

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

Leiter: Prof. Dr. H.M. Hafez

und

dem Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven

**Untersuchungen zu *Enterococcus faecalis* als möglicher
Faktor zur Entstehung der amyloiden Arthropathie der
braunen Legehennen**

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

vorgelegt von
Birgit Rudolph geb. Kühndel

Tierärztin
aus Ludwigsfelde

Berlin 2004

Journal-Nr. 2846

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. H.M. Hafez
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. W. Müller
Dritter Gutachter:	Prof. G. Monreal

Tag der Promotion: 22. Oktober 2004

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Definition	3
2.2	Geschichte, Vorkommen und Bedeutung	3
2.3	Ätiologie	6
2.4	Enterokokken	7
2.4.1	Taxonomie	7
2.4.2	Morphologie	9
2.4.3	Eigenschaften	9
2.4.4	Bedeutung der Enterokokken beim Menschen	10
2.4.5	Vergleich der Isolate	11
2.5	Epizootiologie	11
2.6	Symptome und Verlauf	13
2.7	Pathologisch-anatomische Veränderungen	14
2.8	Histopathologische Veränderungen	15
2.9	Diagnose	15
2.9.1	Isolierung	16
2.9.2	Indirekter Nachweis	16
2.10	Differentialdiagnosen	17
2.11	Bekämpfungsmaßnahmen	19
2.11.1	Therapie	19
2.11.2	Prophylaxe	19
Eigene Untersuchungen		
3	Material und Methoden	20
3.1	Teil 1 - Keimisolierung und -charakterisierung	20
3.1.1	Material	20
3.1.1.1	Bakterien-Isolate	20

3.1.1.2	Medien, Puffer und Geräte	20
3.1.1.3	Versuchstiere und Bruteier	26
3.1.2	Methoden	27
3.1.2.1	Isolierung	27
3.1.2.2	Charakterisierung	27
3.1.2.2.1	Stoffwechselfparameter	27
3.1.2.2.1.1	Biochemische Eigenschaften	27
3.1.2.2.1.2	Resistenztest	28
3.1.2.2.2	Untersuchung zur Feststellung der Antigenverwandtschaft der verschiedenen Isolate	29
3.1.2.2.2.1	Herstellung des Antigens	29
3.1.2.2.2.2	Herstellung der positiven Kontrollseren	30
3.1.2.2.2.3	Durchführung der Agargelpräzipitation	30
3.1.2.2.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	31
3.1.2.2.4	Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate	34
3.1.2.2.4.1	Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate an Bruteiern	34
3.1.2.2.4.2	Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate an Versuchstieren	36
3.2	Teil 2 - Herstellung eines indirekten enzymgebundenen Immunoabsorptionstests (ELISA) für serologische Untersuchungen	37
3.2.1	Material	37
3.2.1.1	Seren	37
3.2.1.1.1	Positivkontrollseren	37
3.2.1.1.2	Negativkontrollseren	37
3.2.1.1.3	Andere Seren zur Prüfung der Spezifität des ELISA	37
3.2.1.2	Medien, Puffer und Geräte für den ELISA	38
3.2.2	Methoden	39
3.2.2.1	Herstellung der Positivkontrollseren	39
3.2.2.2	Herstellung der ELISA-Antigene	40
3.2.2.3	Beschichtung der ELISA-Platten	41
3.2.2.4	Testdurchführung	41

3.2.2.5	Interpretation der ELISA-Werte	42
3.2.2.6	Korrektur der ELISA-Werte	42
3.2.2.7	Prüfung der Spezifität des ELISA	43
3.2.2.8	Reproduzierbarkeit	43
3.2.2.8.1	Innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenzen)	43
3.2.2.8.2	Zwischen verschiedenen Platten (Interassay-Differenzen)	44
3.2.2.9	Test der Lagerfähigkeit der ELISA-Platten	44
3.3	Teil 3 - Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen <i>Enterococcus faecalis</i> in Geflügelbeständen	45
3.3.1	Material	45
3.3.1.1	Seren für Verlaufsuntersuchungen bei Legehennen unter Praxisbedingungen	45
3.3.1.2	Seren und Dotter für diagnostische Untersuchungen	45
3.3.1.3	Testplatten	45
3.3.2	Methoden	46
3.4	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Ergebnisse zu Teil 1	47
4.1.1	Charakterisierung	47
4.1.1.1	Stoffwechselformparameter	47
4.1.1.1.1	Biochemische Eigenschaften	47
4.1.1.1.2	Resistenztest	48
4.1.1.2	Agargelpräzipitation	51
4.1.1.3	Pulsfeld-Gelelektrophorese	51
4.1.1.4	Ergebnisse der Bestimmung des Pathogenitätsgrades der Isolate	53
4.1.1.4.1	Ergebnisse der Pathogenitätstests im Brutei	53
4.1.1.4.2	Ergebnisse der Pathogenitätstests im Versuchstier	56
4.1.2	Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Charakterisierungsmethoden	59

4.2	Ergebnisse zu Teil 2	62
4.2.1	Prüfung der Spezifität des selbsthergestellten indirekten ELISA	62
4.2.2	Reproduzierbarkeit	63
4.2.2.1	Innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenzen)	63
4.2.2.2	Zwischen verschiedenen Platten (Interassay-Differenzen)	64
4.2.3	Test der Lagerfähigkeit der ELISA-Platten	65
4.3	Ergebnisse zu Teil 3	70
4.3.1	Verlauf der OD von zwei Legehennenherden unter Praxisbedingungen	70
4.3.2	Diagnostische serologische Untersuchungen	72
5	Diskussion	73
6	Schlußfolgerung	83
7	Zusammenfassung	84
8	Summary	85
9	Literaturverzeichnis	86
10	Anhang	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGP	Agargelpräzipitation
AI	aviäre Influenza
bidest.	bidestillata
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CELO	Chicken Embryo Lethal Orphan = FAV 1
D	Deutschland
d.h.	das heißt
dest.	destillata
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.	Enterococcus
E. coli	Escherischia coli
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (deutsch = Ethylendiamin- tetraessigsäure)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ergeb.	Ergebnisse
FAV 1	Fowl Adenovirus $\hat{=}$ CELO
h	Stunden
HE	hämorrhagische Enteritis der Puten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IB	Infektiöse Bronchitis
IBD	Infectious Bursal Disease
Kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
MG	Mycoplasma gallisepticum
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MM	Mycoplasma meleagridis

MS	Mycoplasma synoviae
n	Anzahl
n.b.	nicht bekannt
n.d.	nicht durchgeführt
neg.	negativ
Nr.	Nummer
n.u.	nicht untersucht
OD	Optische Dichte
p.i.	post infectionem
Pm	Pasteurella multocida
PBS	phosphate buffered saline
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pos.	positiv
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SE	Salmonella enteritidis
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
SPF	spezifisch pathogenfrei
Str.	Streptococcus
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRT	Turkey Rhinotracheitis
typ.	typisch
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
X	Mittelwert