

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Definition**

#### Amyloidose allgemein

Die Amyloidose wird als extrazelluläre Ablagerung von normalerweise autologen niedermolekularen Proteinen oder deren Fragmenten (Präproteinen) in verschiedenen Geweben und Organen in einer charakteristischen fibrillären Form definiert. Häufige Charakteristika dieser Fibrillen sind ihre unverzweigte Ultrastruktur, meist 7 – 10 nm im Durchmesser und unterschiedlicher Länge, ihre Festigkeit und das häufige Vorkommen der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Amyloid-Moleküle (GLENNER, 1980; VAN ANDEL et al., 1986, 1988). Typisch sind weiterhin die Kongophilie und die geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen (COOPER, 1974; KLUNK et al., 1989).

Die geringe Löslichkeit und die relative hohe Resistenz der amyloiden Fibrillen gegenüber der proteolytischen Verdauung unter physiologischen Bedingungen sind auch der Grund für den irreversiblen Verlauf der Amyloidose.

#### Amyloide Arthropathie

Bei der amyloiden Arthropathie des Geflügels handelt es sich um eine Erkrankung mit sowohl akuter als auch chronischer Verlaufsform, die durch Entzündung der Gelenke, Ablagerungen von Amyloid im Bereich der Gelenke sowie Wachstumsdepressionen bei braunen Legehennen charakterisiert ist (LANDMAN et al., 1994).

### **2.2 Geschichte, Vorkommen und Bedeutung**

#### Amyloidose allgemein

VIRCHOW (1854) beobachtete wachsartige Ablagerungen in verschiedenen inneren Organen, vor allem der Leber, von Humanpatienten mit chronischen entzündlichen Erkrankungen. Da dieses Material nach Kontakt mit Jod in ähnlicher Weise wie Stärke mit einer intensiven Blauschwarzfärbung durch Anlagerung von Jod oder komplexem  $J_3$  reagierte, erhielt es die Bezeichnung *Amyloid* (amylum = Stärke, amyloid = stärkeartig).

Die erste Beschreibung einer systemischen Amyloidose beim Vogel stammt von HJÄRRE (1933) mit der Beobachtung bei einem Fasan.

Die Amyloidose ist ein weltweit bei Vögeln, besonders beim Wassergeflügel, vorkommender pathologischer Befund.

Bei in Gefangenschaft gehaltenen Wildvögeln wurde die Amyloidose in der Mehrzahl der Fälle in Zusammenhang mit chronischen Entzündungsprozessen, die mit starkem Gewebszerfall einhergehen, festgestellt (ZSCHIESCHE & LINKE, 1986). Eine Amyloidose wurde jedoch noch nie bei freifliegenden Wildvögeln beschrieben (BAKER, 1977).

Eine vaskuläre Amyloidose in diversen Organen ist bei Möwen (*Larus argentatus*) von Hofmann & Leighton (1985) beschrieben worden. Eine gleichartige Beschreibung bei einem Rosaflamingo (*Phoenicopterus ruber*) mit Hämochromatose und Arteriosklerose stammt von Brayton (1992).

Bei Hühnern wurden erst wenige Berichte über das Vorkommen von systemischer Amyloidose veröffentlicht (VON RAMPIN et al., 1989; TABLANTE et al., 1994; SHIVAPRASAD & WOOLCOCK, 1995).

Obwohl die Amyloidose bei der Mehrzahl der Vogelordnungen vorkommt, liegt die höchste Inzidenz bei in Gefangenschaft gehaltenen Wildvögeln bei den Anseriformes, Gruiformes und Phoenicopteriformes (ZSCHIESCHE & JAKOB, 1989). Innerhalb der Anseriformes sind die Anatidae besonders anfällig, eine Amyloidose zu entwickeln. In einer japanischen Studie, die 88 Exemplare der Familie der Anatidae untersuchte, zeigten 77% der seziierten Anatinae (Enten) und 51% der Anserinae (Schwäne und Gänse) eine generalisierte Amyloidose (SATO et al., 1981). Frühe Studien von COWAN (1968a) und KARSTAD & SILEO (1971) berichten von einer Inzidenz von 45% bzw. 20% Amyloidose-Fällen bei Wasservögeln. Dabei wurden 578 bzw. 285 Vögel untersucht. In einer späteren Studie wurde Amyloidose bei 25,2% der untersuchten 139 adulten Wasservögeln gefunden (SCHNEIDER et al., 1988).

Es wurde eine variable Prävalenz der Amyloidose bei verschiedenen Familien der Ordnung der Anseriformes festgestellt. So wurde von einer geringeren Empfänglichkeit der Familie der Oxyuridae (Ruderenten) für die Ausprägung einer Amyloidose berichtet (COWAN, 1968b; ZSCHIESCHE & JAKOB, 1989).

In der Ordnung der Gruiformes sind vor allem die Kraniche, bei den Charadriiformes die Familie der Caridae betroffen (ZSCHIESCHE & JAKOB, 1989).

In Analogie zu den in Gefangenschaft gehaltenen wilden Anatidae ist die Amyloidose eine bekannte Erkrankung der Hausenten. Auch hier gibt es Unterschiede in der Empfänglichkeit

der einzelnen Spezies: Kaiya- (Hybrid: Moschusente x Hausente) und China-Enten zeigen ebenso wie Pekingenten eine höhere Empfänglichkeit, Moschusenten dagegen sind nicht empfänglich für die Amyloidose (LIU, 1985).

Beim Haushuhn (*Gallus gallus*) beschreibt VON RAMPIN et al. (1989) einen Ausbruch von systemischer Amyloidose mit mittlerer bis hoher Mortalität bei zwei Herden von jungen Legehennen nach wiederholter Impfung mit Ölemulsionsvakzinen. Die Amyloidablagerungen befanden sich in Leber, Milz und Nieren.

Bei kommerziellen Legehennen und Mastgeflügel trat eine Hepatitis assoziiert mit Vaskulitis und Amyloidose (TABLANTE et al., 1994; SHIVAPRASAD & WOOLCOCK, 1995) auf. Die betroffenen Tiere zeigten eine zunehmende Mortalität, bei den Legehennen trat eine Reduzierung der Legeleistung ein.

### Amyloide Arthropathie

Die artikuläre Lokalisation der Amyloidose beim Tier und auch beim Menschen ist ungewöhnlich, wobei es sich bei den meisten spontanen Fällen um eine Amyloidose vom AA-Typ (=Amyloid A < Akute-Phase-Protein) handelt, also um eine Amyloidose vom reaktiven Typ, die durch chronische Infektionen ausgelöst werden kann. Die meisten anderen Amyloid-Typen, die in menschlichen Gelenken gefunden worden sind (RYAN, 1986; DONNELLY et al., 1993; SHIRAHAMA et al., 1986; OKADA et al., 1993; GOFFIN et al., 1985; ATHANASOU et al., 1994), wurden bei Wild- und Haustieren noch nicht beschrieben. Dabei handelte es sich vor allem um Amyloidosen vom AL-Typ (= Amyloid aus Leichtketten) und vom AT-Typ (Amyloid Transthyretin [familiär idiopathisch]).

Von artikulären Amyloidablagerungen (AA-Typ, s.o.) wurde bei einigen Mäusestämmen (RYAN, 1986) und zwei Hunden mit Anzeichen von rheumathoider Arthritis (COLBATZKY et al., 1991) berichtet.

Bei Vögeln wurde erstmalig von artikulär abgelagertem Amyloid bei Tieren einer Herde von Perlhühnern (*Numida meleagris galeata*) berichtet (MAESTRINI & PASCUCCI, 1970). Bei diesen Tieren trat zu 5% Lahmheit und Wachstumsdepression auf. In einer Herde von Mastputen (*Meleagris gallopavo gallopavo*) wurde Amyloid in verschiedenen inneren Organen und in der Gelenkssynovia gefunden (SHIVAPRASAD et al., 1991).

Ablagerungen von Amyloid im Gelenk wurden auch bei einem Pfau (*Pavo cristatus*) nachgewiesen (LANDMAN & GRUYS, 1998b).

Als klinisches Problem bei braunen Legehennen wurde die amyloide Arthropathie erstmals 1994 von LANDMAN et al. beschrieben, wobei die Erkrankung mit Wachstumsdepression und Lahmheiten ähnlich der Beschreibung beim Perlhuhn einherging. Letztendlich waren bis zu 20 oder 30% der Tiere innerhalb einer Herde betroffen.

Die in den 90er Jahren beobachteten Fälle von amyloider Arthropathie beim Haushuhn (*Gallus gallus*) betrafen fast ausschließlich Legehennen vom braunen Typ (LANDMAN et al., 1997, 1998a). STEENTJES et al. stellten 2002 in 9 Herden Fälle von spontaner amyloider Arthropathie bei Mastelertieren fest. Die betroffenen Tiere lahmten und zeigten in den meisten Fällen eine Schwellung des linken Sprunggelenkes. Amyloidablagerungen wurden in 83% der Fälle gefunden. In fast allen Fällen waren die pathologischen Veränderungen auf das linke Sprunggelenk und die linke Beugesehne des Fußes beschränkt, was einen Zusammenhang mit der Vakzination gegen das Marek-Virus vermuten läßt.

Da alle Beobachtungen von amyloider Arthropathie bei Arten, die der Familie der Galliformes angehören, gemacht wurden, zieht LANDMAN et al. (1994) den Schluß, dass die Gelenke bei Galliformes hauptsächlich prädisponiert für Amyloidablagerungen sind. Die Ursache hierfür ist bislang unbekannt.

### 2.3 Ätiologie

#### Amyloide Arthropathie

Die amyloide Arthropathie ist eine Erkrankung, die durch verschiedene Faktoren, wie z.B. schlechte Haltungsbedingungen beeinflusst wird. Der Ausbruch dieser Erkrankung kann v.a. durch bestimmte Stämme von *Enterococcus faecalis* in empfänglichen Tieren ausgelöst werden (LANDMAN et al., 1994, 1997, 1998a, 1999b).

In 77% der Fälle wurde *E. faecalis* aus den Gelenken isoliert. 35 Isolate dieser Fälle wurden mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zum Auftrennen der Genomfragmente nach der Spaltung mit dem Restriktionsenzym Sma I verglichen. Außer einem wiesen die Restriktionsmuster aller Isolate große Ähnlichkeit mit dem Muster eines bekannten amyloidogenen und arthropathogenen Isolates auf.

LANDMAN und FEBERWEE (2001a) untersuchten die mögliche Beteiligung von *Mycoplasma synoviae* an der amyloiden Arthropathie.

Material aus Gelenken von Legehennen aus Geflügelbeständen, in denen die amyloide Arthropathie bereits aufgetreten war, wurde bakteriologisch untersucht. Dabei wurde sowohl *E. faecalis* als auch *Mycoplasma synoviae* aus purulenten Gelenken isoliert.

Im Tierversuch wurde das amyloidogene und arthropathogene Potential eines *Mycoplasma synoviae*-Isolates in 6 Wochen alten braunen Junghennen überprüft. Nach 12 Wochen zeigten 9 von 10 Tieren nach intraartikulärer Inokulation Gelenksentzündungen, bei intravenöser Inokulation lag die Rate bei 50% (10/20). Nach intraartikulärer Inokulation in das linke Sprunggelenk wies meist die Sehnenscheide des kollateralen Sprunggelenkes entzündliche Veränderungen auf, wohingegen Sprung- und Fußgelenke meist bei intravenöser Inokulation betroffen waren. Mit Hilfe der Kongorot-Färbung konnte nach 12 Wochen bei fast allen Tieren artikuläres Amyloid nachgewiesen werden. *Mycoplasma synoviae* scheint nach Meinung der Autoren also durchaus eine Rolle bei der Ausprägung der amyloiden Arthropathie zu spielen.

## **2.4 Enterokokken**

### **2.4.1 Taxonomie**

Die Bezeichnung *Enterococcus* wurde erstmals 1903 in einer Veröffentlichung von THIERCELIN und JOUHAUD für grampositive Diplokokken aus dem menschlichen Verdauungstrakt verwendet. Diese Bakterien wurden wegen ihrer Fähigkeit, kurze und lange Ketten zu bilden, in *Streptococcus faecalis* umbenannt (ANDREWS & HORDER, 1906).

Auf Grund dieser Nomenklatur läßt sich die Geschichte der Enterokokken nicht separat von der des Genus *Streptococcus* betrachten. Über viele Jahre hinweg gab es sehr unterschiedliche Systematiken und Terminologien der Enterokokken, meist wurden sie als Streptokokken bezeichnet.

LANCEFIELD entwickelte 1933 eine serologische Methode, mit der die Streptokokken (und damit auch die Enterokokken) aufgrund unterschiedlicher Zellwandeigenschaften in serologische Gruppen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgte nach ihren spezifischen C-Substanzen (C = carbohydrate; an Nucleoprotein gebundene, abtrennbare gruppenspezifische

Substanzen mit Polysaccharid-Charakter), säurehydrolytisch darstellbare Polysaccharide, die mit stammspezifischen Seren präzipitieren (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Streptokokken nach LANCEFIELD

Gruppe	Spezies
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>
B	<i>Str. agalactiae</i>
C	<i>Str. equi, zooepidemicus, equisimilis, galactiae, pyogenes haemolyticus animalis</i>
D	<i>Str. faecalis, durans, liquefaciens, bovis</i>
E	<i>Str. uberis, infrequens</i>
F	<i>Str. minutus</i>
G	<i>Str. anginosus</i>
H	<i>Str. sanguis, dysgalactiae</i>
K-M	nicht näher bezeichnet
N	<i>Str. lactis, cremoris</i>
O-S	nicht näher bezeichnet

1937 schlug SHERMAN ein Klassifikationsschema für Streptokokken mit vier separaten Gruppen vor: *pyogenes*, *viridans*, *lactis* und *enterococcus*. Der Ausdruck *Enterococcus* wurde für Streptokokken benutzt, die über die typischen Eigenschaften von Streptokokken hinaus Wachstum bei Temperaturen zwischen 10 und 45°C, in bis zu 6,5%iger NaCl-Lösung sowie bei einem pH bis 9,6 zeigen und 30 min bei 60°C überleben. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, Äskulin zu spalten.

Die Enterokokken gingen aus der serologischen Gruppe D hervor. Jedoch nicht alle Enterokokken weisen die typischen Merkmale dieser Gruppe auf, oft werden sie auch der Gruppe Q zugeordnet. In Ausnahmefällen findet sich keine Gruppenzuordnung.

In den folgenden Jahren wurden zunehmend biochemische Eigenschaften zur Enterokokken-Differenzierung herangezogen.

JONES erweiterte 1978 die Einteilung von SHERMAN (1937) und änderte die Bezeichnungen *Enterococcus* und *Viridans* in 'orale' und 'faekale' Enterokokken. Er fügte die Gruppen *Pneumococcus*, *Anaerobic* und 'Andere' Streptokokken hinzu.

Anfang der achtziger Jahre brachte die DNS-Hybridisation Klarheit in die Systematik der Enterokokken. FARROW et al. (1983) zeigten anhand bestimmter biochemischer Leistungen

und vor allem der DNS-Hybridisation, dass unterschiedlich benannte Enterokokkenspezies ein und dieselbe Art darstellen. Gleichzeitig bestätigte sich aber eine große Speziesvielfalt. SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ (1984) belegten durch DNS-DNS- und DNS-rRNS-Hybridisation die grundsätzlichen Unterschiede zwischen *Str. faecalis* und *Str. faecium* einerseits und den anderen Streptokokken-Arten andererseits. Sie schlugen die Eingliederung von '*Streptococcus*' *faecalis* und '*Streptococcus*' *faecium* in die als Genus neu geschaffene Gruppe der Enterokokken vor (*E. faecalis* und *E. faecium*). Seit Etablierung des Genus *Enterococcus* 1984 durch SCHLEIFER und KILPPER-BÄLZ sind 19 unterschiedliche Spezies dem Genus *Enterococcus* hinzugefügt worden.

Auf Grund der 16S-rRNS-Sequenzanalyse des Genus *Enterococcus* zeichnen sich verschiedene Speziesgruppen ab (WILLIAMS et al. 1991): die *E. faecium*-Gruppe, die *E. avium*-Gruppe und die *E. gallinarum*-Gruppe.

Für *E. faecalis* und 4 weitere Arten bestehen individuelle Abstammungslinien (MARTINEZ-MURCIA und COLLINS 1991).

### **2.4.2 Morphologie**

Enterokokken sind kleine, grampositive Bakterien, die zum Teil kurze Ketten oder Paare bilden und zur physiologischen Flora des Magendarmtraktes bei Mensch und Tier gehören.

Enterokokken-Kolonien sind ungefähr 2 mm im Durchmesser, von runder Gestalt, glatt und hellgrau. In der Regel wachsen sie mit alpha-Hämolyse auf Schafblutagar.

Im mikroskopischen Bild sind die Bakterien ca. 2 µm groß. Sie sind unbegeißelt und daher unbeweglich (SELBITZ, 1992).

### **2.4.3 Eigenschaften**

Als Begleitkeime machen Enterokokken im Intestinum einen Anteil von <1% der Gesamtflora aus (KOLB, 1989). In Tabelle 2 sind die Keimarten der Intestinalflora beim Haushuhn (*Gallus gallus*) aufgelistet.

Tab. 2: Keimarten der Intestinalflora vom Haushuhn (KOLB, 1989)

<b>Hauptflora &gt;90%</b>	<b>Begleitflora &lt;1%</b>	<b>Restflora &lt;0,01%</b>
Clostridien	Enterokokken	Pseudomonas
Fusobakterien	Peptostreptokokken	Pilze
Eubakterien	Propionibakterien	

Enterokokken sind in der Lage, ein breites Spektrum an Umweltbedingungen zum Wachstum zu nutzen. Die meisten Enterokokken wachsen unter aeroben und fakultativ anaeroben Bedingungen, bei Temperaturen von 10 bis 45°C, einem pH-Wert des Mediums bis zu 9,6 und in Anwesenheit von 6,5% NaCl oder 40% Rindergalle. Ebenso findet Wachstum bei Zugabe von 0,1% Methylblau statt (SELBITZ, 1992). Die Äskulinspaltung durch Enterokokken ist eine Eigenschaft, die als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von Streptokokken (FACKLAM und MOODY, 1970) benutzt wurde.

Enterokokkeninfektionen sind empfindlich gegen verschiedene Antibiotika (v.a.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside). Verhält sich jedoch ein Erreger gegen diese Antibiotika resistent und/oder besteht wie beim Menschen eine entsprechende Allergie, müssen Glycopeptidantibiotika wie Vancomycin und Teicoplanin als Reservetherapeutika eingesetzt (WITTE, 1998).

Für die Durchführung von Resistenztests stehen hauptsächlich zwei Methoden zur Auswahl: der Agardiffusionstest und das Mikrodilutionsverfahren. Nach SCHWARZ et al. (2003) ist das Mikrodilutionsverfahren zur Zeit die Methode der Wahl für die Empfindlichkeitsprüfung, da hiermit die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) ermittelt werden können, die ein quantitatives Testergebnis darstellen.

#### **2.4.4 Bedeutung der Enterokokken beim Menschen**

Enterokokken finden sich in allen Bereichen des multikausalen Infektionsgeschehens (infektiöse Faktorenkrankheiten, Mischinfektionen, Hospitalismus), wobei ihre Bedeutung steigt: So stehen sie an dritter Stelle der auslösenden Keime bei Harnwegsinfektionen und in 5-15% werden sie als Verursacher bakterieller Endokarditiden beim Menschen (MURRAY, 1990) identifiziert. Nach Studien über neonatale Bakteriämien beim Menschen sind Enterokokken in bis zu 42% der Fälle beteiligt (LUGINBUHL et al., 1987).

Gemäß einer Erhebung des Robert-Koch-Instituts über Resistenzen der Enterokokken gegen Glycopeptidantibiotika (KLARE et al., 1995) werden etwa 17% der septischen Allgemeininfektionen in Krankenhäusern durch glycopeptidresistente Enterokokken ausgelöst, während ca. 10% der klinisch gesunden Menschen in ihrer Darmflora glycopeptidresistente Enterokokken aufweisen.

#### **2.4.5 Vergleich der Isolate**

Trotz ähnlicher biochemischer Eigenschaften haben verschiedene Isolate von *E. faecalis* nicht unbedingt das gleiche pathogene Potential. LANDMAN et al. (1998a) beschreibt, dass bei Tierversuchen einige Isolate von *E. faecalis* amyloidogene Wirkung auf die Gelenke der Versuchstiere hatten und andere nicht.

Nach Angaben von LANDMAN et al. (1998a) existieren Isolate mit unterschiedlicher Pathogenität in bezug auf Gelenkentzündung und Wachstumsdepression beim Geflügel.

### **2.5 Epizootiologie**

#### Amyloide Arthropathie

Die Übertragungswege für die amyloide Arthropathie sind noch immer unklar.

LANDMAN et al. (1999b) infizierte Eintagsküken und 6 Wochen alte Junghennen des braunen Legetyps auf verschiedenen Wegen mit *E. faecalis*. Intravenöse, intraperitoneale und intraartikuläre Injektionen mit höheren Dosen ( $10^8$  KBE pro Tier) führten zu einer amyloiden Arthropathie. Hingegen führte eine intratracheale bzw. orale Applikation zu keiner pathologischen Veränderung. Intramuskuläre Applikation führte nur bei Eintagsküken zu Arthritis und Wachstumsdepression. Das Dippen der Bruteier in *E. faecalis*-Suspension ( $10^8$  KBE/ml) bzw. die Inokulation einer *E. faecalis*-Suspension (0.25ml Suspension pro Ei mit  $10^8$  KBE/ml) in die Luftkammer führte in wenigen Fällen (3/100) zu Septikämie, jedoch konnte *E. faecalis* in keinem Fall aus den Gelenken der geschlüpften Küken reisoliert werden. Inokulationen ( $20$ ,  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  bzw.  $10^8$  KBE/Ei) in den Dottersack führten in jedem Fall zum Tod der Embryonen. Die Inokulation in die Allantoishöhle führte bei Dosen über  $10^3$  KBE/Ei ebenfalls zum Tod der Embryonen, bei einer Dosis von 30 KBE/Ei lag die Embryonensterblichkeit bei 76%. Eines der Küken aus dieser Gruppe zeigte im späteren

Verlauf Wachstumsdepression und einen steifen Gang, der für Fälle amyloider Arthropathie im Feld typisch ist. Der Autor schließt daraus, dass geringgradige Infektionen des Ovidukts mit *E. faecalis* zu einer möglichen vertikalen Übertragung führen können.

Bei einem späteren Versuch von LANDMAN et al. (2001b) wurden Elterntiere (braune Legehennen) im Alter von 27 Wochen mit  $10^9$  KBE eines arthropathischen / amyloidogenen *E. faecalis*-Isolat i.v. infiziert, um die vertikale Übertragung während einer sechswöchigen Legeperiode einzuschätzen. Alle Elterntiere entwickelten chronische Bakteriämie und Arthritis, 2 von 6 infizierten Tieren zeigten eine amyloide Arthropathie. Die Legeleistung war reduziert. In den ersten zwei Wochen nach der Inokulation konnte *E. faecalis* aus dem Dottersack von 76% der unbefruchteten Eier und aus allen abgestorbenen Embryonen reisoliert werden. 3% der geschlüpften Küken zeigten Arthritis, wobei keines im Alter von 8 Wochen eine amyloide Arthropathie entwickelte. Der Nachwuchs der infizierten Elterntiere zeigte im Alter von 8 Wochen eine deutliche Wachstumsdepression gegenüber den Kontrolltieren. Sowohl aus den Ovarien und den Eileitern der Elterntiere konnte *E. faecalis* bis zu 8 Wochen nach der Inokulation reisoliert werden. Nach Ansicht der Autoren ist dies ein Zeichen für eine mögliche vertikale Übertragung der Infektion.

LANDMAN et al. (2001c) stellten einen Versuch auf, bei dem Eintagsküken und 4 Tage alte Küken einem Aerosol ausgesetzt wurden, das  $10^5$  KBE / Liter eines amyloidogenen / arthropathogenen *E. faecalis*-Isolates enthielt. Einige der Tiere wurden zuvor mit Formaldehyd-Gas, einem Aerosol mit dem Newcastle-Disease-Vakzinevirus oder einer Methylprednisolon-Injektion behandelt (Tab. 3).

Tab. 3: Design des Experimentes (LANDMAN et al., 2001c)

<b>Gruppe</b>	<b>Alter in Tagen</b>	<b>Behandlung vor der Aerosol-Applikation von <i>E. faecalis</i></b>
1	1	keine
2	1	Aerosol-Applikation von Formaldehyd-Gas
3	4	Aerosol-Applikation des Newcastle-Disease-Vakzinevirus
4	4	Intramuskuläre Injektion von Methylprednisolon* im Alter von einem Tag
5 - Negativkontrolle	1	Aerosol-Applikation von Nährbouillon
6 - Positivkontrolle	1	Intramuskuläre Injektion von <i>E. faecalis</i>

\* Glukokortikoid, immunsuppressive Wirkung

Nach 24 h hatten die Tiere der Gruppen 1 und 2 die höchsten Raten an *E. faecalis*-positiven Blutkulturen mit 70 – 80%. In Gruppe 4 lag die Rate bei 30%, in Gruppe 6 bei 20%. Die Gruppen 3 und 5 blieben negativ. Nach 14 Tagen reduzierten sich die Bakteriämieraten auf 0 – 10%. Am Versuchsende nach 70 Tagen konnte bei keinem Tier mehr eine Bakteriämie festgestellt werden, Veränderungen an den Gelenken gab es nur in der Positivkontrolle, die Rate lag bei 73%, es handelte sich in allen Fällen um chronische Arthritis deformans.

Eine deutliche Reduzierung der Körpergewichte im Vergleich zur Negativkontrolle konnte ebenfalls nur in der Positivkontrolle festgestellt werden.

Daher legt der Autor die Vermutung nahe, dass eine Infektion mit *E. faecalis* über die Atemwege zwar zu einer kurzzeitigen Bakteriämie, nicht aber zur Ausprägung der amyloiden Arthropathie führt.

## **2.6 Symptome und Verlauf**

### Amyloidose allgemein

Bei der systemischen Amyloidose können keine spezifischen klinischen Symptome beobachtet werden, die Diagnose wird im allgemeinen postmortem während der Sektion gestellt. Klinische Symptome entwickeln sich entsprechend der Lokalisation der Amyloidablagerungen in den Organen bzw. richten sich nach der grundlegenden chronischen Erkrankung. Die präzise Diagnose erfordert eine histopathologische Untersuchung (GLYSTORFF & GRIMM, 1998).

### Amyloide Arthropathie

Bei braunen Legehennen werden im Alter von 5 bis 6 Lebenswochen die ersten Anzeichen der Erkrankung, wie Lahmheit und Wachstumsdepression, festgestellt. Bei künstlich infizierten Tieren zeigten sich diese schon 5 bis 7 Tage nach der Infektion (LANDMAN et al., 1998a). Erkrankte Tiere zeigen ein deutlich geringeres Wachstum als gleichaltrige gesunde Artgenossen, das Gefieder ist gestäubt, der Gang unsicher. Oft werden die Flügel zur Stabilisierung des Ganges benutzt. Die Tiere fallen durch die kükenhafte piepsende Stimme auf. Im weiteren Verlauf schwellen die Gelenke aufgrund von Entzündungen an. Hauptsächlich sind Hüft-, Knie- und Sprunggelenke betroffen (LANDMAN, 1999a). Meist ist die Schwellung nur einseitig zu beobachten. Die Fuß- und Flügelgelenke sind deutlich seltener betroffen. Die Epiphysen in der Umgebung der geschwollenen Gelenke erscheinen

meist verdickt. In einer Herde sind ca. 1 bis 4% der Hennen erkrankt, in einigen Fällen lag die Morbidität bei bis zu 20% (LANDMAN et al., 1994). Bei einer französischen Legehennenherde konnte von 30% an amyloider Arthropathie erkrankten Tieren berichtet werden (LANDMAN et al., 1998a).

## 2.7 Pathologisch-anatomische Veränderungen

### Amyloidose allgemein

Beim Vorliegen einer systemischen Amyloidose sind bei den meisten Arten mehrere Organe, wie z.B. Leber, Milz, Nieren und Dünndarm betroffen. Weniger anfällig sind Vormagen, Dickdarm, Herz, Gonaden und endokrine Organe. Sehr selten betroffen sind Gehirn, Lunge und Haut. Eine vaskuläre Amyloidose in diversen Organen ist bei Möwen (*Larus argentatus*) von HOFMANN & LEIGHTON (1985) beschrieben worden.

### Amyloide Arthropathie

LANDMAN et al. (1994) untersuchte 70 erkrankte braune Legehennen aus 6 verschiedenen Herden im Alter zwischen 10 und 26 Wochen, die aus unterschiedlichen Brütereien stammten. Alle Tiere waren deutlich kleiner als gesunde Artgenossen gleichen Alters, einige sogar kachektisch. Meist waren die Knie- und Sprunggelenke verdickt. Andere Gelenke sind in einem deutlich geringerem Maße beteiligt. Die erkrankten Gelenke, insbesondere die Sprunggelenke, zeigten chronische Osteoarthritiden und begleitend eine Osteomyelitis bei bis zu 40% der erkrankten Tiere. Gleichartige Veränderungen wurden auch bei künstlich infizierten Tieren gefunden (LANDMAN et al., 1997).

Die Epiphysen waren um das 1.5fache vergrößert. In 35% der Fälle wurden orangefarbene Ablagerungen in den oberflächlichen Schichten des Gelenkknorpels und im Bindegewebe der Gelenkkapseln festgestellt. Die Synovialflüssigkeit war vermehrt, getrübt und enthielt gelbliche Flocken. Amyloidablagerungen waren auch in den Sehnenscheiden der Sprunggelenke zu finden

Die natürlich erkrankten Tiere zeigten massive Amyloidablagerungen in den Gelenken. Die Gelenksveränderungen bei künstlich infizierten Tieren waren dagegen meist weniger deutlich, in einigen Fällen fanden sich nur leichte Erosionen der oberen Knorpelschichten..

Die inneren Organe von 82% der Tiere waren makroskopisch unverändert. In wenigen Fällen war die Leber vergrößert und die Milz geschwollen und blaß.

Bei einer Untersuchung von LANDMAN et al. (1997) zeigten sich die deutlichsten Veränderungen an inneren Organen in der Leber. Typisch waren Hepatomegalie, bei einigen Tieren verbunden mit bronzener Verfärbung und/oder kleinen subkapsulären Blutungen. Ebenfalls typisch waren Splenomegalie mit Marmorierung der Milz. Die Nieren erschienen blaß und geschwollen. Gelegentlich zeigten sich Dilatationen der linken Herzkammer, Hydroperikard oder ein Aszites.

## **2.8 Histopathologische Veränderungen**

### Amyloide Arthropathie

Künstlich mit *E. faecalis* infizierte Legehennen zeigten sowohl in den Femoro-Tibialgelenken als auch in den Tibio-Metatarsalgelenken Ablagerungen von Amyloid, die durch Kongorot-Färbung nachgewiesen wurden (LANDMAN et al., 1997). Die Synovialmembran zeigte Hypertrophien, der Gelenksknorpel teilweise kleine Läsionen. Das Amyloid war diffus in den oberen Schichten des Knorpels verteilt, in den tieferen Schichten befanden sich die Ablagerungen im Bereich der Gefäßwände und der Basalmembranen. Im Knochenmark gab es verstreute Areale mit Amyloid, ebenso zwischen den Fibrillen der Kreuzligamente und der inneren Gelenkskapsel. Darüber hinaus fanden sich Ablagerungen von Amyloid in der Leber, insbesondere in den Disse'schen Räumen und den Gefäßendothelien sowie in der Milz im Bereich der weißen Pulpa. In der Niere wurde Amyloid mehr oder weniger diffus im Interstitium von Nierenrinde und Nierenmark nachgewiesen. Des weiteren konnten Amyloidablagerungen in der Mukosa des Drüsenmagens, in der Propria mucosae des Dünndarms und in den intramuralen Gefäßen des Myokards nachgewiesen werden (LANDMAN et al., 1997).

## **2.9 Diagnose**

### Amyloide Arthropathie

Die Symptome der amyloiden Arthropathie sind weitgehend unspezifisch, daher kann eine sichere Diagnose nicht allein mit Hilfe des klinischen Bildes gestellt werden. Für die Diagnosestellung ist zum einen die pathologisch-anatomische und histologische Untersuchung von großer Bedeutung, um vorhandene Amyloiddepots in den Gelenken

aufzuzeigen. Bei akutem Verlauf der Erkrankung können diese jedoch zunächst fehlen, daher ist ein bakteriologischer Nachweis von *E. faecalis* für den Nachweis einer amyloiden Arthropathie erforderlich (LANDMAN et al., 1998a).

### **2.9.1 Isolierung**

Aus Tupferproben von Gelenken erkrankter Tiere konnten Enterokokken in 77% der Fälle reisoliert werden (LANDMAN et al., 1998a).

Zur Kultivierung eignen sich Nährböden auf der Basis von Mischpeptonen aus Casein, Sojabohnenmehl und/oder Fleisch, die zusätzlich Hirn- oder Herzinfusion enthalten. Den Agarmedien wird zur Beurteilung der Hämolyse 5% Schafblut zugesetzt. Auf der Blutplatte wachsen sie als kleine (2-3mm), runde, weißgraue, glatte Kolonien meist mit  $\alpha$ -Hämolyse (SELBITZ, 1992).

Zur Unterdrückung einer möglichen Begleitflora werden Selektivmedien eingesetzt, welche die natürliche Resistenz der Enterokokken gegen Galle, Äskulin (FACKLAM und MOODY, 1970) und Natriumazid ausnutzen (REUTER, 1992). Da Enterokokken außerdem in Gegenwart von 2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid wachsen, eignet sich ebenfalls CATC-Agar [Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agar] nach REUTER (1992) (Trockennährbodenbasis 10279, Merck, Darmstadt, D). Geeignete handelsübliche Medien sind Chromocult Enterokokken-Bouillon (Merck 1.10294.0100) und Äskulin-Galle-Agar (Merck 11432).

### **2.9.2 Indirekter Nachweis**

Für den Antikörpernachweis liegen Untersuchungsergebnisse mit dem Western Blot (Immunoblotting) und dem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) vor.

AITCHISON et al. verwendeten 1987 eine Western Blot (Immunoblotting) für den Nachweis von Antikörpern gegen *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* bei Patienten mit Endokarditis. Beim Vergleich dieses Western Blots mit einem ELISA stellte sich die Immunoblotting-Methode als nicht geeignet für die Routine-Serodiagnostik dar (SHORROCK et al., 1989).

ARDUINO et al. (1994) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von *E. faecalis*-Antikörpern beim Menschen. Dieser Test wurde von LANDMAN et al. (1999b) für die Untersuchung von Hühnerserum modifiziert.

Das Antigen für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde aus Übernachtskulturen von einem arthropathogenen / amyloidogenen *E. faecalis*-Isolat gewonnen. Die Kolonien wuchsen auf Schafblutagarplatten heran, wurden mit PBS-Puffer ab gespült, dreimal gewaschen und in Carbonat-Puffer verdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Darauf erfolgte ein Blocken der Reaktion mit bovinem Serumalbumin (BSA) und ein Waschen der Platten. Danach waren die Platten einsatzfähig. Weitere Ergebnisse sind nicht verfügbar. Ein kommerzieller ELISA-Test-Kit steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung.

## **2.10 Differentialdiagnosen**

Erkrankungen des Skelettsystems können von vielen infektiösen und nichtinfektiösen Faktoren verursacht werden.

Zu den nichtinfektiösen Faktoren gehören unter anderem ein genetisch bedingtes schnelles Wachstum bei Masttieren, Fütterungsfehler wie Mineralstoff-, Vitamin D- oder Vitamin B12-Mangel und auchaltungsprobleme mit zu hohen Besatzdichten, schlechter Einstreu, falsch eingestellten Lichtprogrammen und Bewegungsmangel.

Wachstumsdepressionen und die Verminderung der Legeleistung finden sich bei den meisten infektiösen Erkrankungen des Huhnes, wobei im Gegensatz zur amyloiden Arthropathie häufig die Atemwege und/oder der Verdauungstrakt an der klinischen Symptomatik beteiligt sind (SIEGMANN, 1993).

Arthritiden können durch eine Reihe von aviären Erregern hervorgerufen werden, deren Beteiligung bei der Diagnosestellung abgeklärt werden muß (Tab. 4).

Tab. 4: Erreger, die an Arthritiden beim Huhn beteiligt sein können (HILBRICH, 1978 und SIEGMANN, 1993)

Bakterien	Mycoplasmen	Viren
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> *	Reovirus
<i>Escherischia coli</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>	
<i>Pasteurella multocida</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Salmonella enteritidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Streptokokken (v.a. Gr. C)		
Yersinien *		

\* - selten

LANDMAN et al. (1998a) untersuchten die amyloidogene Wirkung von einigen der oben aufgelisteten Erregern zuzüglich eines Chicken-Anaemia-Virus-Isolates (CAV), das aus dem amyloidotischen Gelenk eines Krankheitsfalles aus dem Feld isoliert worden war. Dabei wurden vergleichbare Dosen der Erreger in einem Versuch intravenös und in einem weiteren Versuch intraartikulär in das linke Kniegelenk injiziert. Die Tiere wurden 10 bzw. 6 Wochen nach den Injektionen untersucht. Keiner der untersuchten Keime zeigte so deutliche amyloidogene Effekte wie *E. faecalis*. Geringgradige Amyloidablagerungen verursachten *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherischia coli* (Tab. 5).

Tab. 5: Darstellung des amyloidogenen Potentials verschiedener Erreger von Arthritis beim Huhn nach intravenöser bzw. intraartikulärer Applikation (LANDMAN et al., 1998a)

	Anteil der amyloid-positiven Tiere in %	
	intravenöse Applikation	intraartikuläre Applikation
<i>E. faecalis</i>	100	33
<i>Salmonella enteritidis</i>	15	67
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	25
<i>Escherischia coli</i>	10	0

Die intraartikuläre Injektion von Freund's Adjuvans führt bei 50% der Versuchstiere zu Amyloidablagerungen in den Gelenken.

Die beiden untersuchten Isolate von CAV und Reovirus konnten ebenso wie *Mycoplasma synoviae* in keinem Fall Gelenksamyloidose auslösen.

## **2.11 Bekämpfungsmaßnahmen**

### **2.11.1 Therapie**

Amyloidablagerungen sind irreversibel, eine Behandlung kann daher nur darauf ausgerichtet sein, die ursächliche chronische Infektion zu bekämpfen. Damit kann eine weitere Fibrillogenese verhindert werden (GYLSTORFF & GRIMM, 1998).

### **2.11.2 Prophylaxe**

Amyloidosen treten öfter bei Tieren auf, die schlecht an die Zoo- bzw. Farmbedingungen angepasst sind (COWAN, 1968b; KARSTAD & SILEO, 1971). Die Autoren nehmen daher an, dass Stressfaktoren die Häufigkeit der Erkrankung begünstigen. Zu einer effektiven Vorbeugung gegen den Ausbruch von Amyloidosen wie der amyloiden Arthropathie gehört also auch die Verbesserung der Haltungsbedingungen der empfänglichen Tiere.

Eine frühzeitig einsetzende Antibiose kann zwar chronische Infektionen verhindern, ist jedoch angesichts der zunehmenden Resistenzbildungen der Enterokokken nicht angezeigt.