

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Teil 1: Keimisolation und Charakterisierung**

##### **3.1.1 Material**

###### **3.1.1.1 Bakterien-Isolate**

Im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht Cuxhaven wurden von 1996 bis 2000 Isolate von *E. faecalis* aus Norddeutschland aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien, wie z.B. Gelenkputfern, Organputfern (u.a. aus der Leber), Eiern und sog. Steckenbleibern (während des Schlupfes verwendete Küken) gewonnen und unserem Institut zu weiteren Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Davon wurden 58 Isolate nach dem Zufallsprinzip für die Charakterisierung ausgewählt.

Als Referenzstamm für die Untersuchungen wurde das *E. faecalis*-Isolat K923/96-1 verwendet. Dieses Isolat stammt aus dem Gelenk einer an der amyloiden Arthropathie erkrankten braunen Legehenne und wurde für die vorliegende Arbeit als pathogen eingestuft. Des Weiteren wurden der *E. faecium*-Stamm 80b und der *E. faecalis*-Stamm 1528 als Positivkontrolle für die Untersuchung auf Vancomycinresistenz verwendet. Diese Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Ellerbroek (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) zur Verfügung gestellt.

###### **3.1.1.2 Medien, Puffer und Geräte**

###### **Anzuchtmedien:**

###### **Schafblutagarplatten:**

(CM 55 Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

Fleischextrakt	10,0 g/l
Pepton	10,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Agar	15,0 g/l
5-10% defibriniertes Schafblut	

40,0 g der Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren, dann auf 50°C abkühlen und das Blut zufügen.

**Äskulin-Galle-Agarplatten:**

(11432 Merck, Darmstadt, D)

Fleischextrakt	3,0 g/l
Pepton aus Fleisch	5,0 g/l
Ochsengalle	40,0 g/l
Äskulin	1,0 g/l
Eisen (III)-citrat	0,5 g/l
Agar	14,5 g/l

In 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, auf pH 6,6 einstellen.

**Standard I-Agarplatten:**

(CM0463 Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

Caseinpepton	5,0 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
Glukose	1,0 g/l
Agar	15,0 g/l

In 1 Liter Aqua dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren

**CATC-Agar**

(1.10279.0500 Merck, Darmstadt, D)

Caseinpepton	15,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
Kaliumhydrogenphosphat	5,0 g/l
Natriumzitat	15,0 g/l
Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween® 80)	1,0 g/l
Agar-agar	15,0 g/l
Natriumkarbonat	2,0 g/l
2,3,5-Triphenyltetrazolinchlorid	0,1 g/l
Natriumazid	0,4 g/l

In 1 Liter Aqua dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren. Bei einer Temperatur von 50°C mit 20 ml 10%iger Natriumkarbonatlösung, 10 ml 1 %igen 2,3,5-Triphenyltetrazolinchloridlösung und 4 ml 10 %igen Natriumazidlösung pro Liter mischen, jedesmal sterilfiltern. Auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$  bei 25°C einstellen.

### **CASO-Bouillon:**

(# 1.05459 Merck, Darmstadt, D)

Caseinpepton	17,0 g/l
Sojacasein	3,0 g/l
Glukose	2,5 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g/l

In 1 Liter Aqua dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren, auf einen pH-Wert von 7,3 einstellen.

### **Chromocult Enterokokken Bouillon:**

(1.10294.0100 Merck, Darmstadt, D)

Peptonmischung	8,6 g/l
Natriumazid	0,6 g/l
Natriumchlorid	6,4 g/l
5-Bromo-4-Indolyl-b-D-Glucopuranosid	0,04 g/l

In 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen.

### **Tryptosephosphat-Bouillon:**

(CM0283 Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)

Tryptose	20,0 g/l
Glukose	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g/l

In 1 Liter warmem Aqua dest. lösen und 15 min bei 121°C autoklavieren. Auf einen pH-Wert von 7,3 einstellen.

**Puffer und Gebrauchslösungen:**

***Für die Agargelpräzipitation (AGP):***

**PBS:**

Natriumchlorid	40,0 g/l
Kaliumchlorid	1,0 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat	5,75 g/l
Kaliumhydrogenphosphat	1,0 g/l

Die Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren.

***Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE):***

**TE- Puffer:**

EDTA (III)	0,37224 g/l
Tris-HCl (# 1,01549 Merck, Darmstadt, D)	1,2114 g/l

Die Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen.

**Lysispuffer:**

Natriumchlorid	58,6 g/l
Tris-HCl	0,726 g/l
EDTA (III)	37,22 g/l
Brij (# 801962 Merck, Darmstadt, D)	5,0 g/l
Laurylsarkosin	5,0 g/l
Desoxycholat	2,0 g/l

Die Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen.

**TBE-Puffer (10x - Konzentrat) :**

Tris-HCl	60,6 g/l
Borat	30,9 g/l
EDTA II	2,92 g/l

Die Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren.

Für den Laufpuffer wird das Konzentrat auf 0.5x verdünnt, d.h. 125 ml 10x – Konzentrat plus 2375 ml Aqua bidest., insgesamt 2500 ml Puffer.

**PMSF-Gebrauchslösung:**

PMSF	0,17419 g/10 ml
Isopropanol	

Gebrauchslösung in 10 Eppendorf-Pipetten alliquotieren, Lagerung bei –20°C

**Sma I-Puffer W/React 4 70P**

(#15228-018 Gibco BRL, Karlsruhe, D)

Gebrauchsfertige Lösung

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

Ethidiumbromid	0,1 g/10 ml Aqua bidest.
----------------	--------------------------

Für die Gebrauchslösung 50 ml Stammlösung mit 1,5 Liter Aqua bidest. verdünnen.

**sonstige Reagentien:**

***Für die Charakterisierung und Resistenztests:***

- api20-Strep-Test (2060 Bio Merieux, Marcy l'Etoile, France)
- Resistenztest mit dem Micronaut-System (Merlin GmbH; Bornheim-Hersel, D)
- Vancomycin-Hydrochlorid (# V8138 Sigma, München, D)

***Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE):***

- Marker: Pulse Marker 50 – 1000 kb (# D2416 Sigma, München, D)  
Pulse Marker 0,1 – 200 kb (# D2291 Sigma, München, D)
- InCert-Agarose (# 850121 Biozym Diagnostik, Hamburg, D)
- Lysozym (# 107 255 Roche Diagnostics, Mannheim, D)
- Proteinase K (# 1 373 196 Roche Diagnostics, Mannheim, D)
- PMSF (# 236 608 Roche Diagnostics, Mannheim, D)
- SmaI (# 1 047 639 Roche Diagnostics, Mannheim, D)
- Low-Melting Point Agarose (# 15517-014, Gibco BRL, Karlsruhe, D)
- Aqua dest.
- Aqua bidest.

**Arbeitsgeräte:**

***Für die Agargelpräzipitation (AGP):***

- Brutschrank (Jamesway, Ontario, Canada)
- Pipettboy (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)
- Zentrifuge (Heraeus Instruments, Hanau, D)
- Eppendorf-Zentrifuge (# 5415 C Eppendorf, Hamburg, D)
- Wasserbad

***Für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE):***

- Schüttelinkubator (Beckmann, München, D)
- Pipettboy (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)
- Zentrifuge (Heraeus Instruments, Hanau, D)
- Magnetrührer (Heidolph, Schwabach, D)

- Eppendorf-Zentrifuge (# 5415 C Eppendorf, Hamburg, D)
- Spektralphotometer VP (Jouan S.A., St. Herblain, Frankreich)
- Mikrowelle (Philips Electronics, N.V.)
- Chef Dr III (BioRad, München, D)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen, D)

### ***Für den Pathogenitätstest:***

- Brutschrank (Jamesway, Ontario, Canada)
- Spektralphotometer VP (Jouan S.A., St. Herblain, Frankreich)
- Quecksilberdampfampe (Norddeutsche Laborbau, D)

### **Verbrauchsmaterialien:**

- Einmalkanülen (Sterican®, Braun, Melsungen, D)
- Einmalspritzen (TERUMO Europe N.V.)
- Probenröhrchen (Eppendorf, Hamburg, D)
- Microbank-Röhrchen (# 291602 Mast Diagnostica, Reinfeld, D)
- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (# 0030120.086 Eppendorf, Hamburg, D)
- Schraubkappenröhrchen, 20 ml Volumen

### **3.1.1.3 Bruteier und Versuchstiere**

Zur Durchführung der Pathogenitätstests im Brutei wurden SPF-Bruteier (VALO, Lohmann Cuxhaven) verwendet.

Der Pathogenitätstest im Versuchstier wurde im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht Cuxhaven durchgeführt. Für diesen Test wurden 45 Legehennen der Rasse Lohmann Brown verwendet, die zu Versuchsbeginn ein Alter von 6 Wochen hatten. Die Tiere wurden in 3 Gruppen aufgeteilt. Je 15 Tiere wurden in einem Käfig eingestallt und erhielten Küken-Alleinfutter (RWZ Rhein Main, Köln, D). Futter und Trinkwasser standen zur beliebigen Aufnahme bereit. Die Tiere wurden nach Einstellung mit Flügelmarken einzeln gekennzeichnet.

### **3.1.2 Methoden**

#### **3.1.2.1 Isolierung**

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Enterokokken dienten in erster Linie Tupferproben aus den Gelenken klinisch erkrankter Tiere aus dem Feld, außerdem eingesendete Proben aus Leber, Herz, Milz, Knochenmark und Ovarialfollikel.

Das eingesendete Organmaterial wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, äußerlich abgeflammt, mit sterilem Besteck aufgeschnitten und auf einer Schafblutagarplatte ausgestrichen bzw. in Chromocult Enterokokken-Bouillon gegeben. Die zu untersuchenden Gelenke wurden abgeflammt, mit sterilem Besteck eröffnet und eine Tupferprobe des Exsudates entnommen. Der Tupfer wurde anschließend auf einer Schafblutagarplatte ausgestrichen und dann in Chromocult Enterokokken-Bouillon gegeben.

#### **3.1.2.2 Charakterisierung**

##### **3.1.2.2.1 Stoffwechselfparameter**

###### **3.1.2.2.1.1 Biochemische Eigenschaften**

Zur Untersuchung der biochemischen Eigenschaften wurden Reinkulturen von 58 *E. faecalis*-Isolaten verwendet.

Mittels Gramfärbung und Katalasetest wurden die Kulturen als Streptococcaceae identifiziert. Um eine Unterscheidung zwischen Enterokokken und anderen Streptokokken zu treffen, wurden die Isolate auf Äskulin-Galle-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Dabei wurde von Enterokokken das Äskulin gespalten, woraus eine Schwarzfärbung des Agars resultierte.

Danach erfolgte die Identifizierung mit dem apiStrep-Test. Dieses System ermöglichte eine Identifikation von Streptokokken auf Speziesebene über den Nachweis von biochemischen Reaktionen des jeweiligen Isolates auf verschiedene Substanzen und Nährmedien. Geprüft wird u.a. die Fähigkeit der Isolate zur Aufspaltung von Äskulin, Leucinarylamidase, Laktose,

Inulin und Glykogen. Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Resultate mit einer Prozenttabelle des Herstellers des apiStrep-Tests.

### 3.1.2.2.1.2 Resistenztest

Von den Isolaten wurden im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht Cuxhaven Antibiogramme im Mikrodilutionsverfahren mit dem Micronaut-System erstellt, um ein Profil der Resistenzlage zu erhalten. Die Untersuchungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plattenbelegung ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Plattenbelegung zur Bestimmung der MHK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	ERY 8	GEN 8	PEN 2	SUL 512	TET 1	AM 1	AMP 16	ENRO 8	CST 4	LIN 0.5	TYLO 2	CEFT 8
<b>B</b>	ERY 4	GEN 4	PEN 1	SUL 256	TET 0.5	AM 0.5	AMP 8	ENRO 4	CST 2	LIN 0.25	TYLO 1	CEFT 4
<b>C</b>	ERY 2	GEN 2	PEN 0.5	SUL 128	TET 0.25	AM 0.25	AMP 4	ENRO 2	CST 1	LIN 0.125	TYLO 0.5	CEFT 2
<b>D</b>	ERY 1	GEN 1	PEN 0.25	SUL 64	TET 0.125	AM 0.125	AMP 2	ENRO 1	CST 0.5	LIN 0.0625	TYLO 0.25	CEFT 1
<b>E</b>	NEO 16	PEN 32	STREP 512	TET 16	AM 16	TRI 16	AMP 1	ENRO 0.5	LIN 8	RIF 4	KANA 32	CEFT 0.5
<b>F</b>	NEO 8	PEN 16	STREP 256	TET 8	AM 8	TRI 8	AMP 0.5	ENRO 0.25	LIN 4	RIF 2	KANA 16	CEFT 0.25
<b>G</b>	NEO 4	PEN 8	STREP 128	TET 4	AM 4	TRI 4	AMP 0.25	ENRO 0.125	LIN 2	RIF 1	KANA 8	GC
<b>H</b>	NEO 2	PEN 4	STREP 64	TET 2	AM 2	TRI 2	AMP 0.125	ENRO 0.0625	LIN 1	RIF 0.5	KANA 4	GC

Erythromycin  
Neomycin  
Gentamycin  
Penicillin G  
Streptomycin  
Sulfonamid  
Tetracyclin  
Amoxicillin  
Trimethoprim

ERY  
NEO  
GEN  
PEN  
STREP  
SUL  
TET  
AM  
TRI

Ampicillin  
Enrofloxacin  
Colistin  
Lincomycin  
Rifampicin  
Tylosin  
Kanamycin  
Ceftiofur  
Wachstumskontrolle

AMP  
ENRO  
CST  
LIN  
RIF  
TYLO  
KANA  
CEFT  
GC

Besonderes Augenmerk wurde auf die mögliche Resistenz gegen Vancomycin gelegt. Um diese zu prüfen, wurde jeweils eine Kolonie der zu untersuchenden Isolate in CASO-Bouillon gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Trübung der Keimsuspensionen wurde auf McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Von den zuvor eingestellten Keimsuspensionen wurden je 3 µl auf CATC-Agar aufgetropft und über Nacht bei 37°C inkubiert. CATC-Agar wurde zuvor hergestellt und mit 6 mg Vancomycin pro Liter versetzt. Pro Agarplatte wurden 10 Isolate getestet.

Es wurden der *E. faecium*-Stamm 80b und der *E. faecalis*-Stamm 1528 als Vancomycin-resistente Positivkontrolle mitgeführt. Vancomycin-resistente Kolonien der Gattung *Enterococcus* färben sich durch die Reduktion des im Agar enthaltenen Triphenyltetrazolinchlorid zu Formazan kräftig rot.

### **3.1.2.2.2 Untersuchung zur Feststellung der Antigenverwandtschaft der verschiedenen Isolate**

Versuche zur Feststellung der Antigenverwandtschaft bzw. Serotypisierung verschiedener Isolate wurden mit der Agargelpräzipitation (AGP) durchgeführt.

In einem Vorversuch wurde Antiserum gegen den Referenzstamm K923/96-1 hergestellt und gegen jedes der 58 *E. faecalis*-Isolate getestet (Methodik siehe unten). Von den Isolaten, die nicht mit diesem Antiserum reagierten, wurden die Isolate Nr. 3 und Nr. 30 ausgewählt. Diese Isolate wurden dann ebenfalls zur Herstellung von Antiserum herangezogen und gegen jedes Isolat in der AGP getestet.

#### **3.1.2.2.2.1 Herstellung des Antigens**

Für die Durchführung der Agargelpräzipitation wurde von jedem der zu untersuchenden Isolate hitzestabiles Antigen in Anlehnung an die von HAFEZ (1998) und HAFEZ und STING (1999) beschriebenen Methode hergestellt.

Dazu wurden Schafblutagarplatten beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Koloniematerial wurde mit 6 ml PBS von der Platte abgeschwemmt und bei 3000 U/min 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 6 ml PBS

resuspendiert. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die dritte Resuspension erfolgte in 0,6 ml PBS.

Anschließend wurde die Suspension für 60 min im Wasserbad auf 100°C erhitzt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 U/min für 30 min. Der entstandene Überstand wurde als hitzestabiles Antigen abgenommen, bei –20°C gelagert und für die Durchführung der Agargelpräzipitation verwendet.

### 3.1.2.2.2.2 Herstellung von positiven Kontrollseren

Zur Antiserumgewinnung wurden drei Kaninchen im Alter von 4 Monaten mit je einem *E. faecalis*-Isolat (Tab. 7) hyperimmunisiert. Ausgewählt wurden dafür der Referenzstamm K923/96-1 und zwei Isolate mit stark abweichenden biochemischen Eigenschaften. Die Tiere wurden intravenös mit 1ml einer Keimsuspension von  $10^{10}$  KBE/ml infiziert. Die Immunisierung wurde viermal im Abstand von je einer Woche unter Verwendung der gleichen Dosierung wiederholt. Ein viertes Tier gleichen Alters diente als Kontrolltier und erhielt PBS-Injektionen.

Tab. 7: *E. faecalis*-Isolate zur Hyperimmunisierung von Kaninchen

Tier-Nr.	<i>E. faecalis</i> -Isolate
#1	K 923/96-1
#2	Nr. 3
#3	Nr. 30
#4	Sterile PBS-Lösung

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden den Versuchstieren Blutproben entnommen. Die aus dem Blut gewonnenen Seren wurden bei –20°C aufbewahrt.

### 3.1.2.2.2.3 Durchführung der Agargelpräzipitation

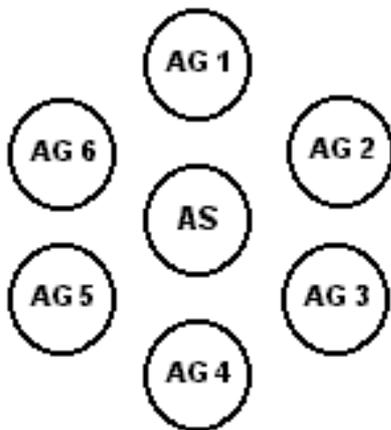
In runde Ausstanzungen von 5 mm Durchmesser und mit einem Abstand von 4 mm auf einer Agargelplatte wurde je 20 µl Antigen bzw. antikörperhaltiges Serum gegeben (Abb. 1). Dabei konnten gleichzeitig 6 verschiedene Isolate gegen ein antikörperhaltiges Serum getestet

werden. Die Agargelplatte wurde bis zu drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert und täglich abgelesen. Die Reaktionen erfolgten innerhalb von 24 Stunden und wurden im späteren Versuchsverlauf lediglich verstärkt. Bei einer positiven Reaktion wurde eine schmale weiße Bande zwischen der Antiserum- und der Antigenausstanzung sichtbar.

Zunächst wurden alle Isolate gegen das Antiserum K923/96-1 untersucht. Die Isolate, die nicht mit diesem Antiserum positiv reagierten, wurden dann gegen das Antiserum Nr. 3 untersucht und schließlich gegen Antiserum Nr. 30.

Dabei wurden im Verlauf mehrerer Durchgänge jedes der 58 *E. faecalis*-Isolate gegen jedes der drei Antiseren untersucht.

Abb. 1: Anordnung von Antigen und Antiserum auf der Agargelplatte



AG – Antigen

AS – Antikörperhaltiges Serum

### 3.1.2.2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

In der Diagnostik fehlen zur Zeit Methoden, um *E. faecalis*-Stämme von unterschiedlicher Pathogenität zu unterscheiden. Zu diesem Zweck sollten die DNS-Restriktionsmuster der *E. faecalis*-Isolate mit Hilfe der PFGE untersucht werden.

Das grundlegende Prinzip der PFGE und der Unterschied zur konventionellen Elektrophorese besteht darin, mit Spannungsimpulsen verschiedener Länge und Richtung auch große Moleküle effektiv auftrennen zu können.

Für die Durchführung der PFGE wurde ein Protokoll in Anlehnung an die von MIRANDA et al. (1991) und KLARE und WITTE (1997) beschriebene Methode verwendet.

Zunächst wurde von jedem der zu untersuchenden Isolate eine Einzelkolonie in 20 ml CASO-Bouillon suspendiert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Die gesamte Kultur wurde für 15 min bei 3.000 U/min und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment in 5 ml gekühltem TE-Puffer resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 3.000 U/min. Der Überstand wurde wiederum dekantiert und das Sediment in 250 µl gekühltem TE-Puffer resuspendiert.

Mit Hilfe eines Photometers wurde die Dichte der Suspension bei einer Wellenlänge von 620 nm auf 5% Transmission eingestellt. Zwischen der Einstellung der einzelnen Isolate wird die Meßküvette mehrmals mit Alkohol und Aqua bidest. gespült.

Es wurden pro Isolat 3 Gelblöckchen zu je 100 µl gegossen. Das 1,5%ige Gel für die Blöckchen wurde aus InCert-Agarose und TE-Puffer hergestellt. Das Gel wurde bei einer Temperatur von 56°C 1:1 mit auf 56°C angewärmter Keimsuspension vermischt und in den Gießblock gefüllt. Die abgekühlten Blöckchen wurden bei 4°C gelagert.

Anschließend erfolgte der enzymatische Aufschluß der Bakterienwände durch die Zugabe von Lysozym. Pro Blöckchen wurde 1 mg Lysozym (105.000 Einheiten/mg) und 200 µl Lysispuffer benötigt. Der Aufschluß fand über Nacht bei 37°C statt.

Für die Deproteinisierung wurde pro Blöckchen 5 µl Proteinase K-Lösung direkt auf den Lysisansatz gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 56°C inkubiert.

Um die überschüssige Proteinase zu entfernen, wurde der Lysisansatz abgezogen und die Blöckchen je viermal mit 200 µl TE-Puffer pro Blöckchen gespült. Jeder Spülschritt dauerte 30 min und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem zweiten Spülgang wurde pro Blöckchen 2 µl PMSF-Gebrauchslösung in den Spülpuffer gegeben, um Proteinase-Reste zu inaktivieren. Die Blöckchen wurden in der PMSF-Lösung 1 h bei 56°C inkubiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Nach dem letzten Spülgang kann die Restriktion erfolgen. Es wurden pro Blöckchen 40 Einheiten SmaI, 20 µl SmaI-Puffer und 179 µl Aqua bidest. vermischt. In dieser Lösung wurden die Blöckchen für 24 h bei 25°C inkubiert.

Die Gießform für das Trägergel und der Kamm für die Slots müssen gründlich gereinigt werden. Für das Trägergel mit einem Volumen von 120 ml wurde 1,32 g Molecular Biology Certified Agarose (BioRad) in 0,5%igem TBE-Puffer angesetzt. Das Gel wurde gegossen und bei 4°C abgekühlt. Der Kamm wurde entfernt und die Slots mit den aufbereiteten Blöckchen gefüllt. Als Marker dienten PFGE-Marker (Sigma) mit 0,1 – 200 kb und 50 – 1000 kb. Zudem wurde in jedem Gel der Referenzstamm K923/96-1 mitgeführt. Die Slots wurden mit etwas flüssigem Gel verschlossen.

Die Auftrennung erfolgte im Chef Dr III (BioRad). Die Kammer wurde mit Aqua bidest gespült und dann mit ca. 2,5 Liter 0,5%igem TBE-Puffer gefüllt. Der Puffer wurde auf 14°C abgekühlt. Das Gel wurde in die Kammer eingesetzt, 30 min akklimatisiert und danach das Programm gestartet. Das Programm ist in Tabelle 8 dargestellt. Bei einer Pumpengeschwindigkeit von 70 (entspricht einer Durchflußrate von 0,7 Liter/min) erfolgt die Auftrennung der DNS-Fragmente bei einer Spannung von 6 V/cm. Laut Angabe des Herstellers ergeben sich je nach DNS-Größe unterschiedliche Pulswechselraten. Da bei der Auftrennung der DNS von *E. faecalis*-Isolaten Fragmente in der Größe zwischen 10 und 1000 kb erwartet werden (LANDMAN et al., 1998a), empfiehlt sich zunächst ein Block mit Pulswechselraten von 1 - 13 sec für 20 Stunden für die Fragmente von 1 kb bis 200 kb und anschließend ein zweiter Block mit Pulswechselraten von 13 - 30 sec für 5 Stunden für die Fragmente von 200 kb bis 1000 kb.

Tab. 8: Einstellungen des Chef Dr. III

Pumpen- geschwindigkeit	Temperatur	Volt / cm	Volt	Ramping time		
					Pulswechsel- raten	Laufzeit
70	14 °C	6	200	<b>Block I</b>	1 – 13 sec	20 h
				<b>Block II</b>	13 – 30 sec	5 h

Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel entnommen und für 25 min in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Anschließend wurden die DNS-Banden in einer Dunkelkammer unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit der Analyse-Software Bio1D (Vilber Lourmat, Frankreich).

### **3.1.2.2.4 Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate**

#### **3.1.2.2.4.1 Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate an Bruteiern**

27 der 58 *E. faecalis*-Isolate wurden ausgewählt und im Brutei auf ihre Pathogenität getestet (WOOLEY et al., 2000). Die Auswahl der *E. faecalis*-Isolate erfolgte willkürlich und mußte aufgrund des hohen Verbrauchs an Probenmaterial (20 Bruteier pro Testisolat) erfolgen.

Die Beimpfung erfolgte am 10. Bruttag in die Allantoishöhle.

Die Anzucht der zu untersuchenden *E. faecalis*- bzw. *E. faecium*-Isolate erfolgte auf Schafblutagar. Die Agarplatten wurden für 24h bei 37°C aerob inkubiert. Danach wurden die Kulturen mit PBS abgewaschen. Die Zellsuspensionen wurden bei einer Wellenlänge von 650 nm auf eine optische Dichte von  $A=0,165$  eingestellt. Diese Dichte entspricht einer Keimzahl von  $5 \times 10^7$  KBE/ml. Nach der Einstellung der OD erfolgte eine Verdünnung der Suspensionen auf eine Keimzahl von ca. 2500 KBE/ml. Für die Beimpfung der Bruteier wurden 0,2 ml Keimsuspension verwendet, dies entsprach einer Infektionsdosis von ca. 500 KBE pro Ei.

Für jedes *E. faecalis*-Isolat wurden 20 Bruteier mit lebenden Embryonen zur Pathogenitätsbestimmung angesetzt. Unbefruchtete oder abgestorbene Bruteier wurden unmittelbar vor dem Beimpfen durch Schieren unter Verwendung einer Quecksilberdampflampe aussortiert. Nach einer Oberflächendesinfektion mit 70%igem Alkohol wurde die Eischale mittels Eiloher vorsichtig am stumpfen Pol eröffnet. Das Beimpfen erfolgte mit Hilfe steriler Einwegspritze und -kanüle in die Allantoishöhle am 10. Bruttag. Die Öffnung in der Eischale wurde mit Holzleim (Ponal, Henkel, Düsseldorf) verschlossen.

Als Negativkontrolle wurden 10 Bruteier mitgeführt, die jeweils mit 0,2 ml sterilem PBS beimpft wurden.

Zur Kontrolle der tatsächlich ins Ei verbrachten Zellzahlen wurde eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt.

Die eingesetzten Suspensionen wurden um den Faktor 10 verdünnt. Von dieser Verdünnungsstufe wurden 0,1 ml auf eine Standard I-Agarplatte getropft und mittels Oberflächenspatelverfahren auf der Agarplatte bis zur Trocknung verteilt.

Die Agarplatten wurden 24 h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der ausgezählten Kolonien multipliziert mit dem Faktor 20 ergab die tatsächliche Keimzahl im Brutei.

Bei der Lebendzellzahlbestimmung ergaben sich Schwankungen der Keimzahlen zwischen 180 und 760 KBE/Ei.

Die Inkubation der Bruteier erfolgte bei 37,2°C im Brutschrank bis zu einem Alter von 17 Tagen. Die Eier wurden täglich durchleuchtet und abgestorbene Embryonen aussortiert.

Nach Abschluß des Pathogenitätstests wurden die überlebenden Embryonen durch Lagerung bei 4°C für 48 h abgetötet. Sowohl die abgestorbenen als auch die abgetöteten Embryonen wurden stichprobenartig bakteriologisch untersucht. Dabei wurden Tupferproben von der Körperoberfläche der Embryonen in Chromocult-Bouillon kultiviert.

Zur Beurteilung des Pathogenitätsgrades der Isolate wurde ein Index aus den absoluten Absterberaten und der Embryoletalität im Verlauf der 7 Beobachtungstage errechnet (WOOLEY et al., 2000). Dabei wurde an jedem Beobachtungstag die Anzahl der überlebenden Embryonen pro Isolat ermittelt. Anschließend wurde die Summe aus den Werten von 7 Tagen errechnet. Der resultierende Wert ergab den Index-Wert für die Pathogenität des Isolates (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Bewertung der Pathogenität

<b>Index</b>	<b>Absterberate nach 7 Tagen in %</b>	<b>Pathogenitätsgrad</b>
101 - 140	< 40	schwach pathogen
51 – 100	40 - 80	mittelgradig pathogen
0- 50	> 80	hochgradig pathogen

#### 3.1.2.2.4.2 Nachweis des Pathogenitätsgrades der Isolate an Versuchstieren

Der Pathogenitätstest im Versuchstier erfolgte mit zwei *E. faecalis*-Isolaten, die bereits zuvor im Brutei getestet worden waren. Zur Anwendung kamen Suspensionen der Isolate K923/96-1 und K808/97. Dabei wurde das Isolat K923/96-1 wegen seiner hohen Pathogenität im Brutei und das Isolat K808/97 wegen seiner geringgradigen Pathogenität im Brutei ausgewählt.

Zur Herstellung der Suspensionen wurde Koloniematerial viermal in PBS gewaschen, in PBS resuspendiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm auf eine Keimdichte von  $2 \times 10^{10}$  KBE/ml eingestellt. Damit enthielt jede Impfdosis von 0,5 ml eine Keimzahl von  $10^{10}$  KBE.

30 SPF-Küken im Alter von 6 Wochen wurden auf zwei Käfige verteilt, also pro Testkeim 15 Tiere in jeweils einem gemeinsamen Käfig. Eine weitere Gruppe von 15 Tieren im gleichen Alter diente als negative Kontrolle.

Nach einer ca. 10stündigen Akklimatisierungsphase der Tiere an die Umweltbedingungen wurden die Tiere mit  $10^{10}$  KBE pro Impfdosis i.v. infiziert. Dabei wurden die 15 Tiere der Gruppe 1 mit dem *E. faecalis*-Isolat K923/96-1 und die 15 Tiere der Gruppe 2 mit dem *E. faecalis*-Isolat K808/97 infiziert. Die 15 Tiere der Gruppe 3 dienten als Kontrollgruppe und erhielten eine i.v.-Injektion mit 0,5 ml sterilem PBS.

Von jedem Tier wurde das Gewicht bei Einnistung ermittelt und eine Blutprobe zur serologischen Untersuchung im selbsthergestellten *E. faecalis*-ELISA (siehe Abschnitt 3.2) genommen.

Am 21. Tag post injectionem wurden alle Tiere gewogen und von jedem Tier eine Blutprobe entnommen. Danach erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Genickbruch. Alle Versuchstiere wurden sezirt, wobei von allen Tieren der Gruppen 1 und 2 und von 5 Tieren der Gruppe 3 folgende Organproben (Herz, Milz, Leber und je ein Kniegelenk) entnommen und bakteriologisch untersucht wurden.

## **3.2 Teil 2 - Herstellung eines indirekten enzymgebundenen Immuno-adsorptionstests (ELISA) für serologische Untersuchungen**

### **3.2.1 Material**

#### **3.2.1.1 Seren**

##### **3.2.1.1.1 Positivkontrollseren**

Antiserum gegen den Stamm K923/96-1 wurde in Kaninchen und Hühnern hergestellt.

##### **3.2.1.1.2 Negativkontrollseren**

Negativserum wurde von *E. faecalis*-antikörperfreien Hühnern gewonnen, die bei Lohmann Tierzucht Cuxhaven unter SPF-Bedingungen gehalten wurden.

##### **3.2.1.1.3 Andere Seren zur Prüfung der Spezifität des ELISA**

Laboreigene monospezifische Hyperimmunseren gegen Geflügelkrankheitserreger:

#### aviäre Viren:

- Respiratory Enteric Orphan Virus (REO)
- FAV 1 (chicken embryo lethal orphan {CELO})- Virus
- Virus der Infektiösen Bronchitis (IB)
- Virus der Hühnerpocken
- Virus der Hämorrhagischen Enteritis (HE)
- Virus der Gumboro-Krankheit (IBD)
- aviäre Influenza (AI)

Laboreigene sowie kommerzielle Hyperimmunseren gegen Geflügelkrankheitserreger:

aviäre Bakterien:

- *Hämophilus gallinarum* (Coryza)
- *Pasteurella multocida* (Pm)
- *Mycoplasma meleagridis* (MM)
- *Mycoplasma synoviae* (MS)
- *Mycoplasma gallisepticum* (MG)
- *Salmonella enteritidis* (SE)
- *Escherischia coli* (*E. coli*)

**3.2.1.2 Medien, Puffer und Geräte für ELISA**

**Puffer und Gebrauchslösungen:**

**Carbonat-Bicarbonat-Coating-Puffer:**

Natriumbikarbonat	1.59 g/l
Natriumhydrogenkarbonat	2.93 g/l
NaN <sub>3</sub>	0.20 g/l

Die Reagentien in 1 Liter Aqua dest. lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, auf einen pH-Wert von 9,6 einstellen.

**Waschpuffer:**

Chekit®-ELISA-Waschpuffer (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz)

**Verdünnungspuffer:**

Chekit®-ELISA-Waschpuffer (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz), 1:10 verdünnt  
Magermilchpulver 1% (Uelzena, Uelzen, D)

### **Sonstige Reagentien:**

- Konjugat: Als Konjugat dient in Ziegen hergestelltes peroxidasemarkiertes Anti-Chicken-IgG (Goat Anti-Chicken IgG(H+L)-HRP, Southern Biotechnologies, Birmingham, USA) bzw.
- In Schafen hergestelltes Anti-Rabbit IgG (Sheep Anti-Rabbit IgG- POD, Roche Molecular Biochemicals)
- Substrat: Als Chromogen-Sustring wurde 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure)-ABTS mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chekit-Chromogen, Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz) verwendet.
- Stopplösung: Chekit-Stopplösung (Labor Dr. Bommeli AG, Bern, Schweiz).

### **Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien:**

- Micropipette Reference<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, D)
- Pipettboy (Integra Biosciences, Chur, Schweiz)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, D)
- 8-Kanal-Pipette (Eppendorf, Hamburg, D)
- Kühlschränke (4°C, -20°C, -80°C) (Liebherr, D)
- Vorverdünnungsröhrchen: Micronic Tubes (ICN Flow Labs, Meckenheim, D)
- Dynex MRX Photometer
- ELISA-Platten: 96-Well Polyvinylchlorid-Microplatten (ICN Flow Laboratories, Meckenheim, D)

## **3.2.2 Methoden**

### **3.2.2.1 Herstellung der Positivkontrollseren**

Die Herstellung der Positivkontrollseren im Kaninchen wurde in Abschnitt 3.1.2.2.2 (Herstellung der positiven Kontrollseren für die Agargelpräzipitation) beschrieben.

Für die Herstellung der positiven Kontrollseren in Hühnern wurden 3 Legehennen vom braunen Legetyp im Alter von 16 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in der Lohmann Tierzucht Cuxhaven unter SPF-Bedingungen gehalten. Von dem *E. faecalis*-Isolat K923/96-1 und einem weiteren *E. faecalis*-Isolat mit stark abweichenden biochemischen Eigenschaften

wurde eine bivalente Keimsuspension hergestellt, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm auf eine Keimdichte von  $10^{10}$  KBE/ml eingestellt wurde. Die Bivalenz der Suspension diente zum Ausschluß möglicher fehlender Kreuzreaktionen zwischen Kontrollserum und Antigenen. Jedes Tier erhielt je 1 ml Keimsuspension intravenös. Die Injektionen wurden dreimal in wöchentlichem Abstand mit der gleichen Suspension wiederholt. 2 Wochen nach der letzten Injektion wurden Serumproben entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.2 Herstellung der ELISA-Antigene

Die Herstellung der ELISA-Antigene und die Behandlung der Testplatten erfolgt in Anlehnung an die von HAFEZ und STING (1999) beschriebene Methode für den ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT).

Schafblutagarplatten wurden mit Koloniematerial des *E. faecalis*-Referenzstammes K923/96-1 beimpft und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 24 Stunden unter aeroben Verhältnissen inkubiert.

Die Kolonien wurden auf den Agarplatten in 6 ml PBS abgeschwemmt, mittels Pipette abgesaugt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation der Suspension bei 3000 U/min für 30 min. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 6 ml PBS resuspendiert und wiederum für 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 3 ml PBS resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde bei  $100^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 60 min erhitzt. Im Anschluß daran erfolgte eine Zentrifugation der Suspensionen 14000 U/min für 30 min in der Eppendorf-Zentrifuge. Der entstandene Überstand wurde als hitzestabiles Antigen verwendet. Die Kalibrierung der Antigene zur Feststellung der optimalen Verdünnung erfolgte im Schachbrettverfahren unter Verwendung von positiven und negativen Seren. Dabei werden positive und negative Seren abwechselnd auf die Testplatte pipettiert, so dass sich ein schachbrettartiges Muster ergibt.

### **3.2.2.3 Beschichtung der ELISA-Platten**

Entsprechend der Resultate aus den vorangegangenen Kalibrierungsversuchen wurden die Platten folgendermaßen beschichtet:

Die Verdünnung der Antigene erfolgte mit Coating-Puffer. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mit je 100 µl Antigen beschichtet und offen über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Platten wurden viermal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend bis zur Trocknung ausgeschleudert.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die ELISA-Platten bei 4°C gelagert, wobei bis zur ersten Nutzung wenigstens ein Tag Lagerung vergangen sein sollte.

### **3.2.2.4 Testdurchführung**

Die ELISA-Platten wurden auf Zimmertemperatur erwärmt. Die Serumproben sowie die positiven und negativen Kontrollseren wurden zunächst im Vorverdünnungsröhrchen 1:100 verdünnt. Dann wurden 80 µl Verdünnungspuffer in die Vertiefungen der Platte vorgelegt und schließlich 20 µl vorverdünntes Serum dazugegeben, so dass sich schließlich ein Verdünnungsverhältnis von 1:500 ergab.

Die Pipettierung erfolgte nach folgendem Schema:

- 100 µl negative Kontrolle in je 4 Vertiefungen
- 100 µl positive Kontrolle in je 4 Vertiefungen
- 100 µl Testserumprobe in je 2 Vertiefungen
- Zwei Vertiefungen pro Platte dienen als Blankkontrolle ohne Zusatz von Serum

Die Platten wurden zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 60 min inkubiert. Es erfolgte eine dreimalige Waschung mit Waschpuffer. Das konzentrierte Konjugat wurde im Verhältnis 1:3000 mit Verdünnungspuffer mit 1% Magermilchzusatz verdünnt. In jede Vertiefung wurden 100 µl der Konjugatverdünnung gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in der feuchten Kammer wurden die Platten

erneut dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von auf RT erwärmter Chromogen-Substratlösung. Die Platten wurden bei RT 20 min inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stopplösung pro Vertiefung gestoppt. Die photometrische Messung der Reaktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm, korrigiert bei 492 nm.

Aus den Nettoextinktionswerten der zwei Ansätze eines Testserums wurde der Mittelwert errechnet.

### **3.2.2.5 Interpretation der ELISA-Ergebnisse**

Für die Bewertung der Ergebnisse wurde zunächst der Mittelwert  $X_N$  und die Standardabweichung SD der negativen Kontrollen errechnet.

Um eine Serumprobe als positiv zu werten, mußte deren Wert gleich oder größer sein als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die dreifache Standardabweichung (positiv  $\geq X_N + 3xSD$ ).

Eine Serumprobe wurde als fraglich gewertet, wenn deren Wert gleich oder größer war als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die zweifache Standardabweichung (fraglich  $\geq X_N + 2xSD$ ) und kleiner als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die dreifache Standardabweichung (fraglich  $< X_N + 3xSD$ ).

Eine Serumprobe wurde als negativ gewertet, wenn deren Wert kleiner war als der Mittelwert der negativen Kontrollen plus die zweifache Standardabweichung (negativ  $< X_N + 2xSD$ ).

### **3.2.2.6 Korrektur der ELISA-Ergebnisse**

Um die Ergebnisse verschiedener ELISA-Platten vergleichen zu können, müssen die Variationen zwischen den Resultaten unterschiedlicher Platten und Testzeitpunkte korrigiert werden.

Der OD-Mittelwert des positiven Referenzserums ( $XK_{soll}$ ) wurde aus allen zu vergleichenden Platten ermittelt und diente als Basis für die Korrektur.

Aus den OD-Werten der Ansätze des positiven Referenzserums jeder einzelnen ELISA-Platte wurde der Mittelwert ( $XK_{ist}$ ) errechnet.

Wich der Wert  $XK_{ist}$  einer Platte vom Wert  $XK_{soll}$  ab, wurden die Einzelwerte der Testseren dieser Platte mit einem Korrekturfaktor multipliziert. Dieser Korrekturfaktor wurde folgendermaßen ermittelt:  $F = XK_{soll} / XK_{ist}$ .

### **3.2.2.7 Prüfung der Spezifität des ELISA**

Für die Prüfung der Spezifität des verwendeten ELISA wurden insgesamt 14 Hyperimmunhünerseren gegen folgende aviäre Erreger untersucht: Reo-, FAV 1 „CELO“- , IB- und IBD-Virus, aviäre Pocken, aviäre Influenza und den Erreger der Hämorrhagischen Enteritis sowie *Pasteurella multocida*, *Escherischia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, - *synoviae*, - *meleagridis*; *Coryza* und *Salmonella enteritidis*. Ebenso untersucht wurden ein vom Huhn gewonnenes positives Kontrollserum und ein Negativkontrollserum zum Vergleich.

Die Seren wurden der üblichen Testmethode unterworfen. Jedes Serum wurde im vierfachen Ansatz getestet und Mittelwert und Standardabweichung der OD ermittelt.

### **3.2.2.8 Reproduzierbarkeit**

#### **3.2.2.8.1 Innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenzen)**

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Platte wurden ein positives Serum, ein Serum im Grenzbereich zwischen positiver bzw. negativer Bewertung und ein negatives Serum in 16-fachem Ansatz auf verschiedenen Positionen einer Platte untersucht. Die Seren wurden nach der üblichen Testmethode untersucht.

### **3.2.2.8.2 Zwischen verschiedenen Platten (Interassay-Differenzen)**

Um festzustellen, ob die Ergebnisse durch Testansätze auf verschiedenen Platten bzw. an verschiedenen Tagen beeinflusst werden, wurde der ELISA-Test an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Als Testseren wurden zwei positive Hühnerkontrollseren, zwei negative Hühnerkontrollseren und zwei Hühnerkontrollseren im Grenzbereich zwischen positiver bzw. negativer Bewertung sowie ein positives Kaninchenserum und ein negatives Kaninchenserum verwendet. Für alle Testdurchführungen wurde Hühner- bzw. Kaninchenkonjugat, Substrat und Stopplösung derselben Charge verwendet.

Jedes Serum wurde mit dem üblichen Verfahren im 12-fachen Ansatz getestet. Aus den OD-Werten des 12-fach-Ansatzes eines Serums auf einer Platte an einem Testtag wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

### **3.2.2.9 Test der Lagerfähigkeit der ELISA-Platten**

Um die Beeinflussung der Aktivität der selbsthergestellten ELISA-Platten durch Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur zu prüfen, wurden je 9 Platten bei +4°C, -20°C und -70°C im Kühlschrank bzw. in der Gefriertruhe gelagert.

Im Verlauf der ersten sechs Wochen wurden die Platten im wöchentlichen Abstand getestet, also in Woche 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Im Anschluß daran erfolgten Tests im Abstand von 4 Wochen, also in Woche 10, 14 und 18.

Zum Testen der Platten wurden jeweils zwei stark positive Hühnerkontrollseren, zwei mittelgradig positive Hühnerkontrollseren, ein Hühnerserum im Grenzbereich zwischen positiver bzw. negativer Bewertung und ein negatives Hühnerkontrollserum verwendet. Jedes Serum wurde im 10-fach-Ansatz getestet.

Für alle Testdurchführungen wurde Antichicken-Konjugat, Substrat und Stopplösung derselben Charge verwendet.

### **3.3 Teil 3 - Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen *Enterococcus faecalis* in Geflügelbeständen**

#### **3.3.1 Material**

##### **3.3.1.1 Seren für Verlaufsuntersuchungen bei Legehennen unter Praxisbedingungen**

Insgesamt wurden 830 Serumproben von Legehennen aus zwei verschiedenen Herden aus den Jahren 1998 und 1999 untersucht. Die Tiere waren zu Beginn der Probennahme 12 bzw. 13 Wochen alt, die Proben wurden etwa in wöchentlichem Abstand gewonnen. Die Probennahme endete mit der 58. bzw. 61. Lebenswoche. Die Anzahl der Proben pro Woche ist in Tab. 24a aufgelistet.

##### **3.3.1.2 Serumproben für diagnostische Untersuchungen**

Von November 1999 bis Juni 2000 wurden im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht Cuxhaven zur diagnostischen Untersuchung auf Antikörper gegen *E. faecalis* insgesamt 1804 eingesendete Serumproben untersucht. Sie stammten alle von verschiedenen Legehennenherden aus Niedersachsen. Es handelte sich sowohl um weiße als auch um braune Legehennen. Pro Herde standen 4 bis 100 Proben, im Durchschnitt 24 Proben zur Verfügung. Keines der untersuchten Tiere zeigte Anzeichen der amyloiden Arthropathie.

##### **3.3.1.3 Testplatten**

Zur Untersuchung der Serumproben wurden Testplatten des selbsthergestellten indirekten ELISA verwendet. Alle Testplatten stammten aus einer Charge.

### **3.3.2 Methoden**

Der indirekte ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. faecalis* wurde nach der in Teil 2 (3.2.2.3 bis 3.2.2.5) beschriebenen Methode durchgeführt und ausgewertet.

Herden wurden als positiv bewertet, sobald eine Probe mit positivem Ergebnis getestet wurde. In als negativ bewerteten Herden waren alle Proben negativ getestet worden. Bei Herden mit Proben im fraglichen Bereich und ohne positiv getestete Proben wurden diese Herden als fraglich bewertet.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS für Windows in der Version 7.5. Die Tests wurden mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  durchgeführt.