4/76	≤ 0,5
1312/05 Nr. 32	48	8	≥ 32	4	16	2	≥ 8	16	0,5/9,5	≤ 0,5
1312/05 Nr. 33	40	4	≥ 32	4	16	1	≥ 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5

## Anhang

Isolat (GB)	Keimzählung	MHK (µg/ml)								
		Penicillin	Erythromycin	Ampicillin	Ceftiofur	Enrofloxacin	Lincomycin	Tetracyclin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Tiamulin
114/06 Nr. 01	104	4	≥ 32	4	8	2	≥ 8	≥ 16	4/76	≤ 0,5
114/06 Nr. 02	19	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
114/06 Nr. 03	107	> 8	> 32	32	≤ 0,12	> 8	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
114/06 Nr. 04	30	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	2/38	≤ 0,5
114/06 Nr. 05	95	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
114/06 Nr. 06	30	4	> 32	4	8	2	> 8	16	4/76	≤ 0,5
114/06 Nr. 07	131	> 8	> 32	64	16	4	> 8	8	2/38	≤ 0,5
114/06 Nr. 08	142	> 8	> 32	64	16	4	0,12	8	4/76	≤ 0,5
114/06 Nr. 09	93	8	> 32	4	8	≤ 0,06	> 8	2	8/152	≤ 0,5
114/06 Nr. 10	62	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,12	8	4/76	≤ 0,5
114/06 Nr. 11	17	4	> 32	4	4	2	> 8	4	4/76	≤ 0,5
114/06 Nr. 12	61	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	1	0,12	4	0,5/9,5	≤ 0,5
1233/05	14	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	1	0,25	4	2/38	≤ 0,5
1317/05 Nr. 01	19	4	> 32	4	16	4	> 8	16	4/76	≤ 0,5
1317/05 Nr. 02	114	4	> 32	8	16	4	> 8	> 16	2/38	≤ 0,5
1317/05 Nr. 03	119	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	1	0,12	4	2/38	≤ 0,5
1317/05 Nr. 04	107	4	1	4	16	0,5	0,25	16	8/152	≤ 0,5
1317/05 Nr. 05	150	4	> 32	16	16	4	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
1317/05 Nr. 06	45	4	> 32	8	16	1	> 8	8	2/38	≤ 0,5
1317/05 Nr. 07	71	> 8	> 32	32	≤ 0,12	> 8	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1317/05 Nr. 08	91	> 8	0,5	32	≤ 0,12	8	0,25	> 16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1317/05 Nr. 09	86	> 8	0,5	64	0,25	2	0,5	> 16	4/76	≤ 0,5
1319/05	55	≤ 0,06	0,5	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,12	4	2/38	≤ 0,5
1413/05 Nr. 100	100	4	> 32	4	16	2	> 8	> 16	4/76	> 32
1413/05 Nr. 16	108	≤ 0,06	2	32	8	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1413/05 Nr. 20	71	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
1413/05 Nr. 24	112	> 8	16	32	16	8	4	> 16	2/38	> 32
1413/05 Nr. 37	101	> 8	4	32	≤ 0,12	> 8	8	> 16	2/38	> 32
1413/05 Nr. 54	103	> 8	> 32	32	16	4	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
1413/05 Nr. 56	67	8	> 32	4	16	4	> 8	16	8/152	≤ 0,5
1413/05 Nr. 62	77	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
1413/05 Nr. 64	114	> 8	2	64	≤ 0,12	> 8	8	> 16	2/38	> 32
1413/05 Nr. 66	45	> 8	4	> 64	≤ 0,12	> 8	> 8	> 16	4/76	> 32

## Anhang

Isolat (GB)	Keimzählung	MHK (µg/ml)								
		Penicillin	Erythromycin	Ampicillin	Ceftiofur	Enrofloxacin	Lincomycin	Tetracyclin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Tiamulin
1413/05 Nr. 91	34	4	4	8	8	> 8	4	> 16	0,5/9,5	> 32
1413/05 Nr. 96	115	> 8	> 32	32	16	2	> 8	8	1/19	≤ 0,5
1413/05 Nr. 99	89	> 8	> 32	32	2	2	> 8	16	0,5/9,5	> 32
144/06	87	2	> 32	2	2	1	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
1479/05	73	8	> 32	8	16	2	> 8	16	2/38	≤ 0,5
1527/05 Nr. 01	40	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	16/304	≤ 0,5
1527/05 Nr. 02	55	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	8/152	1
1527/05 Nr. 03	65	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
1527/05 Nr. 04	55	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	8/152	1
1527/05 Nr. 05	56	8	> 32	4	16	2	> 8	4	8/152	≤ 0,5
1527/05 Nr. 06	67	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1527/05 Nr. 07	60	> 8	> 32	> 64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
1527/05 Nr. 08	112	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
1527/05 Nr. 09	46	4	> 32	4	16	2	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1527/05 Nr. 10	76	4	> 32	4	16	2	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1527/05 Nr. 11	104	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
157/06	90	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
1606/05	92	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
1640/05	72	≤ 0,06	0,25	≤ 0,5	≤ 0,12	2	0,12	4	4/76	≤ 0,5
1681/05	33	4	> 32	4	16	1	> 8	16	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1685/05 Nr. 01	16	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
1685/05 Nr. 02	42	> 8	> 32	64	16	2	> 8	> 16	0,5/9,5	1
1685/05 Nr. 03	94	8	8	16	8	> 8	> 8	> 16	0,50/9,5	≤ 0,5
1685/05 Nr. 04	33	4	> 32	4	16	2	> 8	> 16	0,5/9,5	≤ 0,5
1685/05 Nr. 05	86	8	> 32	4	16	2	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1685/05 Nr. 06	74	8	> 32	8	16	4	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1685/05 Nr. 08	83	8	> 32	8	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
1685/05 Nr. 09	39	8	0,5	8	16	2	0,12	0,25	≤ 0,25/4,75	≤ 0,5
1685/05 Nr. 10	24	4	> 32	4	16	4	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1685/05 Nr. 11	79	8	> 32	8	16	4	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
1685/05 Nr. 12	85	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
224/06	120	8	≤ 0,12	4	16	0,5	0,12	16	8/152	≤ 0,5
271/06	106	4	1	4	8	0,25	0,25	8	4/76	≤ 0,5

## Anhang

Isolat (GB)	Keimzählung	MHK (µg/ml)								
		Penicillin	Erythromycin	Ampicillin	Ceftiofur	Enrofloxacin	Lincomycin	Tetracyclin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Tiamulin
339/06	29	0,25	> 32	4	16	4	> 8	> 16	0,5/9,5	≤ 0,5
476/05 Nr. 60	48	8	> 32	8	16	2	> 8	16	0,5/9,5	≤ 0,5
58/06 Nr. 01	60	4	2	4	16	0,25	0,12	8	4/76	≤ 0,5
58/06 Nr. 02	81	4	4	4	8	0,25	0,12	8	4/76	≤ 0,5
65/06 Nr. 01	75	8	> 32	4	16	> 8	> 8	> 16	8/152	2
65/06 Nr. 02	67	8	> 32	4	8	> 8	> 8	> 16	8/152	1
65/06 Nr. 03	21	8	> 32	4	16	2	> 8	> 16	2/38	≤ 0,5
65/06 Nr. 04	103	8	> 32	8	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
65/06 Nr. 05	50	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	0,5/9,5	≤ 0,5
65/06 Nr. 06	70	> 8	4	> 64	≤ 0,12	> 8	> 8	> 16	4/76	> 32
65/06 Nr. 07	83	4	32	4	4	4	1	1	8/152	1
65/06 Nr. 08	60	8	> 32	8	8	> 8	2	16	8/152	2
65/06 Nr. 09	105	8	> 32	8	16	> 8	> 8	1	4/76	2
65/06 Nr. 10	50	8	> 32	4	8	4	> 8	> 16	2/38	≤ 0,5
65/06 Nr. 11	28	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
65/06 Nr. 12	46	> 8	> 32	64	≤ 0,12	2	> 8	> 16	≤ 0,25/4,75	1
65/06 Nr. 13	21	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	4/76	≤ 0,5
65/06 Nr. 14	41	4	> 32	4	16	2	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
65/06 Nr. 15	45	4	> 32	4	8	2	> 8	> 16	16/304	≤ 0,5
65/06 Nr. 16	106	4	> 32	4	16	4	> 8	> 16	8/152	≤ 0,5
65/06 Nr. 17	50	8	> 32	4	16	4	> 8	> 16	1/19	≤ 0,5
82/06	91	4	1	4	16	0,25	0,12	8	8/152	≤ 0,5

Anhang

Tabelle 39:  $MHK_{Min}$ -,  $MHK_{Max}$ - und  $MHK_{Modal}$ -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der deutschen Isolate in Abhängigkeit ihrer regionalen Herkunft

Wirkstoff	Baden-Württemberg (n=4)			Brandenburg (n=5)			Niedersachsen (n=67)			Nordrhein-Westfalen (n=8)			Sachsen-Anhalt (n=4)		
	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$
Penicillin G	$\leq 0,06$	8	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$> 8$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$> 8$	4	4	8	4	4	$> 8$	-
Erythromycin	0,25	$> 32$	0,5	0,5	$> 32$	0,5	0,5	$> 32$	$> 32$	$\leq 0,12$	$> 32$	$> 32$	0,5	$> 32$	$> 32$
Ampicillin	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	32	$\leq 0,5$	2	$> 64$	4	4	8	4	4	64	-
Ceftiofur	$\leq 0,12$	16	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	16	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$	16	16	8	16	16	$\leq 0,12$	16	16
Enrofloxacin	1	4	2	1	8	1	$\leq 0,06$	$> 8$	2	0,25	2	0,25	1	$> 8$	-
Lincomycin	0,12	$> 8$	0,12	0,12	$> 8$	0,12	0,12	$> 8$	$> 8$	0,12	$> 8$	0,12	0,5	$> 8$	$> 8$
Tetracyclin	4	$> 16$	4	4	$> 16$	-	0,25	$> 16$	$> 16$	8	16	-	8	$> 16$	$> 16$
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	2/38	8/152	2/38	$\leq$ 0,25/4,75	4/76	2/38	$\leq$ 0,25/4,75	16/304	8/152	$\leq$ 0,25/4,75	8/152	4/76	2/38	4/76	4/76
Tiamulin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$> 32$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$

\* Modalwert konnte aufgrund der geringen Isolatanzahl und der weiten Streuung der MHK-Werte nicht ermittelt werden

Tabelle 40:  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der deutschen Isolate in Abhängigkeit ihrer regionalen Herkunft

Wirkstoff	Baden-Württemberg (n=4)		Brandenburg (n=5)		Niedersachsen (n=67)		Nordrhein-Westfalen (n=8)		Sachsen-Anhalt (n=4)	
	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
Penicillin G	$\leq 0,06$	$> 8$	$\leq 0,06$	$> 8$	8	$> 8$	4	8	4	$> 8$
Erythromycin	0,5	$> 32$	0,5	$> 32$	$> 32$	$> 32$	2	$> 32$	$> 32$	$> 32$
Ampicillin	$\leq 0,5$	4	$\leq 0,5$	32	4	64	4	8	8	64
Ceftiofur	$\leq 0,12$	16	$\leq 0,12$	16	8	16	16	16	0,25	16
Enrofloxacin	2	4	2	8	2	$> 8$	0,25	2	2	$> 8$
Lincomycin	0,12	$> 8$	0,12	$> 8$	$> 8$	$> 8$	0,12	$> 8$	$> 8$	$> 8$
Tetracyclin	4	$> 16$	8	$> 16$	$> 16$	$> 16$	8	16	16	$> 16$
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	2/38	8/152	2/38	4/76	4/76	8/152	4/76	8/152	4/76	4/76
Tiamulin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$> 32$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$

Tabelle 41:  $MHK_{Min}$ -,  $MHK_{Max}$ - und  $MHK_{Modal}$ -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der französischen Isolate in Abhängigkeit ihrer regionalen Herkunft

Wirkstoff	Ille et Vilaine (n=8)			Loire et Atlantique (n=8)			Morbihan (n=2)			Mayenne (n=7)			Sonstige* (n=4)		
	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$	$MHK_{Min}$	$MHK_{Max}$	$MHK_{Modal}$
Penicillin G	$\leq 0,06$	8	8	$\leq 0,06$	8	8	$\leq 0,06$	4	-	$\leq 0,06$	8	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	8	-
Erythromycin	1	> 32	> 32	2	> 32	> 32	1	> 32	-	0,5	> 32	> 32	1	> 32	> 32
Ampicillin	$\leq 0,5$	8	4	$\leq 0,5$	8	-	1	4	-	$\leq 0,5$	4	-	$\leq 0,5$	4	4
Ceftiofur	$\leq 0,12$	16	16	$\leq 0,12$	16	16	$\leq 0,12$	16	-	$\leq 0,12$	16	-	$\leq 0,12$	16	-
Enrofloxacin	$\leq 0,06$	4	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	4	2	2	2	2	$\leq 0,06$	2	2	$\leq 0,06$	2	$\leq 0,06$
Lincomycin	0,5	> 8	> 8	0,5	> 8	> 8	0,5	> 8	-	0,25	> 8	> 8	0,25	> 8	> 8
Tetracyclin	0,5	> 16	16	0,25	16	16	0,5	16	-	0,25	> 16	16	0,25	16	16
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	$\leq$ 0,25/4,75	4/76	$\leq$ 0,25/4,75	$\leq$ 0,25/4,75	8/152	$\leq$ 0,25/4,75	$\leq$ 0,25/4,75	4/76	-	$\leq$ 0,25/4,75	4/76	-	$\leq$ 0,25/4,75	2/38	$\leq$ 0,25/4,75
Tiamulin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$

\*umfasst 4 Regionen mit je einem Isolat

Tabelle 42:  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der französischen Isolate in Abhängigkeit ihrer regionalen Herkunft

Wirkstoff	Ille et Vilaine (n=8)		Loire et Atlantique (n=8)		Mayenne (n=7)	
	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
Penicillin G	4	8	8	8	2	8
Erythromycin	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32	> 32
Ampicillin	4	8	4	8	2	4
Ceftiofur	16	16	16	16	8	16
Enrofloxacin	$\leq 0,06$	4	2	4	2	2
Lincomycin	> 8	> 8	> 8	> 8	8	> 8
Tetracyclin	16	> 16	16	16	16	> 16
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0,5/9,5	4/76	0,5/9,5	8/152	1/19	4/76
Tiamulin	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$

Tabelle 43: Gegenüberstellung der  $MHK_{50}$ - und  $MHK_{90}$ -Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) der deutschen und französischen Isolate

Wirkstoff	Deutschland (n=88)		Frankreich (n=29)	
	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$	$MHK_{50}$	$MHK_{90}$
Penicillin G	8	> 8	4	8
Erythromycin	> 32	> 32	> 32	> 32
Ampicillin	4	64	4	8
Ceftiofur	8	16	16	16
Enrofloxacin	2	> 8	2	2
Lincomycin	> 8	> 8	> 8	> 8
Tetracyclin	> 16	> 16	16	16
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	4/76	8/152	1/19	4/76
Tiamulin	$\leq 0,5$	> 32	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Bereitstellung sämtlicher Materialien und Räumlichkeiten für die Anfertigung dieser Arbeit. Die mir von ihm während dieser Zeit gewährten Möglichkeiten der Mitarbeit in allen Bereichen des Instituts und übertragenen Verantwortlichkeiten stellen eine große Bereicherung meines Erfahrungsschatzes dar.

Frau Dr. Dörte Lüschoff gilt mein besonderer Dank für die stets offene Tür, die Bereitschaft zur Beantwortung zahlreicher Fragen sowie für die Ermunterung auf dem Gebiet der Forschung, neue Untersuchungsmöglichkeiten zu testen. Ihre kritischen Anmerkungen und ihre unermüdliche Geduld, die sie bezüglich des Korrekturlesens bewies, trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin gilt mein Dank für die herzliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit während der Zeit. Insbesondere den Mitarbeitern der Bakteriologie und Molekularbiologie, Frau Bertram, Frau Göllner und Frau Grotehenn danke ich für die Einweisung in so manches Geheimnis der Laborwelt und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Wallmann und seinem Team, ganz besonders Frau Dr. Heike Kaspar, aus dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit danke ich für die Einarbeitung in die Methodik zur Resistenzbestimmung und für Anregungen, Informationen und kleinen Hilfestellungen.

Der Firma ELANCO möchte ich bezüglich der Bereitstellung der Sensititre<sup>®</sup>-Mikrotiterplatten und ihren Mitarbeitern Herrn O. Kempf und Dr. Shabbir Simjee für die gute Zusammenarbeit meinen Dank aussprechen.

Den praktizierenden Tierärzten, die ORT-Isolate und Informationen zu diesen großzügig bereitstellten, danke ich für die Unterstützung.

Ein großes Dankeschön gilt meinen ehemaligen bzw. aktuellen Mit-Doktoranden Dr. Rüdiger Hauck, Dr. Olivia Gooß, Dr. Mandy Canarius, Andrea Kohls, Valter de Quadros sowie Abdul Lotfi für die entspannte Zusammenarbeit bei zahlreichen internen und externen Veranstaltungen.

## Danksagung

---

Meiner gesamten Familie, all den kleinen und großen Persönlichkeiten, gilt mein ganz besonderer und herzlicher Dank für die fortwährende Unterstützung jeglicher Art über die gesamte Studien- und Doktorandenzeit. Danke, dass ihr immer für mich da wart und seid.

Alex-mein Fels in der Brandung. Meine Dankbarkeit für deine wertvolle und vorbehaltlose Unterstützung in allen Phasen der Er- und Fertigstellung dieser Arbeit kennt keine Worte. Danke für dein Vertrauen in meine Fähigkeiten...

---

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.  
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch  
genommen habe.

Berlin, den 16.03.2009

Konstanze Waldow