

5 Diskussion

Keimisolierung und –charakterisierung

Die **Isolierung** der Isolate erfolgte nach bekannten Methoden durch die Anzucht auf Schafblutagarplatten. Zum Selektieren der Enterokokken wurde entsprechend der Eigenschaften von Enterokokken Äskulin-Galle-Agar verwendet (FACKLAM und MOODY, 1970). Für die Anreicherung der Tupferproben stellte sich v.a. die Chromocult Enterokokken-Bouillon (Merck, Darmstadt, D) als wirkungsvoll heraus. Die Ergebnisse stimmen mit den von REUTER (1992) gemachten Angaben überein.

Für die Charakterisierung der *E. faecalis*-Isolate wurden zunächst die **Stoffwechselfparameter** herangezogen. Alle *E. faecalis*-Isolate waren charakteristische grampositive Kokken, von denen 4 das typische, im api20Strep-Test beschriebene Testprofil aufwiesen. 39 Isolate wichen mit einer negativen LAP-Reaktion vom typischen Testprofil ab. Insgesamt ergaben sich 11 Typen mit unterschiedlichen Testprofilen.

In der vorliegenden Literatur werden Enterokokken oft als heterogene Gattung mit einer Vielzahl von verschiedenen Eigenschaften beschrieben (SELBITZ, 1992). Nach den Ergebnissen von SCHLEIFER & KILPPER-BÄLZ (1984) und KAUKAS et al. (1986) konnte eine größere Anzahl an Stoffwechsel-Profilen erwartet werden.

Von 29 ausgewählten Isolaten waren Antibiogramme im Mikrodilutionsverfahren erstellt worden. 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. Diese stellen ein quantitatives Testergebnis dar, das den Grad der Empfindlichkeit des Erregers gegenüber dem getesteten Wirkstoff angibt und damit von hohem Wert für die Einschätzung von Therapieerfolgen ist.

Nach SELBITZ (1992) weisen Enterokokken u.a. Empfindlichkeiten gegen Aminoglykosid-Antibiotika auf. In der vorliegenden Arbeit konnten mehrfach Resistenzen gegen verschiedene Aminoglykoside festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich ausgeprägte Resistenzen gegen Sulfonamide, Tetracyclin, Trimethoprim und Colistin.

Dagegen zeigten sich alle 58 Isolate als empfindlich gegen Vancomycin, obwohl Vancomycinresistenzen relativ häufig bei Enterokokken, welche insbesondere aus Mastgeflügel isoliert worden waren, angetroffen werden (RICHTER, 1998). Daher kann

vermutet werden, dass Vancomycin-resistente *E. faecalis*-Stämme zum Zeitpunkt der Probennahme aus Legehennen noch nicht vorgekommen waren.

Für die Serotypisierung der Isolate mittels der **Agargelpräzipitation** (AGP) wurde nach der Methode von HAFEZ und STING (1999) hitzestabiles Antigen aus Reinkulturen der Isolate gewonnen. Dieses Antigen erwies sich als geeignet für die Verwendung in der AGP. Es konnten eindeutige präzipitierende Banden mit den Antiseren beobachtet werden, und die Ergebnisse erwiesen sich als reproduzierbar.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass nur ein kleiner Anteil der Isolate (32,7%) monospezifische Reaktionen zeigte. Viele Isolate reagierten mit 2 oder 3 Antiseren. Eine klare Gruppierung in verschiedene Serotypen war somit nicht möglich.

Da es bei Antiserum Nr. 30 zu Kreuzreaktionen mit den Antigenen K923/96-1 und Nr. 3 gekommen war, obwohl das Antigen Nr.30 nicht mit den Antiseren K923/96-1 und Nr. 3 reagiert hatte, scheint Antiserum Nr. 30 für die Serotypisierung mit der AGP ungeeignet zu sein.

Selbst unter Ausschluß dieses Antiserums verbleiben noch immer viele Isolate mit einem Anteil von 33%, die Mehrfachreaktionen zeigten. Solch umfangreichen Kreuzreaktionen lassen eine eindeutige Serotypisierung mit den zur Verfügung stehenden Seren nicht zu. Um jedoch eine Serotypisierung von *E. faecalis* als nicht möglich zu beschreiben, sind noch weitere Versuche mit alternativen Antiseren notwendig.

Der verfügbaren Literatur zufolge liegen keine Angaben über eine mögliche Serotypisierung von Enterokokken vor.

Bei der Verwendung der **Pulsfeld-Gelelektrophorese** ist es möglich, beim Vergleich von Bakterien-Isolaten das gesamte Genom miteinzubeziehen. Dabei werden die bei der Restriktion entstandenen DNS-Fragmente in Größe und Anzahl verglichen und daran der Grad der Verwandtschaft verschiedener Isolate ermittelt. Da diese Methode nach TENOVER et al. (1995) die zur Zeit empfindlichste genotypische Differenzierungsmethode darstellt, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Das für die Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ausgewählte Protokoll in Anlehnung an die Methode von MIRANDA et al. (1991) und KLARE & WITTE (1997) erwies sich als gut geeignet, da sich hiermit eine größere Anzahl deutlich sichtbarer Banden auftrennen ließ.

Da der in jedem Gel mitgeführte Referenzstamm K923/96-1 jeweils identische Restriktionsmuster ergab, konnte die Stabilität der Restriktionsstellen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in der PFGE festgestellt werden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen eine Reihe verschiedener Restriktionsmuster. Ähnliche Erfahrungen machten LANDMAN et al. (1999b), die beim Vergleich von Restriktionsmustern verschiedener *E. faecalis*-Isolate ebenfalls sowohl hochgradig übereinstimmende als auch stark abweichende Muster fanden. Diese Feststellungen sprechen für eine deutliche Heterogenität der Genome. In der vorliegenden Arbeit wiesen 37 von 57 Isolaten eine hohe Übereinstimmung mit dem Restriktionsmuster des Referenzstammes auf. Diese hohe Übereinstimmung läßt vermuten, dass es sich um genetisch nah verwandte Isolate handelt.

Insgesamt konnten 3 Gruppen gebildet werden, innerhalb derer die Isolate eine hohe Verwandtschaft aufweisen. Alle Isolate der Gruppe A weisen Restriktionsmuster auf, die sich lediglich in der Position einer einzelnen Bande unterscheiden. Die Subgruppen A5 und A6 zeigen jeweils zwei abweichende Banden. Diese geringen Unterschiede weisen auf eine sehr hohe verwandtschaftliche Nähe hin.

15 Isolate ließen sich nicht gruppieren. Durch umfangreichere Untersuchungen mit einem hohen Probenaufkommen können sicher auch diese Restriktionsmuster gruppiert werden.

Bisher fehlen in der Literatur Anregungen über eine Aufteilung der Spezies *Enterococcus faecalis* in mehrere Subspezies. Aufgrund der Möglichkeit, größere Gruppen und Subgruppen zu bilden, wäre jedoch eine solche Aufteilung denkbar.

LANDMAN et al. (1999b) vermuteten, dass bestimmte Restriktionsmuster auf eine hohe Pathogenität hindeuten könnten. Da der Referenzstamm aus dem entzündeten Gelenk einer Junghenne gewonnen wurde, die klinisch an amyloider Arthropathie erkrankt war, wird angenommen, dass die 37 Isolate mit naher Verwandtschaft zum Referenzstamm eine ebenso hohe Pathogenität wie der Referenzstamm aufweisen.

Um den Grad der Pathogenität der verschiedenen *E. faecalis*-Isolate festzustellen, wurden 27 Isolate mit unterschiedlich übereinstimmenden Restriktionsmustern ausgewählt und im Brutei auf ihre **Pathogenität** getestet.

Die Pathogenitätstests basieren auf Untersuchungen von WOOLEY et al. (2000), die diesen Test für die Untersuchung der Pathogenität von *E. coli*-Isolaten durchgeführt hatten.

Der Infektionsweg über die Allantoishöhle wurde gewählt, da nach den Angaben von WOOLEY et al. (2000) bei diesen anhand der Anzahl abgestorbener Embryonen zwischen verschiedenen Virulenzstufen getesteter *E. coli*-Isolate unterschieden werden kann, nicht jedoch bei einer Infektion über den Dottersack.

Es konnten stark unterschiedliche Grade der Pathogenität festgestellt werden. Bei allen 16 Isolaten mit hochgradiger Übereinstimmung der Muster und damit naher Verwandtschaft wurde eine hohe Pathogenität festgestellt, bei den 10 Isolaten mit geringgradiger Übereinstimmung stellten sich 2 Isolate als hochgradig pathogen heraus, 4 Isolate zeigten mittelgradige Pathogenität und 4 Isolate waren nur geringgradig bzw. nicht pathogen. Der mitgeführte Referenzstamm konnte in diesem Versuch seine hohe Pathogenität beweisen. Auch WOOLEY et al. (2000) konnte bei seinem Versuch unterschiedliche Pathogenitätsgrade für *E. coli* nachweisen.

Die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) pro Brutei unterlagen versuchsbedingten Schwankungen. Da jedoch bei den Wiederholungstests keine erhöhte Pathogenität bei den Versuchsreihen mit höheren KBE-Werten pro Brutei festgestellt werden konnte, werden die Schwankungen der KBE-Werte als vernachlässigbar für die Ergebnisse der Pathogenitätstests betrachtet. Auch bei niedrigeren KBE-Werten pro Brutei konnte keine Verringerung der Pathogenität beobachtet werden.

Beim Versuch, eine Beziehung zwischen den verschiedenen Charakterisierungsmethoden und der Pathogenität der Isolate herzustellen, lassen weder die Gruppierung über die Stoffwechselfparameter noch die Serotypisierung eindeutige Zuordnungen zu.

Die Isolate mit hoher Pathogenität im Brutei gehören der biochemischen Gruppe 2, 3, 4 und 10 an. Die mittelgradig pathogenen Isolate gehören zur Gruppe 2 und 9 und die geringgradig pathogenen Isolate finden sich in den Gruppen 2 und 11. Es ist keine Korrelation zwischen biochemischen Testprofilen und Pathogenitätsgrad festzustellen.

In der Serotypisierung mittels der AGP ist bereits aufgrund der hohen Anteile an Kreuzreaktionen keine eindeutige Zuordnung möglich. Von den hochgradig pathogenen Isolaten reagierten einige monospezifisch mit dem Antiserum K923/96-1, andere nicht. Es scheint also keine serotypischen Gemeinsamkeiten zwischen hochgradig pathogenen Isolaten zu geben.

Die Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, dass Isolate mit einem Restriktionsmuster in der PFGE, das dem Muster des Referenzstammes in hohem Grade ähnelt, ebenfalls hochgradig pathogen sind. Alle Isolate mit einer Übereinstimmung von 96 und 100% wiesen eine hohe

Pathogenität auf, nur ein Isolat war lediglich mittelgradig pathogen. Die Vermutung von LANDMAN et al. (1999b), dass bestimmte Restriktionsmuster auf Pathogenität hindeuten, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse bekräftigt werden.

Dagegen ist die Pathogenität der Isolate mit stärker abweichenden Restriktionsmustern schwankend. Es gab sowohl Isolate mit hoher Pathogenität als auch Isolate mit geringgradiger Pathogenität. Die beiden pathogenen Isolate (Nr.15 und Nr.23) zeigen einige übereinstimmende Banden mit dem Referenzstamm. Möglicherweise stellen diese Banden eine Gemeinsamkeit aller pathogener *E. faecalis*-Isolate dar. Um diese Vermutungen zu untermauern, sind weitere Untersuchungen notwendig. Bei den geringgradig pathogenen Isolaten (Nr. 13, 14, 45 und K808/97) konnten keine gemeinsamen Banden festgestellt werden.

2 Isolate wurden dem Pathogenitätstest im Brutei mehrfach unterzogen. Es konnten keine Schwankungen des jeweiligen Pathogenitätsgrades festgestellt werden. Daher konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Pathogenitätstest im Brutei nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse des Pathogenitätstests im Brutei auf das lebende Tier übertragen zu können, wurde ein **Pathogenitätstest im Versuchstier** durchgeführt. Für diesen Versuch wurde der Referenzstamm, welcher sich im Brutei-Versuch als hochgradig pathogen erwiesen hatte, und ein Isolat mit geringgradiger Pathogenität im Brutei ausgewählt.

Die Tiere, die mit dem geringgradig pathogenen Keim infiziert worden waren, blieben klinisch gesund und entwickelten sich in gleicher Weise wie die Tiere der Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu erkrankten die Tiere, die mit dem hochgradig pathogenen Referenzstamm infiziert worden waren, nach wenigen Tagen. Diese Tiere zeigten in 10 von 15 Fällen ein verringertes Wachstum und geschwollene Gelenke mit eitrigen Arthritis. Auch die OD-Werte in der serologischen Untersuchung waren deutlich höher als die der anderen Versuchstiere. Nach einem experimentellen Infektionsversuch untersuchten LANDMAN et al. (2001b) die Sera von 14-Wochen alte braune Legehennen mit einem selbsthergestellten ELISA. Die Tiere wurden in der 6. Lebenswoche i.v. mit *E. faecalis* infiziert. Infizierte Tiere hatten hochpositive OD-Werte. Hingegen wiesen die gleichaltrigen Tiere der nichtinfizierten Kontrollgruppe negative OD-Werte auf. Die Ergebnisse von LANDMAN et al. werden durch den Pathogenitätstest im Versuchstier bestätigt, wenn es sich dabei um ein hochgradig pathogenes *E. faecalis*-Isolat handelt .

Gemäß dem Koch'schen Postulat hätten sich in den Gelenken Amyloidablagerungen finden sollen, um von einer reproduzierten amyloiden Arthropathie sprechen zu können. Allerdings handelt es sich bei der amyloiden Arthropathie um eine Amyloidose vom AA-Typ. Dabei wird Amyloid aufgrund langanhaltender Reizungen durch meist chronische Infektionen abgelagert. Die Versuchstiere wurden jedoch bereits 21 Tage post infectionem untersucht. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Infektion noch im akuten Stadium. LANDMAN et al. (1997, 1998a) fanden erste Amyloidablagerungen 6 Wochen nach der Infektion in den Gelenken der erkrankten Tiere. Bei einer längeren Versuchsdauer wären die Amyloidablagerungen mit großer Wahrscheinlichkeit aufgetreten, da die Gelenke der Tiere bereits starke Entzündungserscheinungen zeigten. Jedoch mußte der Versuch wegen des schlechten Zustandes der erkrankten Tiere, also aus Tierschutz relevanten Gründen, nach 3 Wochen beendet werden.

5 Tiere der Gruppe 1 zeigten keine oder nur geringgradige Reaktionen auf die Infektion. Diese Tiere nahmen im Gegensatz zu den 10 anderen Tieren an Gewicht zu und wiesen auch deutlich niedrigere Antikörper-Gehalte auf. Eine mögliche Ursache dafür kann eine fehlerhafte Injektionstechnik bei der Infektion der Tiere sein. LANDMAN et al. (1999b) zeigten, dass die Infektion mit *E. faecalis* am besten bei intravenöser oder intraperitonealer Injektion gelingt. Eine fälschlicherweise subkutan gesetzte Injektion könnte die erfolgreiche Infektion des Versuchstieres verhindern. Dafür spricht auch, dass die Reisolierung von *E. faecalis* aus den Organproben der klinisch gesunden Tieren - mit einer Ausnahme – nicht gelang. Lediglich aus den Organproben der klinisch erkrankten Tiere konnte *E. faecalis* reisoliert werden. Bei der Gruppe, die mit dem wenig pathogenen Isolat infiziert worden war, gelang eine Reisolierung von *E. faecalis* aus den Gelenken von 6 Tieren und einem Herzen.

Damit konnte die im Brutei festgestellte Pathogenität von 2 unterschiedlichen Isolaten auch im Versuchstier reproduziert werden. Um die Ergebnisse repräsentativer zu gestalten, kann der Tierversuch mit weiteren *E. faecalis*-Isolaten wiederholt werden.

Im Sinne des Tierschutzes ist der Pathogenitätstest im Brutei dem Tierversuch am lebendem Tier deutlich vorzuziehen.

Im Vergleich der verschiedenen Charakterisierungsmethoden miteinander muß festgestellt werden, dass zwischen den Gruppierungen, die sich aus den biochemischen Parametern, der Serotypisierung mittels AGP und den Restriktionsmustern ergeben, keine Korrelation festgestellt werden kann.

Im direkten Vergleich kann eine starke Durchmischung der vorhandenen Gruppen, die mit den verschiedenen Charakterisierungsmethoden gebildet werden konnten, festgestellt werden. Die meisten Isolate, die in der AGP monospezifische Reaktionen zeigten, gehören in die biochemische Gruppe 2, unabhängig von dem Antiserum, mit dem die monospezifische Reaktion stattfand. Zusätzlich sind vereinzelt Vertreter der biochemischen Gruppe 1, 5 und 11 zu finden. Dies spricht für eine weite Verbreitung der biochemischen Gruppe 2, lässt aber keine korrelierende Zuordnung zwischen der AGP und der Biochemie erkennen.

Ähnliche Verhältnisse zeigen sich auch im Vergleich zwischen PFGE, AGP und Biochemie. Isolate aus der größten Restriktionsmuster-Gruppe, der Gruppe A, gehören zu den biochemischen Gruppen 1, 2, 3, 4, 7, 10 und 11. Gruppe B verteilt sich auf 3 biochemische Gruppen, Gruppe C ist in 2 biochemischen Gruppen zu finden. Die Isolate mit monospezifischen Reaktionen in der AGP verteilen sich ebenfalls auf alle 3 Restriktionsmuster-Gruppen. Eine Korrelation ist in keinem Fall erkennbar.

Um ein *E. faecalis*-Isolat als pathogen identifizieren zu können, sind die Biochemie und die AGP nicht geeignet. Im Brutei hochgradig pathogen getestete Isolate sind in mehreren biochemischen Gruppen zu finden. In der AGP reagieren hochgradig pathogene Isolate mit verschiedenen Antiseren monospezifisch.

In der PFGE dagegen kann festgestellt werden, dass Isolate mit einer verwandtschaftlichen Nähe von 96 bis 100 % zum Referenzstamm stets hochgradig pathogen waren. Daher kann die Isolation eines solchen Restriktionsmusters als deutlicher Hinweis auf die hohe Pathogenität des betreffenden Isolates angesehen werden.

Herstellung eines indirekten enzymgebundenen Immunoabsorptionstests (ELISA) für serologische Untersuchungen

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *E. faecalis* wurden bislang zwei verschiedene Methoden angewendet. So wurde sowohl mit dem Western Blot [Immunoblotting] (AITCHISON et al., 1987) als auch mit dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay [ELISA] (SHORROCK et al., 1989) für den Nachweis von Antikörpern gegen *E. faecalis* beim Menschen gearbeitet. ARDUINO et al. (1944) hatten einen ELISA zum Nachweis von *E. faecalis*-Antikörpern beim Menschen entwickelt. Dieser Test wurde von LANDMAN et al.

(1999b) für die Untersuchung von Hühnerserum modifiziert und erfolgreich eingesetzt, wobei bei dieser Methode kein hitzestabiles Antigen verwendet wurde.

Der ELISA hat in der Routinediagnostik beim Geflügel eine weite Verbreitung gefunden. Die Gründe dafür liegen vor allem darin, dass die ELISA-Methode sehr spezifisch, einfach und preisgünstig ist. Diese Methode liefert schnelle Ergebnisse, eine gute Reproduzierbarkeit und zeigt eine hohe Sensitivität. Untersuchungen und Messungen von Antigen-Antikörper-Reaktionen mit dem ELISA beim Geflügel wurden bereits in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (HAFEZ 1994, 1998; LANDMAN et al. 1999b).

Das *E. faecalis*-ELISA-Antigen kann aus Reinkulturen als hitzestabiles Antigen hergestellt werden.

Für die Beurteilung der Testseren als positiv oder negativ ist die Festlegung eines Grenzwertes (Cut off) notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde der Cut off durch die Bildung des Mittelwertes der OD-Werte der negativen Kontrollseren, zu dem die 2 bzw. 3fache Standardabweichung addiert wurde, ermittelt (HAFEZ & STING, 1999; siehe Abschnitt 3.2.2.5).

Die Spezifität des für die eigenen Versuche hergestellten ELISA wurde durch die Untersuchung von 14 Hyperimmunseren gegen verschiedene geflügelpathogene Erreger geprüft. Eine Kreuzreaktion mit diesen Seren konnte ebenso wie bei HAFEZ (1994) nicht nachgewiesen werden.

HAFEZ (1994) wies in seiner Arbeit die Reproduzierbarkeit eines indirekten TRT (Turkey Rhinotracheitis)-ELISA nach. Die Untersuchung bestimmter Testseren nach derselben Methode (innerhalb einer Platte als Intraassay-Differenz und auf verschiedenen Platten an aufeinanderfolgenden Tagen als Interassay-Differenz) ergab bei der Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der Schwankungen der OD-Werte positiver Seren bei mehreren Platten unter gleichen Testbedingungen müssen die Testergebnisse verschiedener Platten anhand der OD-Werte eines positiven Referenzserums korrigiert werden, um die verwendeten ELISA-Platten auswerten und vergleichen zu können.

Zusätzlich wurde die Lagerungsfähigkeit der fertiggestellten Testplatten überprüft. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die Testplatten bei allen untersuchten Temperaturen (4°C, -20°C, -70°C) gleichermaßen gut lagern lassen. Im Gegensatz dazu konnte HAFEZ (1994) feststellen, dass sich mit TRT-ELISA-Antigen beschichtete Platten nur bei -70°C optimal lagern lassen. Die maximale Lagerfähigkeit der Testplatten wurden nicht geprüft.

Jedoch konnten Platten der im Lagertest verwendeten Charge noch 6 Monaten nach Abschluß des Lagertests ohne erkennbaren Aktivitätsverlust verwendet werden.

In der verfügbaren Literatur stehen keine vergleichbaren Untersuchungen zur Lagerungsfähigkeit von *E. faecalis*-ELISA-Platten zur Verfügung.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der selbsthergestellte ELISA ein gut geeignetes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen den Referenzstamm K923/96-1 ist. Da auch die Antiseren gegen die *E. faecalis*-Isolate Nr. 3 und Nr. 30 im ELISA positiv reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass dieser ELISA sowohl zum Nachweis von Antikörpern genetisch mit K923/96-1 verwandter *E. faecalis*-Isolate als auch genetisch wenig verwandter Isolate geeignet ist.

Da mehrere pathogene Isolate in der AGP nicht mit K923/96-1 kreuzreagierten, besteht die Möglichkeit, dass diese nicht mit dem ELISA erfaßt werden. Um einen möglichst hohen Anteil pathogener *E. faecalis*-Stämme bei Untersuchungen detektieren zu können, sollten bei der Beschichtung der ELISA-Testplatten mehrere genetisch unterschiedliche pathogene *E. faecalis*-Isolate geprüft werden.

Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen *Enterococcus faecalis* in Geflügelbeständen

Bei den retrospektiven serologischen Verlaufsuntersuchungen zeigen die erzielten Ergebnisse, dass der Anteil der positiv getesteten Proben im Verlauf von ca. 50 Lebenswochen bei den untersuchten zwei Herden deutlich ansteigt. Der Anteil der positiv getesteten Proben stieg von 6.25% zu Beginn des Tests auf 76.7% bei Herde 1 und auf 81% bei Herde 2. Ebenso verhält sich der Verlauf der OD-Werte.

Bei den diagnostischen serologischen Untersuchungen von Serumproben wurden 55 von 68 Herden positiv getestet.

Ähnlich wie bei der oben beschriebenen Verlaufsuntersuchung lag das durchschnittliche Alter der negativ getesteten Herden mit 15,3 Wochen deutlich niedriger als das Alter der positiv getesteten Herden mit 34,8 Wochen.

Die Ergebnisse der retrospektiven serologischen Verlaufsuntersuchungen zeigen, dass junge Legehennen ohne klinische Infektion keine oder nur geringe Antikörpertiter im Serum zeigen. Der Grund dafür, dass mit steigendem Alter der Tiere der Anteil der positiven Proben steigt, wird vermutlich in dem ubiquitären Vorkommen von *E. faecalis* zu finden sein. Enterokokken gehören zwar nicht zur Hauptflora des Intestinaltrakts bei Hühnern, sind aber dennoch regelmäßig in den fäkalen Ausscheidungen der Tiere zu finden (KOLB, 1989). Im Verlauf ihres Lebens geraten die Tiere immer wieder mit wenig pathogenen Stämmen des Keimes in Kontakt und bilden daraufhin Antikörper, ohne dabei klinisch zu erkranken. Aus diesem Grund sind besonders bei älteren Tieren höhere Antikörperwerte im Serum zu finden. Das Fehlen von klinischen Erkrankungen bei den serologisch untersuchten Herden läßt vermuten, dass diese Tiere mit apathogenen oder nur geringgradig pathogenen Stämmen von *E. faecalis* in Berührung gekommen sind.

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen aus dem Pathogenitätstest im Versuchstier. Hierbei wiesen die Tiere, die mit dem wenig pathogenen *E. faecalis*-Isolat K808/97 infiziert worden waren, deutlich niedrigere OD-Werte im Serum auf als Tiere, die mit einem pathogenen Isolat infiziert wurden. Möglicherweise fehlten dem wenig pathogenen Isolat immunogene Eigenschaften. Da das Isolat K808/97 in der AGP nicht mit K923/96-1 kreuzreagierte, besteht die Möglichkeit, dass Antikörper gegen K808/97 im ELISA nicht erfaßt werden.

Bei der Auswahl von *E. faecalis*-Isolaten für die Herstellung von Impfstoffen sollte ein oder mehrere pathogene Isolate mit nachgewiesenem Effekt auf die Immunabwehr von Versuchstieren gewählt werden.

Da die amyloide Arthropathie v.a. bei Junghennen vorkommt (LANDMAN et al., 1994) kann angenommen werden, dass junge Tiere mit deutlichen Antikörpertitern und klinischen Anzeichen der amyloiden Arthropathie mit einem stark pathogenen *E. faecalis*-Stamm infiziert wurden.

Ein Hinweis auf vergleichbar umfangreiche serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen *E. faecalis* konnte in der vorliegenden Literatur nicht gefunden werden.