

4	Ergebnisse
4.1	Ergebnisse zu Teil 1
4.1.1	Charakterisierung
4.1.1.1	Stoffwechselfparameter
4.1.1.1.1	Biochemische Eigenschaften

Es wurden 58 *E. faecalis*-Isolate mit dem Testsystem api 20 Strep nach ihren biochemischen Eigenschaften analysiert. Das Testprofil jeden Isolates wurde mit dem typischen durchschnittlichen Profil von *E. faecalis* (nach Herstellerangaben) verglichen.

Typisches Testprofil von *E. faecalis* (durchschnittlicher Anteil der positiven Reaktionen von *E. faecalis*-Isolaten im Test in %) bei api 20 Strep:

Voges Proskauer (VP)	99	Ribose (RIB)	98
Hippurat (HIP)	46	Arabinose (ARA)	0
Äskulin (ESC)	99	Mannit (MAN)	98
Pyrrolidonylarylamidase (PYRA)	97	Sorbit (SOR)	92
α -Galactosidase (α GAL)	0	Laktose (LAC)	94
β -Glucuronidase (β GUR)	0	Trehalose (TRE)	100
β -Galactosidase (β GAL)	20	Inulin (INU)	0
alkalische Phosphatase (PAL)	4	Raffinose (RAF)	0
Leucinarylamidase (LAP)	99	Stärke (AMD)	96
Arginindihydrolase (ADH)	97	Glykogen (GLYG)	2
Hämolyse (HEM)	0		

Insgesamt konnten 11 Typen mit unterschiedlichen Testprofilen ermittelt werden. Dabei stellt das Testprofil der Gruppe 2 (n=39) mit der Abweichung einer negativen LAP-Reaktion die größte Gruppe dar. Die nächstgrößere Gruppe ist Gruppe 1 (n=4), die keinerlei Abweichung vom typischen Testprofil zeigen. Mit jeweils 3 zugehörigen Isolaten folgen die Gruppen 9, 10 und 11. Die restlichen 6 untersuchten Isolate weisen Testprofile auf, die von allen anderen abweichen.

Die Berechnung der Übereinstimmungen mit dem typischen Profil in Prozent erfolgte nach dem Vergleich der Ergebnisse mit einer Prozenttabelle des Herstellers des apiStrep-Tests.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 10 zusammengefasst. Die ausführliche Darstellung ist in Anhang 10.1 zu sehen.

Tab. 10: Übersicht über die Testprofile von 58 *E. faecalis*-Isolaten anhand der biochemischen Eigenschaften in Vergleich mit dem typischen Testprofil von *E. faecalis* nach dem Testsystem apiStrep 20

Übereinstimmung mit dem typ. Profil in % ⁽¹⁾	Anzahl Isolate	Gruppe	Abweichung vom typ. Profil
99,9	4	1	keine
99,7	39	2	LAP negativ
99,0	1	3	PYRA negativ
98,4	1	4	LAP, AMD negativ
98,3	1	5	LAP, LAC negativ
97,9	1	6	LAP, LAC negativ, HEM positiv
97,4	1	7	LAP negativ, GLYG positiv
97,2	1	8	βGAL positiv
94,3	3	9	PYRA, LAP negativ
62,5	3	10	LAP, VP negativ
56,4	3	11	LAP negativ, RAF positiv

⁽¹⁾ Berechnung der prozentualen Übereinstimmung nach Herstellerangaben

4.1.1.1.2 Resistenztest

Es wurden von 29 der 58 Isolate Antibiogramme mit dem Micronaut-System erstellt. Die Grenzwerte für die Beurteilung der Empfindlichkeit von Enterokokken im Resistenztest sind in Tab. 11 dargestellt. Die Ergebnisse der Resistenzbestimmung sind in Tab. 12 dargestellt. Dabei waren die meisten Isolate gegen Sulfonamide (27), Tetracyclin (26), Trimethoprim (24) und Colistin (26) resistent. Hohe Empfindlichkeit lag vor allem bei Penicillin, Amoxicillin, Rifampicin, Tylosin und Kanamycin vor. Aufgrund der in der NCCLS (2001) angegebenen sehr hohen MHK für Streptomycin ist bei dem durchgeführten Test die Resistenz gegen Streptomycin unklar, da die Testkonzentration bei 512 µg /ml endet.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung auf Resistenzen gegen Vancomycin erwiesen sich alle 58 Isolate als empfindlich gegen das Antibiotikum.

Tab. 11: Grenzwerte für die Beurteilung der Empfindlichkeit von bakteriellen Erreger (außer Mykobakterien)¹ bzw. Enterokokken² gegen verschiedene Antibiotika (MHK in µg /ml)

Wirkstoff	Grenzwert		
	resistent	intermediär	empfindlich
Erythromycin ²	≥ 8	2-4	≤ 0,5
Neomycin ³	16	2 - 8	1
Gentamycin ¹	> 4	1 - 4	< 1
Penicillin G ²	≥ 16	-	≤ 8
Streptomycin ²	> 1000	500 - 1000	< 500
Sulfonamide ³	512	-	256
Tetracyclin ²	≥ 16	8	≤ 4
Amoxicillin ²	≥ 16	-	≤ 8
Trimethoprim ³	16	-	8
Ampicillin ²	≥ 16	-	≤ 8
Enrofloxacin ³	> 0,5	0,5 – 0,25	< 0,25
Colistin ¹	> 2	0,5 - 2	< 0,5
Lincomycin ¹	> 4	1 - 4	< 1
Rifampicin ²	≥ 4	2	≤ 1
Tylosin ³	>1	0,5 – 0,25	0,125
Kanamycin ³	16	2 - 8	1
Ceftiofur ³	8	4	2

¹ – Quelle: DIN 58940-4, Jan 00

² – Quelle: NCCLS, Vol. 21, Nr. 1, Jan 01

³ – Quelle: Angaben des Herstellers

Ergebnisse

Tab. 12: Übersicht über die Ergebnisse der Resistenzbestimmung mittels Mikrodilutionstest von 29 *E. faecalis*-Isolaten

Wirkstoff	n Isolate	sensibel	intermediär	resistent
Erythromycin	29	3	14	12
Neomycin	28	0	13	15
Gentamycin	29	3	15	11
Penicillin G	28	25	-	3
Streptomycin	28	3	0	25
Sulfonamid	28	1	-	27
Tetracyclin	29	3	0	26
Amoxicillin	28	23	-	5
Trimethoprim	28	4	-	24
Ampicillin	29	27	-	2
Enrofloxacin	29	18	3	8
Colistin	28	0	2	26
Lincomycin	28	0	18	10
Rifampicin	28	28	0	0
Tylosin	28	3	22	3
Kanamycin	28	12	16	0
Ceftiofur	29	27	0	2

4.1.1.2 Agargelpräzipitation

Es wurde von insgesamt 58 *E. faecalis*-Isolaten hitzestabiles Antigen gewonnen und in der AGP unter Verwendung von 3 Antiseren gegen die *E. faecalis*-Isolate K923/96-1, Nr. 3 und Nr. 30 serotypisiert (Auswahlkriterien siehe 3.1.2.2.2).

Dabei reagierten 6 Isolate mit keinem der drei Seren, 19 Isolate zeigten monospezifische Reaktionen mit jeweils einem der Seren. 17 Isolate reagierten mit 2 Seren, 16 Isolate reagierten mit jedem der Seren. Die Ergebnisse der Serotypisierung sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Mit dem Antiserum gegen K923/96-1 reagierten insgesamt 36 Isolate (einschließlich K923/96-1) positiv. Bei 22 Isolaten (einschließlich Nr. 3 und Nr.30) erfolgte keine Reaktion.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass 33 von 58 Isolaten mit mehreren Seren kreuzreagieren. Dies entspricht einem Anteil von 57% an den getesteten Isolaten.

Tab. 13: Ergebnisse der Serotypisierung von 58 *E. faecalis*-Isolaten mittels Agargelpräzipitation nach 24 h

Reaktionen	Anzahl der positiv reagierenden Isolate
keine	6
monospezifisch	19
mit 2 Seren	17
mit 3 Seren	16

Eine Tabelle mit den Reaktionen jedes einzelnen Isolates ist in Anhang 10.2 dargestellt. Ein Teil der Testdurchläufe wurden mehrfach wiederholt. Dabei ergaben sich in jedem Fall die gleichen Ergebnisse.

4.1.1.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Es wurden die Restriktionsmuster des Referenzstammes K923/96-1 und von weiteren 57 *E. faecalis*-Isolaten erstellt. Von TENOVER et al. (1995) wurden Kriterien zur Interpretation

Ergebnisse

von Restriktionsmustern bei der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen festgestellt. Die Muster aller untersuchten Isolate wurden anhand der Ähnlichkeit ihrer Restriktionsmuster auf ihre Übereinstimmung mit dem Muster des Referenzstammes K923/96-1 untersucht. Zur Anwendung kam das Computerprogramm Bio1D®.

37 Isolate zeigten eine Übereinstimmung mit dem Referenzstamm von über 90%, 6 Isolate stimmten zu 81 bis 90% mit dem Referenzmuster überein, und bei 14 Isolaten lag die Übereinstimmung bei 80% oder darunter. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tab. 14: Grad der Übereinstimmung der Restriktionsmuster von 57 *E. faecalis*-Isolaten mit dem Muster von K923/96-1

n Isolate	Übereinstimmung mit dem Muster des Referenzstamm K923/96-1
37	91 – 100 %
6	81 – 90 %
14	80 % und weniger

Der Grad der Übereinstimmung jedes einzelnen Isolates mit dem Referenzstamm ist in Anhang 10.3a dargestellt. In Anhang 10.4 finden sich Fotografien der Elektrophorese-Gele mit den Restriktionsmustern der verschiedenen *E. faecalis*-Isolate und Dendrogramme für die Darstellung der Verwandtschaftsgrade der *E. faecalis*-Isolate untereinander.

Entsprechend ihrer genetischen Ähnlichkeit wurden die Isolate in Gruppen und Subgruppen eingeteilt. Die Gruppierung erfolgte nach der auftretenden Häufigkeit bestimmter Muster. Die größte Gruppe identischer oder sehr ähnlicher Restriktionsmuster wurde als Gruppe A bezeichnet, die beiden kleineren Gruppen als Gruppe B und Gruppe C. Zwischen den Gruppen gab es nur sehr wenige Ähnlichkeiten. Die Gruppierung ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tab. 15: Gruppierung der Isolate entsprechend ihrer genetischen Ähnlichkeit

Gruppe	A						B		C	sonstige
n Isolate	37						3		3	15
Subgruppe	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2		
n Isolate	19	3	1	3	10	1	2	1		

Die genetische Ähnlichkeit innerhalb von Gruppe A lag bei 92 %, innerhalb von Gruppe B bei 96 % und in Gruppe C bei 100%. 15 Isolate wiesen Restriktionsmuster auf, die stark von den Gruppen A, B und C abwichen und sich auch untereinander nicht gruppieren ließen.

Gruppe A ließ sich in 6 Untergruppen unterteilen, deren Restriktionsmuster jeweils um 1 bzw. 2 Banden variierte. Innerhalb der Untergruppen waren die Restriktionsmuster identisch. Bei Gruppe B lag die Abweichung zwischen Untergruppe B1 und B2 bei einer Bande. In Gruppe C wiesen alle 3 Isolate das gleiche Restriktionsmuster auf. In Anhang 10.3b ist die Zuordnung der einzelnen Isolate zu den Gruppen und Subgruppen aufgelistet.

4.1.1.4 Ergebnisse der Bestimmung des Pathogenitätsgrades der Isolate

4.1.1.4.1 Ergebnisse der Pathogenitätstests im Brutei

Zur Beurteilung des Pathogenitätsgrades der Isolate wurde ein Index aus den absoluten Absterberaten der Embryonen im Verlauf der 7 Beobachtungstage errechnet (WOOLEY et al., 2000).

Insgesamt wurden 26 Isolate und der Referenzstamm K923/96-1 auf ihre Pathogenität im Brutei überprüft. Es wurden 16 *E. faecalis*-Isolate untersucht, deren Restriktionsmuster zu 96 bis 100% mit dem Muster des Referenzstammes K923/96-1 übereinstimmt, und 10 *E. faecalis*-Isolate, deren Restriktionsmuster zu 64 bis 85% mit dem Muster des Referenzstammes K923/96-1 übereinstimmt sowie der Referenzstamm K923/96-1 selbst.

Bei der Untersuchung von 27 *E. faecalis*-Isolaten lagen die Absterberaten innerhalb von 7 Tagen zwischen 5 und 100%. Daraus ergaben sich Index-Werte zwischen 21 und 136. Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten pro Brutei lag zwischen 180 und 760. Bei stichprobenartigen bakteriologischen Untersuchungen konnten in jedem untersuchten Brutei Enterokokken nachgewiesen werden.

Bei den mitgeführten Negativkontrollgruppen lagen die Absterberaten bei 0%, bei stichprobenartigen bakteriologischen Untersuchungen konnten weder Enterokokken noch Fremdkeime aus den Bruteiern isoliert werden.

Bei den 16 Isolaten, deren PFGE-Muster mit dem Muster von K923/96-1 hochgradig übereinstimmte, lagen die Absterberaten zwischen 90 und 100%, die daraus resultierenden Index-Werte zwischen 21 und 74, der Mittelwert der Indexwerte lag bei 34,6. Damit weisen 15 der 16 Isolate eine hohe Pathogenität für Hühnerembryonen auf, ein Isolat zeigt eine mittelgradige Pathogenität.

Bei den 10 geringgradig übereinstimmenden Isolaten lagen die Absterberaten zwischen 5 und 100%, die daraus resultierenden Index-Werte zwischen 32 und 136, der Mittelwert der Indexwerte lag bei 85,8. Entsprechend diesen Werten weisen 2 Isolate eine hohe Pathogenität für Hühnerembryonen auf, bei 4 Isolaten ist die Pathogenität mittelgradig ausgeprägt, 4 Isolate zeigen eine geringgradige Pathogenität für Hühnerembryonen.

Mit den Isolaten K923/96-1 und K808/97 wurde die Wiederholbarkeit des Testes geprüft. Die Absterberaten von K923/96-1 lagen zwischen 90 und 100%, die Index-Werte schwankten zwischen 28 und 35, Mittelwert 31,8. Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten bewegte sich zwischen 280 und 520.

Das Isolat K808/97 weist mit dem Restriktionsmuster von K923/96-1 eine Übereinstimmung von 64% auf. Die Absterberaten von K808/97 lagen zwischen 5 und 30%, die Index-Werte schwankten zwischen 108 und 134, Mittelwert 118,2. Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten bewegte sich zwischen 190 und 620.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Pathogenitätstests im Brutei zusammengefasst, Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Wiederholbarkeit des Tests.

Ergebnisse

Tab. 16: Ergebnisse der Pathogenitätstests von 27 *E. faecalis*-Isolaten

Isolat-Nr.	PFGE-Gruppe	Übereinstimmung der PFGE-Muster mit K923/96-1	Pathogenitätsgrad	Absterberate nach 7 Tagen*	Absterberate nach 7 Tagen in %	Index (0-140)	KBE/Ei
K923/96-1	A		+++	20/20	100	32	740
29	A	100 %	+++	20/20	100	21	250
42	A	100 %	+++	20/20	100	23	390
56	A	100 %	+++	20/20	100	24	340
52	A	100 %	+++	20/20	100	25	280
22	A	100 %	+++	20/20	100	27	380
40	A	100 %	+++	20/20	100	29	200
51	A	100 %	+++	20/20	100	32	220
17	A	100 %	+++	20/20	100	34	500
38	A	100 %	+++	20/20	100	36	410
19	A	100 %	+++	19/20	95	23	550
49	A	100 %	+++	19/20	95	36	320
11	A	100 %	+++	19/20	95	37	320
16	A	100 %	+++	18/20	90	47	550
50	A	100 %	++	18/20	90	74	190
18	A	96 %	+++	18/20	90	50	530
26	A	96 %	+++	20/20	100	36	240
45	k.G	85 %	+	1/20	5	136	660
15	k.G	82 %	+++	17/20	85	44	660
14	k.G	80 %	+	1/20	5	133	180
5	k.G	74 %	++	17/20	85	62	320
8	k.G	72 %	++	15/20	75	55	320
25	k.G	70 %	++	8/20	40	98	680
13	B	69 %	+	7/20	35	101	750
K808/97	k.G	64 %	+	4/20	20	118	540
12	B	64 %	++	12/20	60	79	760
23	k.G	64 %	+++	20/20	100	32	530
Kontrollgruppe			-	0/10	0	140	0

+++ = stark pathogen (entspricht Index-Wert 0 - 50), Berechnung siehe 3.1.2.2.4.1,

WOOLEY et al., 2000

++ = mäßig pathogen (entspricht Index-Wert 51 - 100)

+ = schwach pathogen (entspricht Index-Wert 101 - 140)

* = Anteil der abgestorbenen Embryonen

k.G. = keine Gruppenzuordnung

Ergebnisse

Tab. 17: Wiederholbarkeit der Ergebnisse des Pathogenitätstests im Brutei

Isolat	Pathogenitätsgrad	Absterberate nach 7 Tagen*	Absterberate nach 7 Tagen in %	Index (0-140)	KBE/ Ei
K923/96-1	+++	20/20	100	28	280
"	+++	19/20	95	29	420
"	+++	20/20	100	32	330
"	+++	20/20	100	32	500
"	+++	19/20	95	33	520
"	+++	18/20	90	34	320
"	+++	19/20	95	35	340
K808/97	+	6/20	30	108	550
"	+	5/20	25	113	310
"	+	4/20	20	114	230
"	+	4/20	20	117	620
"	+	4/20	20	123	190
"	+	1/20	5	134	350

+++ = stark pathogen (entspricht Index-Wert 0 - 50), Berechnung siehe 3.1.2.2.4.1,

WOOLEY et al., 2000

++ = mäßig pathogen (entspricht Index-Wert 51 - 100)

+ = schwach pathogen (entspricht Index-Wert 101 - 140)

* = Anteil der abgestorbenen Embryonen

4.1.1.4.2 Ergebnisse der Pathogenitätstests im Versuchstier

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse des Pathogenitätstest im Brutei auf das lebende Tier zu prüfen, wurde je 15 Tiere mit einem im Brutei stark pathogenen bzw. wenig pathogenen *E. faecalis*-Isolat infiziert.

Als Reaktion auf die Infektion zeigten 10 der 15 Tiere der Gruppe 1 (Infektion mit K923/96-1) nach Ablauf der 21 Tage ein deutlich geringeres Körpergewicht gegenüber den Tieren der Gruppen 2 (Infektion mit K808/97) und 3 (Negativkontrolle). Von diesen 10 Tieren wiesen 8 jeweils ein geschwollenes Metatarsalgelenk auf, bei 2 Tieren waren beide Metatarsalgelenke geschwollen. In der Sektion imponierten die geschwollenen Gelenke als purulente Arthritis. Alle anderen Tiere zeigten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Keines der Tiere war während des Versuchs verendet. Futter- und Wasseraufnahme waren ungestört.

Die Gewichte der Tiere zu Beginn des Versuchs und 21 Tage p.i. sind in Tabelle 18 gegenübergestellt.

Ergebnisse

Vor Beginn der Infektion wiesen alle Gruppen ein vergleichbares Körpergewicht auf, welches zwischen 464 g und 472 g lag. Nach 3 Wochen wurde bei 10 Tieren der Gruppe 1 ein signifikant geringeres Gewicht als bei den Tieren der Gruppen 2 und 3 festgestellt. Jedoch wiesen 5 Tiere der Gruppe 1 Gewichte auf, die denen der Kontrollgruppe entsprachen (Tab.18).

Tab. 18: Gewichtsentwicklung von 6 Wochen alten SPF-Küken im Verlauf von 21 Tagen nach einer i.v.-Infektion mit *E. faecalis*-Isolaten

Gruppe 1 (K923/96-1)				Gruppe 2 (K808/97)				Gruppe 3 (PBS)			
Tiergewichte in g				Tiergewichte in g				Tiergewichte in g			
Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.	Gewichtszunahme	Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.	Gewichtszunahme	Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.	Gewichtszunahme
1731	467	450	-17	1746	383	791	408	1761	468	789	321
1732	485	531	46	1747	490	895	405	1762	463	852	389
1733	483	447	-36	1748	478	851	373	1763	496	823	327
1734	357	653	296	1749	481	913	432	1764	432	788	356
1735	476	524	48	1750	549	880	331	1765	462	808	346
1736	432	507	75	1751	516	914	398	1766	382	825	443
1737	470	460	-10	1752	490	911	421	1767	544	988	444
1738	473	830	357	1753	497	846	349	1768	477	814	337
1739	378	401	23	1754	472	840	368	1769	524	952	428
1740	533	555	22	1755	425	836	411	1770	589	982	393
1741	518	806	288	1756	520	848	328	1771	370	738	368
1742	466	846	380	1757	459	863	404	1772	433	783	350
1743	528	564	36	1758	457	829	372	1773	556	948	392
1744	401	718	317	1759	371	739	365	1774	368	752	384
1745	500	834	334	1760	478	847	369	1775	518	881	363
X	464	608	144	X	471	853	382	X	472	848	376
SD	52,08	158,99	159,85	SD	48,04	47,25	31,9	SD	67,61	82,81	39,42

Die serologische Untersuchung der Serumproben zum Zeitpunkt der Einstallung zeigte, dass bei allen Tieren keine Antikörper gegen *E. faecalis* nachweisbar waren.

Die Untersuchung der Serumproben 21 Tage p.i. ergab einen deutlichen Anstieg von Antikörpern im Serum bei den Tieren der Gruppe 1, die gleichzeitig ein wesentlich geringeres Gewicht als alle anderen Versuchstiere aufwiesen. Die fünf normalgewichtigen Tiere der Gruppe 1 sowie die Tiere der Gruppen 2 und 3 zeigten nur geringgradige Veränderungen der OD-Werte gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Einstallung.

Die Mittelwerte der korrigierten OD der im ELISA-Test untersuchten Seren sind in Tabelle 19 dargestellt.

Ergebnisse

Tab. 19: Nachweis von Antikörpern gegen *E. faecalis* im ELISA-Test nach einer i.v.-Infektion von 6 Wochen alten SPF-Küken

Gruppe 1 (K923/96-1)			Gruppe 2 (K808/97)			Gruppe 3 (PBS)		
	OD			OD			OD	
Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.	Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.	Tier-Nr.	prae-inj.	3 Wo p.i.
1731	0,097	1,518	1746	0,095	0,128	1761	0,165	0,146
1732	0,097	1,191	1747	0,094	0,141	1762	0,109	0,144
1733	0,097	0,677	1748	0,096	0,160	1763	0,095	0,126
1734	0,095	0,429	1749	0,109	0,281	1764	0,095	0,095
1735	0,099	1,174	1750	0,107	0,260	1765	0,102	0,097
1736	0,113	0,619	1751	0,109	0,097	1766	0,105	0,099
1737	0,106	0,997	1752	0,100	0,126	1767	0,103	0,260
1738	0,109	0,123	1753	0,091	0,113	1768	0,096	0,125
1739	0,100	0,819	1754	0,092	0,147	1769	0,104	0,221
1740	0,094	0,870	1755	0,096	0,132	1770	0,101	0,124
1741	0,103	0,210	1756	0,139	0,157	1771	0,096	0,138
1742	0,100	0,136	1757	0,098	0,307	1772	0,115	0,162
1743	0,106	0,928	1758	0,115	0,150	1773	0,094	0,121
1744	0,092	0,115	1759	0,094	0,121	1774	0,109	0,145
1745	0,102	0,191	1760	0,107	0,116	1775	0,101	0,154
X	0,101	0,667	X	0,103	0,162	X	0,106	0,144
SD	0,006	0,453	SD	0,013	0,065	SD	0,017	0,045

Bei den Organproben der Gruppe 1 (Infektion mit K923/96-1) konnte unter Verwendung von Schafblutagar als Medium je einmal *E. faecalis* aus Herz, Milz und Leber und 7mal aus den Gelenken reisoliert werden. Bei Verwendung von Chromocult-Bouillon als Medium fanden sich in den Herzproben der Gruppe 1 keine Keime, in den Milzproben 4 Reisolat, in den Leberproben 2 und in den Gelenken 10 *E. faecalis*-Reisolat. Dabei stammten alle Reisolat - mit Ausnahme des Reisolates aus der Leber, dass auf Schafblutagar isoliert wurde – von den klinisch erkrankten Tieren.

Bei den Organproben der Tiere aus Gruppe 2 konnten unter Verwendung von Schafblutagar als Medium keine Keime reisoliert werden. Im Chromocult-Bouillon-Ansatz fand sich ein Reisolat in den Herzproben und 6 Reisolat in den Gelenken.

Aus den Organproben von 5 stichprobenartig ausgewählten Tieren der Gruppe 3 konnten keine Keime reisoliert werden.

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung der Organproben zusammengefaßt.

Ergebnisse

Tab. 20: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Organproben

Tier-Nr.	Gruppe	n Proben	Anzahl der <i>E. faecalis</i> -Reisolate									
			Chromocult-Bouillon					Schafblutagar				
			Herz	Milz	Leber	Gelenk	gesamt	Herz	Milz	Leber	Gelenk	gesamt
1731 – 1745	Gruppe 1 (K923/96-1)	10 (klinisch krank)	0	4	2	10	17	1	1	0	7	9
		5 (klinisch gesund)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1746 – 1760	Gruppe 2 (K808/97)	15	1	0	0	6	7	0	0	0	0	0
1761 - 1775	Gruppe 3 (PBS)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

n Proben = Anzahl der Proben pro Organ und Reisolationsmethode

4.1.2 Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Charakterisierungsmethoden

Es wurden 58 *E. faecalis*-Isolate mit verschiedenen Methoden charakterisiert. Dabei kamen der api 20 Strep-Test zur Analyse der Stoffwechselfparameter, die Agargelpräzipitation zur Serotypisierung und die Pulsfeld-Gelelektrophorese für die Darstellung der DNS-Muster zum Einsatz. Darüber hinaus wurden 28 der Isolate im Brutei und 2 der Isolate im Versuchstier auf ihre Pathogenität untersucht.

Die Ergebnisse der angewandten Methoden wurden in Tabelle 21 vergleichend gegenübergestellt.

Zwischen den Gruppierungen, die sich aus den Stoffwechselfparametern, der Serotypisierung und den Restriktionsmustern ergeben, kann keine Korrelation festgestellt werden.

Von 16 Isolaten, deren Restriktionsmuster zu 97 bis 100% mit dem des Referenzstammes K923/96-1 übereinstimmt, waren 15 Isolate hochgradig pathogen für Hühnerembryonen, ein Isolat zeigte eine mittelgradige Pathogenität. Die Isolate mit Restriktionsmustern niedriger Übereinstimmung weisen Pathogenitätsgrade aller Stufen auf.

Der Grad der Pathogenität ist bei den Isolaten K923/96-1 und K808/97 im Brutei und im Versuchstier gleich.

Ergebnisse

Tab. 21: Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden

Isolat-Nr.	Übereinstimmung in % *	AGP-Serotyp	Biochemie-Typ	Pathogenitätstest	
		Reaktionen	Gruppe	im Brutei	im Versuchstier
K923/96-1	100	mit 2 Seren	2	hoch	hoch
29	100	mit 2 Seren	2	hoch	n.u.
56	100	mit 3 Seren	3	hoch	n.u.
38	100	monospezifisch	2	hoch	n.u.
16	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
17	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
19	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
1	100	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
11	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
22	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
49	100	monospezifisch	2	hoch	n.u.
50	100	monospezifisch	2	mittel	n.u.
51	100	monospezifisch	2	hoch	n.u.
52	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
40	100	mit 2 Seren	4	hoch	n.u.
42	100	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
4	100	monospezifisch	1	n.u.	n.u.
20	100	monospezifisch	1	n.u.	n.u.
32	100	mit 2 Seren	9	n.u.	n.u.
36	96	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
33	96	mit 2 Seren	10	n.u.	n.u.
28	96	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
54	96	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
55	96	mit 3 Seren	2	n.u.	n.u.
26	96	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
53	93	mit 3 Seren	7	n.u.	n.u.
7	92	mit 3 Seren	1	n.u.	n.u.
9	92	mit 3 Seren	1	n.u.	n.u.
37	92	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
27	92	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
6	92	mit 3 Seren	11	n.u.	n.u.
10	92	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
18	96	mit 3 Seren	2	hoch	n.u.
35	92	mit 3 Seren	2	n.u.	n.u.
43	92	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
46	92	mit 3 Seren	2	n.u.	n.u.
47	92	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
30	85	keine	5	n.u.	n.u.
45	85	keine	2	niedrig	n.u.
39	83	monospezifisch	2	n.u.	n.u.

Forts. Tab. 21: Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden →

Ergebnisse

Forts. Tab. 21: Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden

Isolat-Nr.	Übereinstimmung in %	AGP-Serotyp	Biochemie-Typ	Pathogenitätstest	
		Reaktionen	Gruppe	im Brutei	im Versuchstier
44	83	keine	6	n.u.	n.u.
34	83	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
15	82	monospezifisch	2	hoch	n.u.
14	80	keine	2	niedrig	n.u.
24	80	mit 2 Seren	8	n.u.	n.u.
58	76	keine	10	n.u.	n.u.
3	75	mit 2 Seren	2	n.u.	n.u.
21	74	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
5	74	mit 2 Seren	2	mittel	n.u.
8	72	monospezifisch	2	mittel	n.u.
25	70	keine	2	mittel	n.u.
2	70	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
48	70	keine	2	n.u.	n.u.
13	69	mit 2 Seren	11	niedrig	n.u.
41	64	monospezifisch	2	n.u.	n.u.
K808/97	64	mit 2 Seren	2	niedrig	niedrig
12	64	mit 2 Seren	9	mittel	n.u.
23	64	mit 2 Seren	10	hoch	n.u.

* Übereinstimmung der Restriktionsmuster mit dem Muster des Referenzstammes K923/96-1

n.u. = nicht untersucht

Die markierten Isolate wurden für die Herstellung positiver Kontrollseren für die AGP verwendet.

4.2 Ergebnisse zu Teil 2

4.2.1 Prüfung der Spezifität des selbsthergestellten indirekten ELISA

Für die Prüfung der Spezifität des verwendeten indirekten ELISA wurden insgesamt 14 Hyperimmunhünerseren gegen verschiedene aviäre Erreger untersucht. Ebenso untersucht wurden ein vom Huhn gewonnenes positives Kontrollserum und ein Negativkontrollserum. Jedes Serum wurde im vierfachen Ansatz getestet.

Mit Ausnahme des positiven Kontrollserums wies keines der getesteten Seren eine positive ELISA-Reaktion auf (Tab. 22).

Tab. 22: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung des selbsthergestellten ELISA mit dem K923/96-1-Isolat

Testseren	(X) OD	SD
Negativkontrollserum	0,170	0,053
Positivkontrollserum	1,688	0,120
FAV 1	0,136	0,008
IBD	0,167	0,004
HE	0,184	0,027
aviäre Influenza	0,160	0,008
Hühner-Pocken-Virus	0,140	0,023
IB (Infektiöse Bronchitis)	0,180	0,007
Reovirus	0,206	0,006
Hämophilus gallinarum	0,151	0,040
Mycoplasma meleagridis	0,173	0,014
Mycoplasma synoviae	0,139	0,002
Mycoplasma gallisepticum	0,129	0,049
Pasteurella multocida	0,151	0,007
Escherischia coli	0,091	0,005
Salmonella enteritidis	0,128	0,022

(X) = Mittelwert aus 4 Ansätzen

SD = Standardabweichung

3.2.2 Reproduzierbarkeit

4.2.2.1 Innerhalb einer Platte (Intraassay-Differenzen)

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Platte wurden ein positives Serum (Serum 1), ein Serum im Grenzbereich (Serum 2) und ein negatives Serum (Serum 3) in 16-fachem Ansatz auf verschiedenen Positionen einer Platte untersucht.

Die erzielten OD-Werte der jeweiligen Testseren sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Es wurde keine signifikante Abweichung der 16 OD-Werte eines Serums festgestellt.

Tab. 23: Ergebnisse der Überprüfung der Intraassay-Differenzen

Ansatz Nr.	OD-Werte verschiedener Seren		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
1	1,114	0,500	0,131
2	1,135	0,527	0,141
3	1,190	0,528	0,150
4	1,206	0,546	0,165
5	1,247	0,550	0,166
6	1,329	0,567	0,169
7	1,334	0,590	0,172
8	1,383	0,602	0,172
9	1,411	0,607	0,176
10	1,417	0,638	0,178
11	1,448	0,642	0,180
12	1,544	0,649	0,180
13	1,600	0,660	0,188
14	1,678	0,688	0,196
15	1,779	0,688	0,261
16	1,920	0,693	0,390
X	1,421	0,605	0,188
SD	0,233	0,063	0,061

X = Mittelwert

SD = Standardabweichung

4.2.2.2 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 (Nr. 1 und 2), zwei negative Hühnerkontrollseren (Nr. 5 und 6) und zwei Hühnerkontrollseren im Grenzbereich (Nr. 3 und 4) sowie ein positives Kaninchenserum (Nr. 8) und ein negatives Kaninchenserum (Nr. 7) verwendet. Jedes Serum wurde im 12-fachen Ansatz getestet.

Die Testergebnisse der verschiedenen Platten wurden mit Hilfe eines positiven Referenzserums korrigiert (siehe Abschnitt 3.2.2.6).

Aus 12 Testansätzen an 5 verschiedenen Tagen ergab sich bei der Varianzanalyse keine signifikante Abweichung der OD-Werte ($P \leq 0,05$) der Testseren zwischen den Tagen und Ansätzen (Tab. 24).

Tab. 24: Ergebnisse der Überprüfung der Interassay-Differenzen

Serum Nr.		OD-Werte an verschiedenen Tagen				
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
1	X	1,294	1,166	0,903	1,286	1,270
	SD	0,120	0,099	0,076	0,127	0,095
2	X	1,489	1,311	1,158	1,427	1,237
	SD	0,084	0,136	0,108	0,148	0,145
3	X	0,558	0,545	0,427	0,603	0,518
	SD	0,031	0,045	0,040	0,042	0,044
4	X	0,701	0,681	0,651	0,778	0,711
	SD	0,044	0,050	0,065	0,054	0,040
5	X	0,311	0,341	0,375	0,309	0,298
	SD	0,022	0,023	0,027	0,023	0,014
6	X	0,124	0,133	0,111	0,138	0,141
	SD	0,018	0,010	0,013	0,017	0,007
7	X	0,337	0,367	0,356	0,392	0,309
	SD	0,025	0,029	0,046	0,042	0,022
8	X	0,693	0,651	0,694	0,745	0,645
	SD	0,048	0,051	0,042	0,063	0,064

X = Mittelwert

SD = Standardabweichung

4.2.3 Test der Lagerfähigkeit der ELISA-Platten

Um die Lagerfähigkeit der selbsthergestellten ELISA-Platten zu prüfen, wurden je 9 Platten bei 4°C, -20°C und -70°C gelagert. Zum Testen der Platten wurden jeweils zwei stark positive Hühnerkontrollseren (Nr. 1 und 2), zwei mittelgradig positive Hühnerkontrollseren (Nr. 3 und 4), ein Hühnerserum im Grenzbereich (Nr. 5) und ein negatives Kontrollserum (Nr. 6) auf die Platten aufgetragen und im Abstand von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 14 und 18 Wochen Lagerzeit getestet.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die Platten bei allen Testtemperaturen gleich gut lagern lassen. Ein leichter Aktivitätsabfall ist bei allen Platten gleichermaßen vorhanden. In der 18. Woche tritt bei einigen Testseren ein leichter Anstieg der OD-Werte auf.

Die erhaltenen OD-Werte sind in Tabelle 25 zusammengefaßt und für jedes Serum in einer Abbildung dargestellt (Abb. 2 bis 7). Die drei Kurven in einer Abbildung zeigen den Verlauf der OD eines Serums während der Testperiode bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen der Testplatten.

Ergebnisse

Tab. 25: OD-Werte der Testseren bei Lagerung der Testplatten bei drei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 18 Wochen

Serum Nr.	Temperatur	X der OD-Werte der Seren in den Testwochen								
		1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	10. Woche	14. Woche	18. Woche
1	+4°C	2,591	2,104	2,073	2,029	2,097	1,905	2,221	1,863	1,966
	-20°C	2,484	2,131	2,022	2,005	2,204	2,201	2,171	1,785	1,933
	-70°C	2,519	2,543	2,356	2,144	2,166	2,127	2,241	1,711	2,245
2	+4°C	2,796	2,329	2,094	2,193	2,412	2,132	2,268	2,229	2,057
	-20°C	2,663	2,469	2,228	2,346	2,302	2,448	2,251	2,075	2,369
	-70°C	2,644	2,921	2,682	2,286	2,469	2,258	2,493	1,980	2,523
3	+4°C	1,724	1,195	0,837	0,953	0,558	0,703	1,125	0,710	0,782
	-20°C	1,521	1,273	0,897	1,021	0,536	0,836	1,102	0,806	0,863
	-70°C	1,504	1,244	0,865	0,922	0,592	0,886	1,101	0,692	0,845
4	+4°C	1,885	1,660	1,167	1,244	1,065	0,870	0,954	0,999	0,870
	-20°C	1,602	1,683	1,209	1,367	0,901	1,145	0,961	0,969	0,948
	-70°C	1,682	1,965	1,199	1,261	1,054	1,214	0,993	0,770	1,072
5	+4°C	0,645	0,372	0,649	0,573	0,496	0,430	0,485	0,286	0,260
	-20°C	0,586	0,412	0,671	0,549	0,419	0,483	0,477	0,290	0,320
	-70°C	0,564	0,369	0,662	0,530	0,504	0,497	0,463	0,230	0,331
6	+4°C	0,206	0,282	0,146	0,204	0,118	0,153	0,170	0,179	0,173
	-20°C	0,191	0,320	0,169	0,197	0,110	0,166	0,155	0,179	0,199
	-70°C	0,198	0,277	0,143	0,195	0,125	0,179	0,144	0,169	0,196

X = Mittelwerte aus 10 Ansätzen

Abbildung 2

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 1)

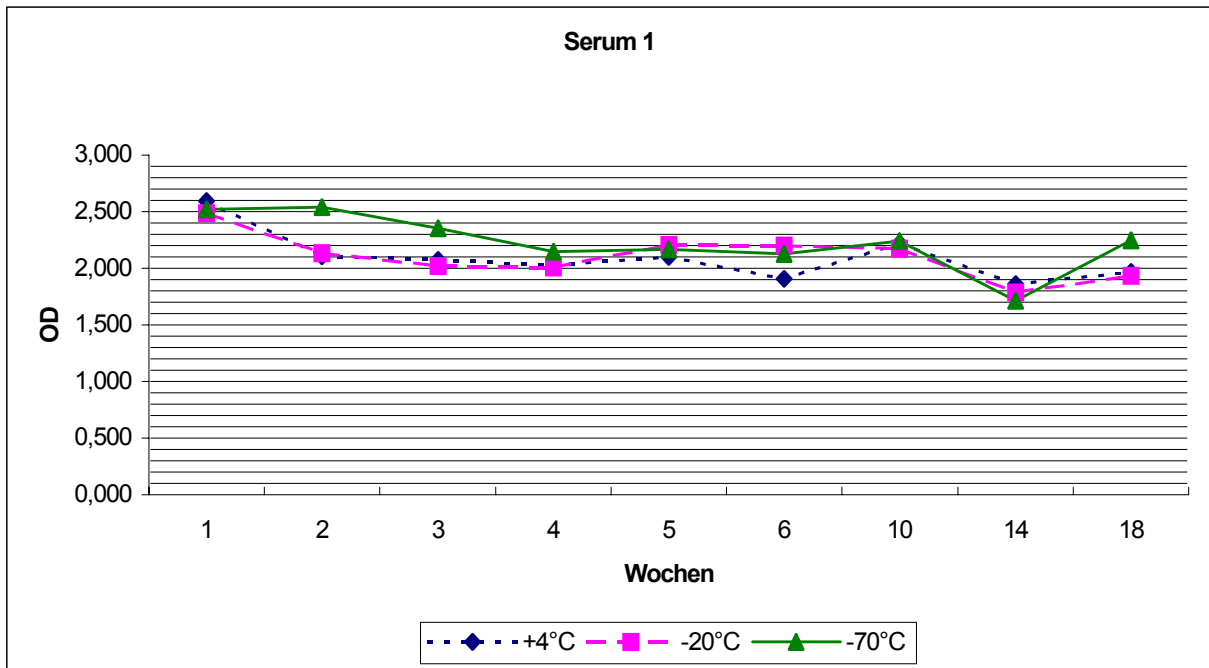


Abbildung 3

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 2)

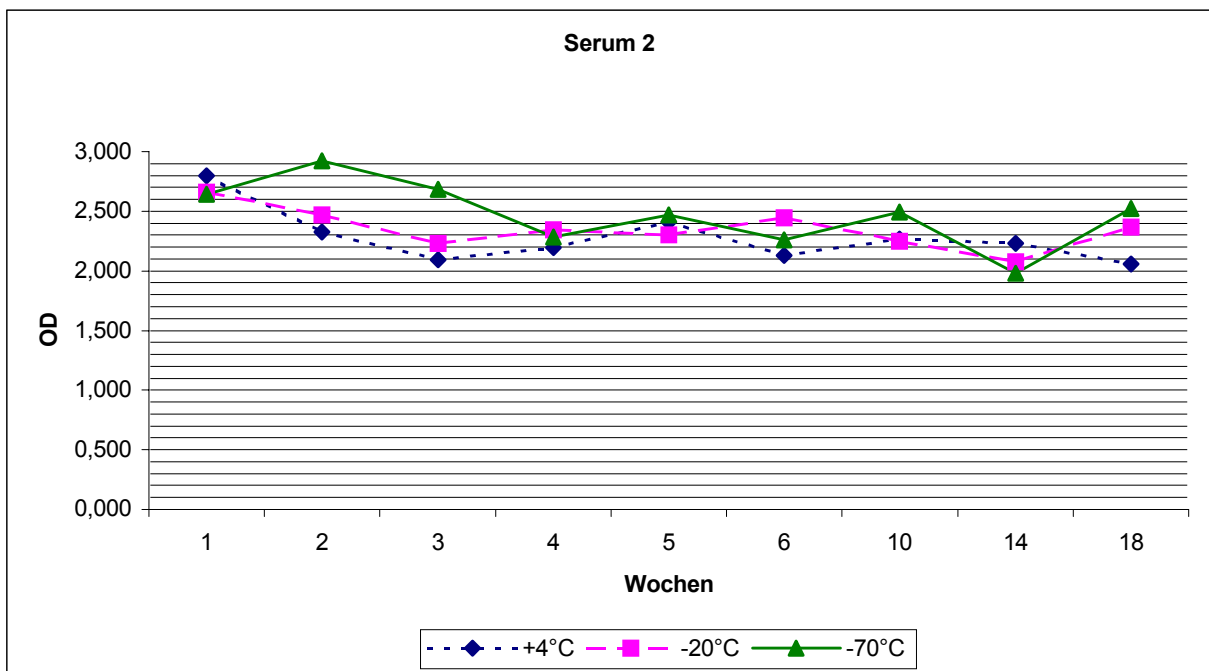


Abbildung 4

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 3)

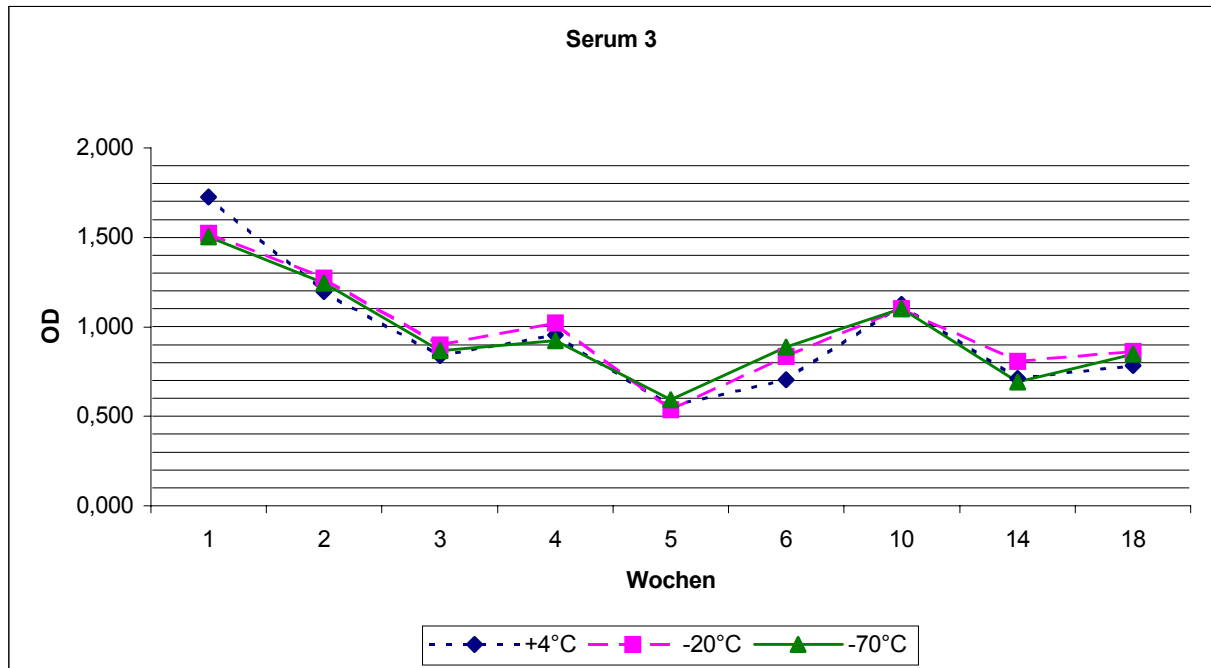


Abbildung 5

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 4)

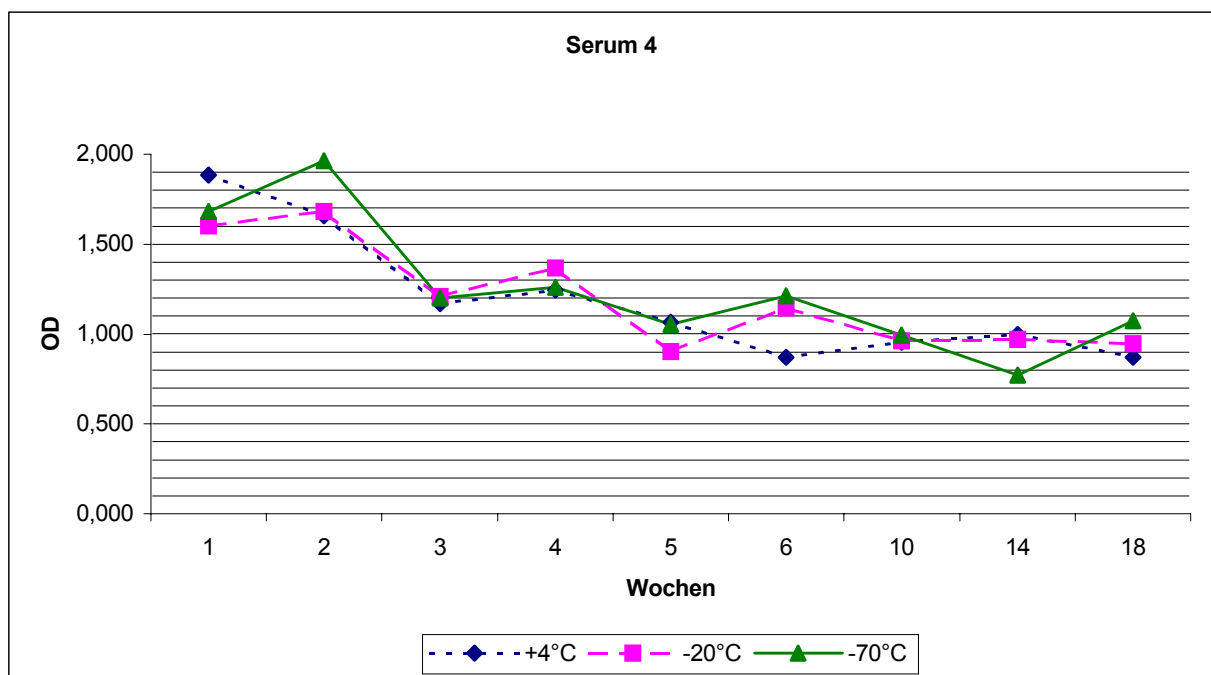


Abbildung 6

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 5)

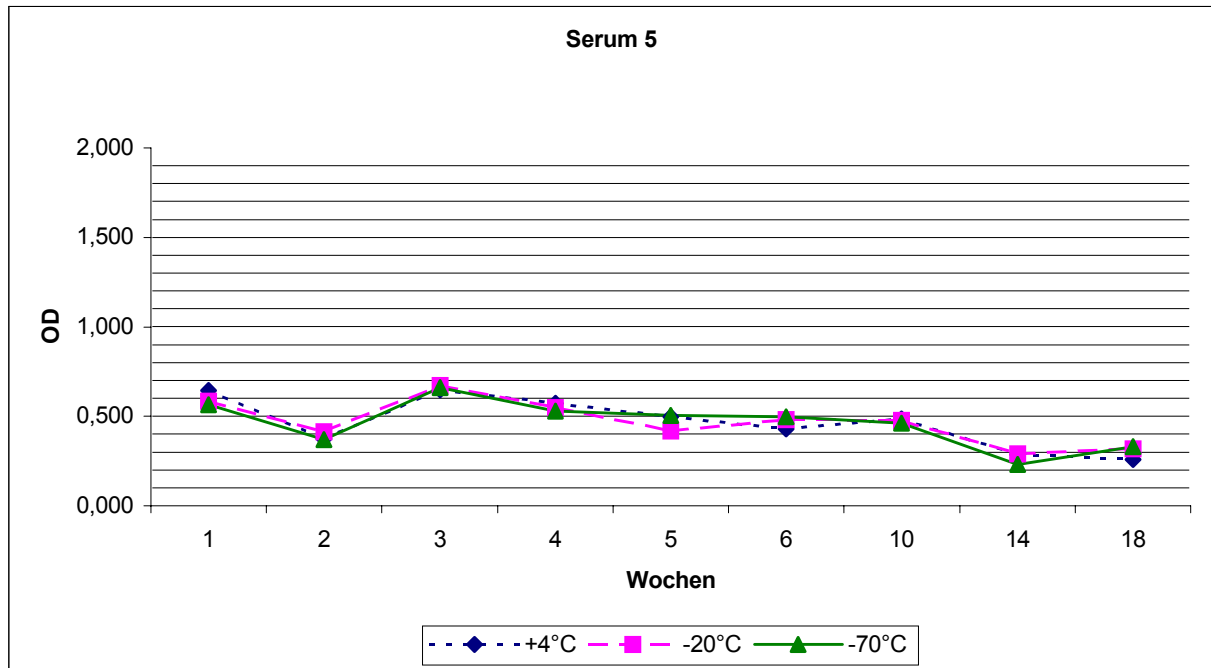
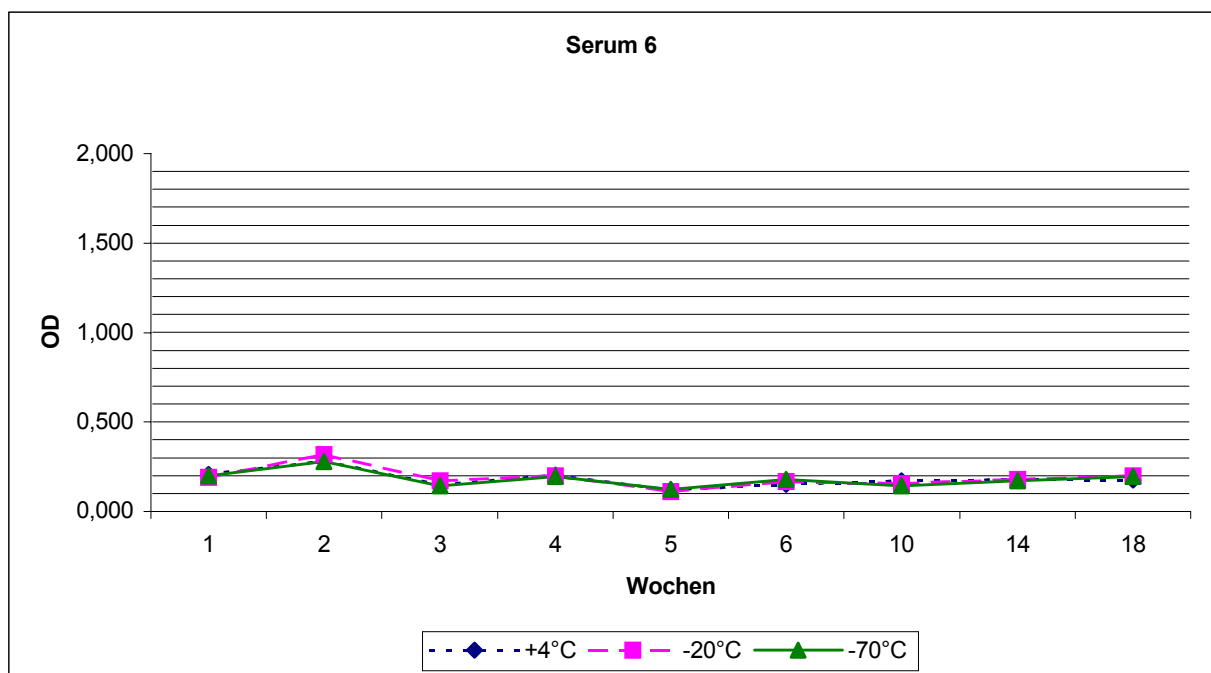


Abbildung 7

Verlauf der OD-Werte bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (Serum 6)



4.3 Ergebnisse zu Teil 3

4.3.1 Verlauf der OD von zwei Legehennenherden unter Praxisbedingungen

Eine Übersicht über die untersuchten Serumproben von 2 Legehennenherden aus dem Jahr 1998 und 1999 ist in den Tabellen 26a und 26b zusammengefaßt.

Die Tabellen zeigen, dass der Anteil der positiv getesteten Proben mit zunehmendem Lebensalter bei beiden Herden deutlich ansteigt. Der Anteil der positiv getesteten Proben stieg bei beiden Herden von 6.25% zu Beginn des Tests auf 76.7% bei Herde 1 und auf 81% positiv getestete Proben bei Herde 2.

Der Verlauf der OD über einen Zeitraum von 46 bzw. 48 Lebenswochen ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Abbildung zeigt, dass die durchschnittlichen OD-Werte im Verlauf von ca. 50 Lebenswochen bei beiden Herden deutlich ansteigen. Herde 2 zeigt jedoch eine stärkere Streuung der OD-Werte.

Bei keiner der beiden Herden waren Tiere mit klinischen Anzeichen der amyloiden Arthropathie beobachtet worden.

Tab. 26a: Ergebnisse der Anteile positiv, fraglich und negativ getesteter Proben von Legehennenherde 1 im Verlauf von 46 Lebenswochen

Herde 1							
n Proben	Alter in Wochen	Ergebnisse der Proben					
		positiv		fraglich		negativ	
		n	%	n	%	n	%
80	12 - 20	5	6.25	0	0	75	93.75
100	21 - 30	17	17.0	3	3.0	80	80.0
90	31 - 40	31	34.4	2	2.2	57	63.4
90	41 - 49	54	60.0	0	0	36	40.0
30	51 - 58	23	76.7	0	0	7	23.3

n = Anzahl der Proben

Ergebnisse

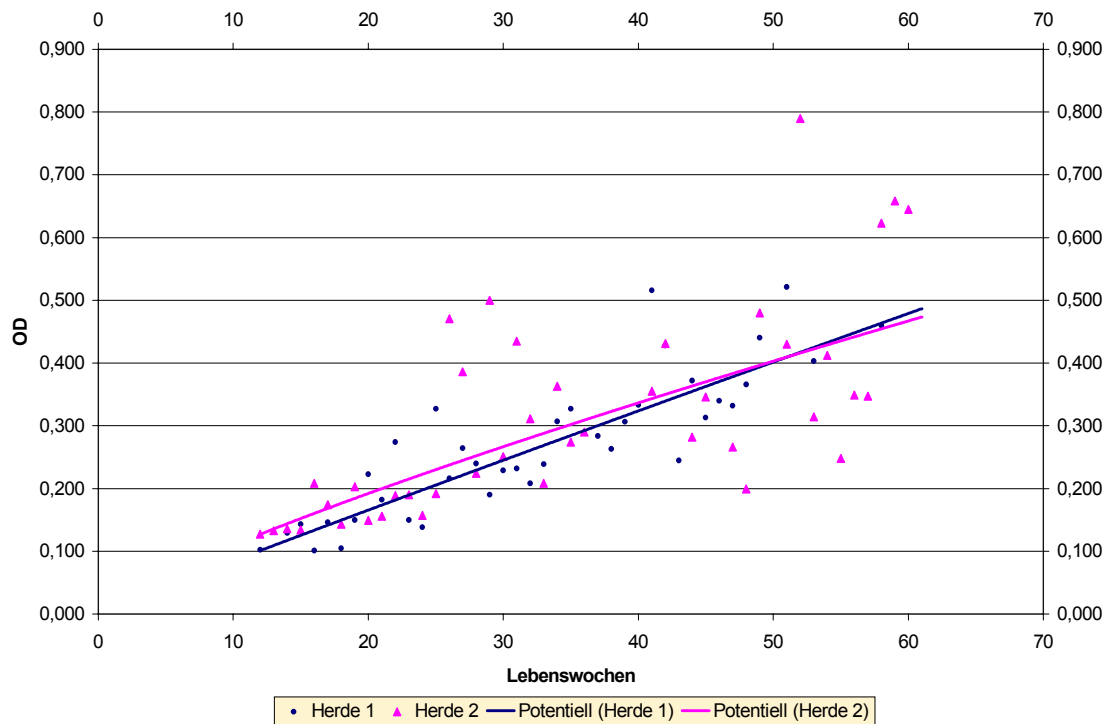
Tab. 26b: Ergebnisse der Anteile positiv, fraglich und negativ getesteter Proben von Legehennenherde 2 im Verlauf von 48 Lebenswochen

Herde 2							
n Proben	Alter in Wochen	Ergebnisse der Proben					
		positiv		fraglich		negativ	
		n	%	n	%	n	%
80	13 - 20	5	6.25	1	1.3	74	92.5
100	21 - 30	30	30.0	1	0.8	69	69.0
70	31 - 37	28	40.0	2	2.8	40	57.2
70	42 - 50	29	41.4	2	2.8	39	55.8
100	52 - 61	81	81.0	0	0	19	19.0

n = Anzahl der Proben

Eine ausführliche Auflistung der Serumproben mit den durchschnittlichen OD-Werten pro Lebenswoche ist in Anhang 10.5 dargestellt.

Abbildung 8: Verlauf der durchschnittlichen OD- Werte bei serologischen Verlaufsuntersuchungen auf Antikörper gegen *E. faecalis* bei Legehennen



4.3.2 Diagnostische serologische Untersuchungen

Bei der Untersuchung der Serumproben wiesen sämtliche im Jahr 1999 untersuchten Herden positive Ergebnisse im *E. faecalis*-ELISA auf. Im Jahr 2000 wurden von 61 untersuchten Herden 48 positiv und 12 Herden negativ getestet. Eine Herde wies ein fragliches Ergebnis auf, da eine Probe im fraglichen Bereich getestet worden war und alle anderen Proben dieser Herde negativ blieben.

Herden wurden als positiv bewertet, sobald eine Probe mit positivem Ergebnis getestet wurde. In als negativ bewerteten Herden waren alle Proben negativ getestet worden.

Das durchschnittliche Alter der Tiere in den positiv getesteten Herden betrug 34,8 Wochen, das durchschnittliche Alter der Tiere in den negativ getesteten Herden betrug 15,3 Wochen. Die Tiere der fraglich getesteten Herde waren 27 Wochen alt. Die einzelnen Werte sind in den Tabellen in Anhang 10.6 dargestellt.

Die Ergebnisse der diagnostischen serologischen Untersuchungen der Serumproben sind in Tabelle 27 zusammengefaßt.

Tab. 27: Übersicht über die untersuchten Serumproben

Jahr	Zahl der Proben	Ergeb. der Proben			Zahl der Herden	Ergeb. der Herden		
		pos.	frag.	neg.		pos.	frag.	neg.
1999	306	176	2	128	7	7	0	0
2000	1498	719	15	764	61	48	1	12