

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

**Wirksamkeit antimikrobieller Wirkstoffe bei *Arcanobacterium pyogenes*:
Etablierung und Anwendung der Empfindlichkeitsbestimmung
mittels Bouillonmikrodilution
sowie genotypische Charakterisierung tetracyclinresistenter Stämme**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Eva Alešík
aus Augsburg

München, 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Kaltner

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

meiner Familie

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Antimikrobielle Wirkstoffe in der Veterinärmedizin	2
2.1.1	Herkunft und Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe	2
2.1.2	Entwicklung von Antibiotikaresistenzen	3
2.1.2.1	Definition und Mechanismen der Antibiotikaresistenz	3
2.1.2.2	Ursachen und Bekämpfung der Antibiotikaresistenz	4
2.1.3	Resistenzmonitoring	7
2.1.3.1	Multinationale Monitoringprogramme veterinärmedizinisch relevanter Bakterien	7
2.1.3.2	Nationale Monitoringprogramme außerhalb Deutschlands	8
2.1.3.3	Monitoringprogramme in Deutschland	11
2.2	Methoden der <i>In-vitro</i> -Empfindlichkeitsbestimmung	14
2.2.1	Agardiffusion	14
2.2.2	Methoden zur Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration	14
2.2.2.1	Agardilution	16
2.2.2.2	Bouillondilutionsverfahren	16
2.2.3	Normen und Grenzwertproblematik	17
2.2.4	Bouillonmikrodilution nach den Vorgaben des CLSI-Dokumentes M31-A2 (2002)	19
2.3	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	21
2.3.1	Taxonomie	21
2.3.2	Morphologie, Wachstumsverhalten und biochemische Eigenschaften	22
2.3.3	Klinische Bedeutung von <i>A. pyogenes</i> in der Human- und Veterinärmedizin	25
2.3.4	Empfindlichkeitstestung und bekannte Resistenzen	28
2.4	Tetracycline	38
2.4.1	Geschichte, Struktur und antibakterielle Wirkung von Tetracyclinen	38
2.4.2	Einsatzmöglichkeiten von Tetracyclinen	39
2.4.3	Resistenz gegenüber Tetracyclinen	41

2.4.3.1	Resistenzmechanismen	42
2.4.3.2	<i>tet</i> -Gene	43
2.4.3.3	Transfer von <i>tet</i> -Genen	47
2.4.4	<i>tet</i> -Gene bei <i>A. pyogenes</i>	50
2.4.4.1	<i>tet</i> (W)	50
2.4.4.2	<i>tet</i> (33)	52
2.4.4.3	Plasmide von <i>A. pyogenes</i>	53
3. Material und Methoden		54
3.1	Material	54
3.1.1	Untersuchte Isolate von <i>A. pyogenes</i>	54
3.1.2	Referenzstämme	57
3.1.2.1	Referenzstämme für die phänotypischen Untersuchung	57
3.1.2.2	Referenzstämme und Primer für die genotypischen Untersuchung	57
3.1.3	Layout der verwendeten Mikrotiterplatten	61
3.2	Methoden	63
3.2.1	Identifizierung von <i>A. pyogenes</i>	63
3.2.1.1	Makroskopische Identifizierung	63
3.2.1.2	Mikroskopische Identifizierung	64
3.2.1.3	Katalasereaktion	64
3.2.1.4	Xyloseverstoffwechslung	64
3.2.1.5	Löfflserum	64
3.2.1.6	API-Coryne-Testsystem	65
3.2.2	Bakterienasservierung	65
3.2.3	Untersuchungen zur phänotypischen Resistenzlage der LMU-Arcanobakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika	66
3.2.4	Untersuchungen zu möglichen Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten von <i>A. pyogenes</i>	67
3.2.4.1	Einfluss der atmosphärischen Bedingungen auf die Koloniemorphologie	67
3.2.4.2	Einfluss verschiedener Flüssigmedien und atmosphärischer Bedingungen	67

3.2.4.3	Erstellung von Wachstumskurven	68
3.2.5	Ermittlung der tatsächlichen Bakteriendichte einer auf McF 0,5 adjustierten Bakteriensuspension von <i>A. pyogenes</i>	69
3.2.6	Untersuchungen zur Einflussnahme verschiedener Parameter auf die MHK	70
3.2.6.1	Versuche zur Auswertbarkeit und Einflussnahme verschiedener Medien und Inkubationsbedingungen auf die MHK	70
3.2.6.2	Untersuchungen zur Einflussnahme von FKS auf die Aktivität von Tetracyclin	71
3.2.6.3	Untersuchungen zur Abhängigkeit der MHK von der Inokulumsdichte	72
3.2.6.4	Durchführung der Empfindlichkeitstestung von 40 „BfT-Arcanobakterien“ mittels Bouillonmikrodilution in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb	73
3.2.7	MHK-Bestimmung für Tetracyclin aller „LMU-Arcanobakterien“ mittels Bouillonmikrodilution in CaMHB-2%FKS	73
3.2.8	MHK-Bestimmung für Tetracyclin aller „LMU-Arcanobakterien“ mittels modifizierter Agardilution nach Vorgaben des CLSI (2002)	74
3.2.8.1	Erstellung einer antibiotischen Verdünnungsreihe in MHA-Platten	74
3.2.8.2	Inokulation der tetracyclinhaltigen MHA-Platten	75
3.2.9	Durchführung der Bouillonmikrodilution von <i>A. pyogenes</i> im Rahmen des BfT-GermVet-Projekts	75
3.2.10	Statistische Auswertungen	76
3.2.11	Genotypische Untersuchung	76
3.2.11.1	Agarosegelelektrophorese	77
3.2.11.2	Gesamtzell-DNA-Extraktion	77
3.2.11.3	Plasmidisolierung	79
3.2.11.4	Untersuchungen mittels PCR	80
3.2.11.5	Klonierungen und Sequenzierungen	82
3.2.11.6	Restriktionsfragmentlängenanalyse	83

4.	Ergebnisse	85
4.1	Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung	85
4.2	Resistenzmuster der „LMU-Arcanobakterien“ gegenüber ausgewählten Antibiotika	86
4.3	Etablierung der Bouillonmikrodilution für <i>A. pyogenes</i>	86
4.3.1	Untersuchungen zur Einflussnahme von Inkubationsbedingungen, Inokulumsdichte und Nährmedium auf die MHK	86
4.3.1.1	Allgemeine Wachstumseigenschaften in verschiedenen Medien/Atmosphären	86
4.3.1.2	Untersuchungen zur Einstellung der vorgeschriebenen Inokulumsdichte	89
4.3.1.3	Beurteilung der Ablesbarkeit der MHK in den Medien CaMHB, CaMHB-2%FKS, CaMHB-2%Pb, CaMHB-5%Pb und VFM	90
4.3.1.4	Einfluss von Medium und Atmosphäre auf die MHK	91
4.3.1.5	Einfluss von FKS auf die MHK von Tetracyclin	96
4.3.1.6	Einfluss der Inokulumsdichte auf die MHK mehrerer Antibiotika	97
4.3.2	Untersuchungen zum allgemeinen Wachstumsverhalten von <i>A. pyogenes</i>	97
4.3.3	Vergleich der MHK-Werte mehrerer Antibiotika von 40 <i>A. pyogenes</i> -Stämmen in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb bei CO ₂ -supplementierter Inkubationsatmosphäre	102
4.3.4	Vergleich der durch Bouillonmikrodilution und Agardilution ermittelten MHK-Werte von 55 Arcanobakterien am Beispiel Tetracyclin	108
4.4	MHK-Ermittlung im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes	111
4.5	Ergebnisse der genetischen Untersuchung zur Tetracyclinresistenz von <i>A. pyogenes</i>	115
4.5.1	Genotypische Grundlage der Tetracyclinresistenz von 36 <i>A. pyogenes</i> -Isolaten	115
4.5.1.1	Untersuchungen zum Vorkommen des Gens <i>tet(W)</i>	115
4.5.1.2	Untersuchungen zum Vorkommen des Gens <i>tet(33)</i>	118

4.5.1.3	Untersuchungen zum Vorkommen des Gens <i>tet(Z)</i>	118
4.5.2	Plasmiddetektion	126
4.6	Zusammenhang der ermittelte MHK mit dem zugrunde liegenden Genotyp	126
5.	Diskussion	127
5.1	Etablierung der Bouillonmikrodilution zur Empfindlichkeitsprüfung von <i>A. pyogenes</i>	127
5.2	Minimale Hemmkonzentrations-Werte und Beurteilung der Resistenzlage der untersuchten <i>A. pyogenes</i> -Isolate	134
5.3	Genetischer Hintergrund der Tetracyclinresistenz von <i>A. pyogenes</i>	142
6.	Zusammenfassung	147
	Summary	149
7.	Literatur	151
8.	Anhang	167
8.1	Materialien	167
8.1.1	Chemikalien, Enzyme, Nährmedien	167
8.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	168
8.2	Rezepte	169
8.3	Tabellenanhang	172

Danksagung

Lebenslauf

Benutzte Abkürzungen

µg/ml	Mikrogramm/Milliliter
µl	Mikroliter
A. demin.	Aqua demineralis
<i>A. pyogenes</i>	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>
API	Analytical Profile Index
ARBAO	Antibiotic resistance in bacteria from animal origin (EU)
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BP	Blutagarplatte
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
CaMHB	Kationenadjustierte Müller-Hinton-Bouillon
CaMHB-2%FKS	Kationenadjustierte Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 2 % fetalem Kälberserum
CaMHB-2%Pb	Kationenadjustierte Müller-Hinton-Bouillon mit Zusatz von 2 % lysiertem Pferdeblut
CLSI	Clinical Laboratory and Standards Institute
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
DANMAP	Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme
DIN	Deutsches Institut für Normung
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EASSA	European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erythro	Erythromycin
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Antimicrobial Testing
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig
FEDESA	European Federation of Animal Health
FKS	Fetales Kälberserum
FU Berlin	Freie Universität Berlin
GSS	Global Salm Surv
h	Stunden
HHD	Hemmhofdurchmesser
IR	"Inverted Repeats"
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	Insertionsquenz
kb	Kilobasenpaare = 1000 bp
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBE/ml	Koloniebildende Einheiten/Milliliter
KGV	Karbolgentianaviolett
l	Liter
LB-Agar	Luria-Bertani-Agar
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
log ₂	Binär logarithmisch
IPb	Lysiertes Pferdeblut
McF	McFarland-Standard
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MHA	Müller-Hinton-Agar
MHB	Müller-Hinton-Bouillon
MHK	Minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
MRSA	Methicillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
N ₂	Stickstoff
NaCl	Isotonische Kochsalzlösung
NARMS	National Antimicrobial Resistance Monitoring System (USA)
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. notatum</i>	<i>Penicillium notatum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin G
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SxT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
t	Tonne
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TES-Puffer	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
TGD	Tiergesundheitsdienst
U/min	Umdrehungen/Minute
VFM	Veterinary fastidious medium
Vol%	Volumenprozent
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Der Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in der Tiermedizin wurde in den vergangenen Jahren immer wieder in Zusammenhang mit Berichten über das Vorkommen resistenter Bakterien in der Tier-, aber auch in der Humanmedizin gestellt. Für viele Bakterienspezies liegen daher inzwischen Daten zur Verbreitung resistenter Bakterien und zu den zugrunde liegenden Resistenzmechanismen und -genen in verschiedenen begrenzten Populationen vor. Umfassende Studien mit Resistenzraten bei repräsentativen Isolaten wurden jedoch für viele tierpathogene Spezies erst vor kurzem begonnen.

Problematisch für die Durchführung und den Vergleich entsprechender Studien ist der Einsatz etablierter Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung. Eine Vereinheitlichung einer solchen Methodik für tierpathogene Erreger wurde ebenfalls erst in letzter Zeit angestrebt. Eine adäquate Methode ist noch nicht überall etabliert und für einige relevante Spezies noch gar nicht vorhanden. Ebenfalls problematisch ist die klinische Bewertung der im Labor erhobenen Daten anhand von Grenzwerten und damit die Festlegung, welche Bakterienisolate als "resistent" zu bezeichnen sind. Zur Beurteilung der zukünftigen Verbreitung von Resistenzen ist es weiterhin sinnvoll, die genetischen Grundlagen beobachteter Resistenzen zu kennen und deren Übertragbarkeit einschätzen zu können.

Arcanobacterium pyogenes ist ein weltweit verbreiteter Erreger eitrig-abszedierender Entzündungsprozesse vor allem bei Rind und Schwein. Zur antimikrobiellen Therapie von Infektionen mit Arcanobakterien werden Penicilline eingesetzt, da das Genus allgemein als empfindlich gegenüber dieser Wirkstoffgruppe gilt. In bestimmten Fällen werden als Alternative jedoch auch andere Antibiotika empfohlen. Für Arcanobakterien wurden aufgrund der Penicillinempfindlichkeit bisher nur selten Untersuchungen zur Empfindlichkeit durchgeführt, weshalb keine fundierten Informationen über die tatsächliche Resistenzlage des Erregers vorliegen. Es gibt darüber hinaus keine etablierten Verfahren zur Empfindlichkeitstestung und -beurteilung dieser Bakterien. Aufgrund der physiologischen Eigenschaften von Arcanobakterien kommen diese prinzipiell als wichtiges Reservoir für übertragbare Resistenzgene in Frage, entsprechende Informationen fehlen hier jedoch weitgehend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Etablierung einer geeigneten Methodik zur Empfindlichkeitsbestimmung von *A. pyogenes*, die Ermittlung aktueller Daten zur Resistenzlage dieser Erreger im Rahmen einer größeren, repräsentativen Studie sowie die Untersuchung des genetischen Hintergrundes von Resistenzen am Beispiel der Tetracycline.

2. Schrifttum

2.1 Antimikrobielle Wirkstoffe in der Veterinärmedizin

2.1.1 Herkunft und Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe

Anfang des 20. Jahrhunderts untersuchte Paul Ehrlich die Wirkung von Farbstoffen auf Bakterien. Aus diesen Untersuchungen heraus wurden 1933 die ersten in der Humanmedizin eingesetzten antimikrobiellen Chemotherapeutika, die Sulfonamide, entwickelt (Stahlmann und Lode, 2005; Perreten, 2003). Unter antimikrobiellen Chemotherapeutika versteht man nach der ursprünglichen Definition synthetisch hergestellte antimikrobiell wirksame Produkte (Stahlmann und Lode, 2005). Antibiotika dagegen wurden zunächst als von Mikroorganismen produzierte, antimikrobiell wirksame Substanzen definiert (Stahlmann und Lode, 2005). Bereits im 19. Jahrhundert gab es Publikationen über die hemmende Wirkung von Pilzen der Art *Penicillium* auf das Wachstum von Bakterien, wobei die Relevanz dieser Beobachtung noch nicht erkannt wurde. Auch als Sir Alexander Flemming 1929 dieses Phänomen „wiederentdeckte“ und den Wirkstoff nach seinem Produzenten *Penicillium notatum* als „Penicillin“ benannte, fand seine Veröffentlichung wenig Beachtung. Erst Ende der 1930er Jahre begann eine Forschungsgruppe sich eingehender mit Penicillin zu befassen. Die industrielle Gewinnung des ersten Penicillins, Penicillin G, und damit seine therapeutische Nutzung wurde erst in den 1940er Jahren möglich (Stahlmann und Lode, 2005; Mascaretti, 2003; Perreten, 2003). In den folgenden Jahren wurde intensiv nach neuen Wirkstoffen geforscht. Kurze Zeit nach der Einführung von Penicillin in die Therapie stieß man beispielsweise bei Streptomyceten auf das erste Aminoglykosid, Streptomycin, das eine antibiotische Therapie von Infektionen mit gramnegativen Bakterien, die mit Penicillin G nicht behandelbar sind, ermöglichte. Später wurde versucht, bereits bekannte Wirkstoffe künstlich zu verbessern, beispielsweise wurde das Wirkungsspektrum von Penicillin G auf den gramnegativen Bereich erweitert, indem man ihm eine NH₂-Gruppe anhing und somit die Aminopenicilline mit dem ersten Vertreter Ampicillin kreierte (Stahlmann und Lode, 2005). Auf Grund der häufigen Veränderungen haben sich die Termini „Chemotherapeutika“ und „Antibiotika“ derart verwischt, dass sie heute oft synonym verwendet werden (Stahlmann und Lode, 2005). Im Allgemeinen versteht man daher unter dem Begriff „Antibiotika“ natürlich vorkommende, semisynthetisch oder synthetisch hergestellte Arzneimittel, die antibakteriell wirksam sind (Phillips *et al.*, 2004). Sie finden Verwendung in der Therapie, Metaphylaxe

und Prophylaxe bakterieller Infektionen bei Tier und Mensch. Darüber hinaus werden sie zur Bekämpfung einiger parasitärer Infektionen und im Bereich der Phytomedizin eingesetzt. Bis zum 1. Januar 2006 fanden sie zudem noch Verwendung als sog. „Leistungsförderer“ in der Tiermast. Derzeit sind in Deutschland 15 verschiedene Wirkstoffgruppen mit ca. 73 Wirkstoffen für verschiedene Tierarten und Indikationen zugelassen (<http://www.vetidata.de>). Mit einem Anteil von 29 % und einem Gesamtvolumen von 158 Mio. Euro bildeten Antiinfektiva im Jahre 2004 den umsatzstärksten Sektor auf dem Tierarzneimittelmarkt in Deutschland (<http://www.bft-online.de/aktuelles.htm>).

2.1.2 Entwicklung von Antibiotikaresistenzen

2.1.2.1 Definition und Mechanismen der Antibiotikaresistenz

Unter "bakterieller Resistenz" versteht man die Unwirksamkeit eines Antibiotikums gegenüber einem Bakterium. Hiervon zu unterscheiden ist das Therapieversagen, das neben der bakteriellen Resistenz eine Reihe weiterer Gründe haben kann (Richter *et al.*, 2006). Fehlende bakterielle Empfindlichkeit resultiert entweder aus den originären Eigenschaften eines Erregers (sog. „intrinsische Resistenz“, z. B. die natürliche Unempfindlichkeit von Mykoplasmen gegenüber β -Lactam-Antibiotika) oder aus dem Wirkungsverlust eines Antibiotikums gegenüber einem Bakterium, gegen das es vorher noch wirksam war (sog. „erworbene Resistenz“; Kayser, 1997; Mateu und Martin, 2000). Der Erwerb geschieht hauptsächlich auf zwei Wegen: Durch Mutationen - diese sind in der Regel stammspezifisch, werden vertikal weitergegeben und sind daher für die Ausbreitung von Resistenzen i. allg. von untergeordneter Bedeutung - oder über die Aufnahme und ggf. den Einbau "fremder" DNA (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001). Bei fachgerechtem, unter Beachtung des Wirkungsspektrums erfolgtem Einsatz von antimikrobiell wirksamen Stoffen spielt die intrinsische Resistenz keine Rolle. Die erworbene Resistenz dagegen ist für die Resistenzentwicklung von entscheidender Bedeutung, da die resistenzvermittelnden Gene häufig mit mobilen genetischen Elementen (Plasmiden, Transposons, Genkassetten und „Genomic Islands“) assoziiert sind, die über Konjugation, Transduktion oder Transformation einen Transfer zwischen verschiedenen Spezies oder Genera ermöglichen. Die wichtigsten Resistenzmechanismen, für die Resistenzgene kodieren, basieren auf Proteinen, deren primäre Funktionen die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums, die Reduktion des

intrazellulären Wirkstoffgehalts, oder der Schutz oder die strukturelle Veränderung der antibiotischen Angriffsstelle sind (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001).

Details zu Resistenzmechanismen, Resistenzgenen und mobilen genetischen Elementen, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielen, sind im Abschnitt 2.3.3. „Resistenz gegenüber Tetracyclinen“ dargestellt.

2.1.2.2 Ursachen und Bekämpfung der Antibiotikaresistenz

Bereits 1940 wiesen Chain und Abraham in *E. coli* ein Penicillin-inaktivierendes Enzym nach, welches sie Penicillinase nannten (Mascaretti, 2003). Wie dieses Beispiel zeigt, gab es bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika bereits vor der sog. „Antibiotischen Ära“. Als Ursache hierfür gilt, dass so wie *P. notatum* auch andere Mikroorganismen in der Lage sind, sich durch die Synthese bestimmter Stoffe einen selektiven Vorteil gegenüber anderen Organismen zu verschaffen, welche wiederum Strategien (Resistenzmechanismen) entwickelten, um den entstandenen Nachteil aufzuheben. Durch den breiten Einsatz von antibakteriellen Wirkstoffen stieg in den letzten Jahrzehnten der Selektionsdruck auf die Bakterienpopulationen und Resistenzgene kamen zunehmend vor (Mateu und Martin, 2000).

Im Verlauf dieser Entwicklung wurde der Resistenzlage tierpathogener Bakterien zunächst wenig Aufmerksamkeit geschenkt, da bakterieller Empfindlichkeitsverlust gegenüber Penicillin und Streptomycin (die hauptsächlich bei Erkrankungen von Tieren eingesetzt wurden) noch in den frühen 1970er Jahren als relativ selten galt (Mateu und Martin, 2000). Als Ende der 1960er Jahre ein Oxytetracyclin-Resistenzgen auf dem Plasmid eines Zoonoseerregers, *Salmonella* Typhimurium entdeckt wurde, wurden erstmals Nutztiere als Reservoir für übertragbare Antibiotikaresistenz betrachtet (Witte, 2000). Infolge dessen forderte der 1969 von der englischen Regierung in Auftrag gegebene „Swann-Report“, Antibiotika, die in der Human- oder Tiermedizin als Therapeutika Verwendung finden, nicht mehr als Wachstumsförderer einzusetzen. Dieser Empfehlung folgten die meisten EU-Staaten und entzogen einigen in der Humanmedizin eingesetzten Breitspektrumantibiotika die Zulassung als Futtermittelzusatzstoff. Als in den darauf folgenden Jahren die Anzahl therapieresistenter humanpathogener Stämme und Zoonoseerreger zunahm, wurden immer mehr antibiotische Futtermittelzusatzstoffe abgeschafft. Schweden war 1986 das erste Land, das die Anwendung von Antibiotika als Leistungsförderer generell verbot (van den Bogaard und Stobberingh, 2000; Perreten, 2003; Wegener, 2003). Wie bereits erwähnt, dürfen sie seit dem 1. Januar 2006 in der gesamten EU nicht mehr eingesetzt werden.

Die letzte Erhebung der Antibiotikaverbrauchszahlen stammt aus dem Jahr 1999. Dabei ermittelte die European Federation of Animal Health (FEDESA), dass 65 % (8528 Tonnen [t]) der in Europa verschriebenen Antibiotika in der Humanmedizin und 35 % (4688 t) in der Tiermedizin verbraucht wurden. Wie auf Grund der veränderten Gesetzeslage hinsichtlich des Verbotes einiger antibiotisch wirksamer Futtermittelzusatzstoffe zu erwarten war, reduzierte sich der Verbrauch von Leistungsförderern im Vergleich zu 1997 um 50 %, dafür stieg jedoch die Menge, die an kranke Tiere verschrieben wurde, um 11 %, nämlich von 3494 t im Jahr 1997 auf 3902 t im Jahr 1999 (<http://www.fedesa.be>). Dieselbe Korrelation konnte bereits in den 1970er Jahren beobachtet werden, als Tetracycline als Futtermittelzusatzstoffe in Großbritannien verboten wurden. Kurz nach dem Verbot stieg die Anzahl der tierärztlichen Verschreibungen von Tetracyclinen an Nutztiere an (Braude, 1978). Daher ist eine positive Korrelation zwischen dem Verbot von antibiotischen Leistungsförderern und einem Rückgang der Antibiotikaresistenz der Bakterien nur schwer zu ermitteln. Dennoch gibt es Anhaltspunkte in Form verschiedener Studien, die eine Assoziation zwischen dem Einsatz von Antiinfektiva und dem Auftreten von Resistenzen, sowie deren Transfer vom Tier zum Menschen belegen (Aarestrup, 1999), wie folgendes Beispiel zeigt: In der ehemaligen DDR wurde erstmals 1983 als Ersatz für das als Leistungsförderer verbotene Oxytetracyclin Streptothricin in der Schweinemast eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen völlig neuen Wirkstoff, der keinerlei Parallelen mit anderen Antibiotikaklassen aufwies. Zwei Jahre später konnte das erste auf einem Transposon von *E. coli* lokalisierte Gen isoliert werden, das Resistenz gegenüber Streptothricin vermittelte. Nach der Wiedervereinigung 1990 wurde der Gebrauch von Streptothricin eingestellt, trotzdem konnte dieses Gen sowohl in *E. coli*-Stämmen aus dem Magendarmtrakt von Bauern und deren Familien wie auch aus Stuhlproben und Infektionen des Urogenitaltrakts von Einwohnern derselben Region isoliert werden. Schließlich wurde dieses Gen auch in Salmonellen und Shigellen von Diarrhoe-Patienten identifiziert (van den Bogaard und Stobberingh, 2000; Witte, 2000; Aarestrup, 2005).

Bislang standen beinahe ausschließlich Nutztiere im Fokus der Diskussion über den Einsatz von Antibiotika in der Tiermedizin. In der EU leben jedoch auch ca. 70 Millionen Hunde und Katzen (Guardabassi *et al.*, 2004), zum Teil in sehr engem Kontakt zu ihren Besitzern. Die zugelassenen Wirkstoffe in der Kleintiermedizin stimmen auch auf Grund der Umwidmungsmöglichkeit zum großen Teil mit den in der Humanmedizin genutzten überein. Es gibt bisher jedoch nur wenige Studien, die Angaben zum Vorkommen von resistenten Bakterien beim Kleintier machen. Antibiotika werden hier insbesondere zur Behandlung von Haut- und Wundinfektionen, Otitiden, Cystitiden und Atemwegserkrankungen bakterieller

Ursache eingesetzt. Häufige Erreger dieser Infektionen sind Staphylokokken, die klinischen Untersuchungen zu Folge mit einer Häufigkeit von bis zu 80 % resistent gegenüber Penicillin sind (Mateu und Martin, 2001). Schwarz *et al.* (1998) untersuchten u. a. die Resistenzrate von Staphylokokken-Isolaten von Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen gegenüber Tetracyclin. Von den caninen Stämmen waren 26,9 % (N = 232), von den Katzenstämmen 100 % (N = 8), vom Meerschweinchen 29,2 % (N = 24) und vom Kaninchen 17,2 % (N = 58) der Staphylokokken resistent gegenüber Tetracyclin. Werckenthin *et al.* (2001) verglichen verschiedene Studien aus verschiedenen Ländern, die in den Jahren 1986-1995 durchgeführt wurden und das Resistenzmuster von *Staphylococcus intermedius* aus Infektionen von Hund und Katze untersuchten. Auch hier wiesen die Erreger häufig eine Unempfindlichkeit gegenüber Penicillin und Tetracyclin auf, wohingegen sie gegenüber den meisten anderen Antibiotika sensibel waren. Bordetellen vom Hund gelten hingegen als weitgehend empfindlich gegenüber den bei Atemwegsinfektionen hauptsächlich eingesetzten Antibiotika Penicilline, Tetracycline und Fluorchinolone (Mateu und Martin, 2000).

Erst seit den 1990er Jahren werden Fluorchinolone in der Kleintiermedizin verwendet. Gleichzeitig besitzen sie in der Humanmedizin einen hohen Stellenwert als Notfallmedikament gegenüber multiresistenten Bakterienstämmen, weshalb ihrer Resistenzrate bei Bakterien von Hund und Katze besondere Aufmerksamkeit geschenkt wird. Meunier *et al.* (2004) untersuchten zwischen 1994 und 2001 die Verteilung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) als Maß für die Empfindlichkeit gegenüber Marbofloxacin von *E. coli* aus Cystitiden, *Pasteurella multocida* aus Atemwegsinfektionen und *Staphylococcus intermedius*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Isolaten aus Dermatitisen und Otitiden von Hund und Katze aus sechs verschiedenen europäischen Ländern. Dabei ergab sich innerhalb der Bakterienpopulation kein Unterschied in der MHK-Verteilung gegenüber Marbofloxacin im Vergleich zu der Zeit vor der Einführung des Medikaments 1995. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes konnte kein Anstieg der Resistenzrate innerhalb der Bakterienpopulation festgestellt werden.

Ebenfalls im Fokus der aktuellen Untersuchungen steht die Resistenzlage von Zoonoseerregern von Kleintieren. Methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme vom Hund wurden bisher in den USA, Großbritannien, Kanada, Südkorea und den Niederlanden isoliert (Guardabassi *et al.*, 2004), vancomycinresistente Enterokokken (VRE) konnten sowohl bei Hunden als auch Katzen detektiert werden (van den Bogaard und Stobberingh, 2000; Guardabassi *et al.*, 2004). Vancomycin stellt in der Humanmedizin ein wichtiges Reserveantibiotikum zur Therapie von MRSA dar.

Alle bisher angeführten Studien sind jedoch nur als Momentaufnahmen zu verstehen. Um sich ein wirklichkeitstreuere Bild über die aktuelle Resistenzlage und Resistenzentwicklung pathogener Bakterien sowohl vom Nutz- als auch vom Hobbytier machen zu können, bedarf es umfassend angelegter Studien, die durch eine große Isolatzahl mit regional gleichmäßiger Verteilung, regelmäßiger Aktualisierung und etablierter Methodik die tatsächliche Resistenzentwicklung bei Erregern tierischen Ursprungs reflektieren. Solche Studien werden im Rahmen von Monitoringprogrammen umgesetzt. Den Beginn derartiger Programme stellte die seit 1978 in Schweden durchgeführte Überprüfung von Salmonellen auf ihre Resistenz hin dar (McEwen *et al.*, 2006).

2.1.3 Resistenzmonitoring

Im Jahre 2001 erarbeitete die WHO eine Strategie zur Bekämpfung der bakteriellen Resistenz und betonte die Notwendigkeit, dass diese Bekämpfung in internationaler Kooperation stattfinden müsse (WHO, 2001). Alle Länder sollen demnach genaue Aufstellungen über Abgabe und Verbrauch von Antibiotika erstellen und diese in Korrelation zu den durch Monitoringprogramme erhobenen Daten der bakteriellen Resistenz setzen (WHO, 2002). Dem schloss sich auch der Rat der Europäischen Union an und forderte seine Mitgliedsstaaten auf, „multidisziplinäre und bereichsübergreifende Strategien zu entwickeln, damit die Verbreitung der Antibiotikaresistenz eingedämmt werden kann“, und die jeweiligen erhobenen Daten miteinander zu vergleichen (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, Entschließung des Rates 1999/C 195/01, 1999).

2.1.3.1 Multinationale Monitoringprogramme veterinärmedizinisch relevanter

Bakterien

Für Infektionserreger von Tieren gibt es nur wenige länderübergreifende Monitoringprogramme. Ein Beispiel ist das „Global Salm-Surv“ (GSS), das im Jahre 2000 auf Initiative der WHO entstand (<http://www.who.int/salmsurv/en/>). Dabei handelt es sich um ein globales Netzwerk von Untersuchungseinrichtungen, die Salmonellenidentifizierung und -empfindlichkeitstestungen durchführen. Im Fokus von GSS standen bisher ausschließlich Salmonellen, in Zukunft sollen aber auch andere Zoonoseerreger wie *Campylobacter* ins Programm genommen werden. GSS ist in 138 Ländern vertreten (McEwen *et al.*, 2006).

Innerhalb der EU wurde 1998 das Monitoringprogramm „Antibiotic resistance in bacteria from animal origin“ (ARBAO) ins Leben gerufen (Monnet, 2000; Aarestrup, 2004). Dieses Monitoring wurde zwischen 1998 und 2001 als ARBAO I innerhalb verschiedener Mitgliedsstaaten durchgeführt. Untersucht wurden dabei Bakterien von Nutztieren. Bezüglich der Testdurchführung und Interpretation gab es jedoch zwischen den einzelnen Teilnehmerländern erhebliche Unterschiede. Da ein Vergleich der Ergebnisse entsprechend schwierig war, wurde nach entsprechender Angleichung der Methoden in den Jahren 2003-2005 ARBAO II durchgeführt. In dieses Projekt waren 19 Untersuchungsinstitute in 18 europäischen Staaten eingebunden (<http://www.dfvf.dk/>).

In Jahre 1999 wurde mit dem Projekt „European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals“ (EASSA) eine europaweite Studie zur Resistenzlage der Zoonoseerreger *Salmonella sp.* und *Campylobacter sp.*, sowie von *E. coli* als Indikatorbakterium (Indikatorbakterien sind bei Tieren häufig zu isolierende Erreger, die leicht Resistenzgene erwerben) initiiert. Untersucht wurden Schlachthofproben vom Fleischrind, Mastschwein und Masthähnchen aus jeweils vier europäischen Ländern, die als repräsentativ hinsichtlich des europäischen Nord-Süd-Gefälles und der damit verbundenen regionalen Unterschiede eingestuft wurden (Bywater *et al.*, 2004).

2.1.3.2. Nationale Monitoringprogramme außerhalb Deutschlands

Das erste durchstrukturierte nationale Monitoringprogramm wurde 1995 in Dänemark initiiert. Ursache war die bereits angesprochene Entdeckung von VRE, die auf den Leistungsförderer Avoparcin, der wie Vancomycin ein Glykopeptid-Antibiotikum ist, zurückgeführt wurden. Um einen dauerhaften Überblick über die Resistenzsituation innerhalb der Bakterienpopulation zu gewinnen, gab die dänische Regierung das „Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme“ (DANMAP) in Auftrag (Bager, 2000). DANMAP registriert die Abgabemenge von Antibiotika an den Menschen und an lebensmittelliefernde Tiere und setzt diese in Korrelation zu den beobachteten Resistenzen (Aarestrup, 2004). Die Ergebnisse werden seit 1997 einmal jährlich publiziert und sind online unter <http://www.dfvf.dk> abrufbar. Inzwischen gibt es eine ganze Reihe von Monitoringstudien weltweit, die sich fast ausschließlich mit Zoonoseerregern oder Indikatorbakterien auseinandersetzen. Eine Auswahl ist in Tab. 2.1 dargestellt.

Schrifttum

Tab. 2.1: Beispiele für nationale veterinärmedizinische Resistenzmonitoringprogramme im Ausland

Name bzw. Initiator	Abkürzung	Land	Etablierungs-jahr	Getestete Isolate incl. Herkunft	Besondere Anmerkungen	Online-Verfügbarkeit	Referenzen
Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme	DANMAP	Dänemark	1995	Indikatorbakterien, Zoonoseerreger, tierpathogene Erreger aus Mensch, Nutztier und Lebensmitteln	Neben der Empfindlichkeitstestung von Bakterien werden auch Zahlen zur Antibiotikaabgabemenge erhoben und mit den Resistenzdaten korreliert	http://www.dfvf.dk	Aarestrup <i>et al.</i> , 1998 Bager, 2000 Aarestrup, 2004 McEwen <i>et al.</i> , 2006
National Antimicrobial Resistance Monitoring System	NARMS	USA	1996	<i>Campylobacter</i> , Salmonellen, <i>E. coli</i> O157 von Mensch und Tier Shigellen, Listerien, <i>Salmonella typhi</i> vom Menschen Salmonellen, <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , Enterokokken von Fleischwaren	NARMS ist eine Kollaboration aus den wichtigsten US-amerikanischen Instituten zur Lebensmittelüberwachung und Tiergesundheit	http://www.fda.gov/cvm/index/narms/narms_pg.html	Homepage Aarestrup, 2004 McEwen <i>et al.</i> , 2006
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments	AFSSA	Frankreich	k. A.	Salmonellen vom Tier Bakterielle Krankheitserreger vom Rind	AFSSA besteht aus zwei getrennten Netzwerken: Das erste untersucht nicht-menschliche zoonoseauslösende Salmonellenstämme, das zweite ist multizentrisch aufgebaut und untersucht ausschließlich pathogene Bakterien des Rindes		Martel <i>et al.</i> , 2000
Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring	JVARM	Japan	1999	Zoonoseerreger und Indikatorbakterien von gesunden Nutztieren Pathogene Erreger von kranken Tieren		http://www.nval.go.jp/taisei/etaisei/ho nbun.htm	Esaki <i>et al.</i> , 2004
Veterinary and Agrochemical Research Centre	VAR	Belgien	k. A.	Salmonellen von allen lebensmittelliefernden Tieren		http://www.var.fgov.be/reports_eng.php	Aarestrup, 2004 McEwen <i>et al.</i> , 2006

Schrifttum

Tab. 2.1: Beispiele für nationale veterinärmedizinische Resistenzmonitoringprogramme des Auslands (Fortsetzung)

Name bzw. Initiator	Abkürzung	Land	Etablierungs- jahr	Getestete Isolate incl. Herkunft	Besondere Anmerkungen	Online- Verfügbarkeit	Referenzen
Red de Vigilancia de Resistencias Antibióticas en Bacterias de Origen Veterinario	VAV	Spanien	1996	Erreger von Mensch und Tier <i>E. coli</i> - und <i>Enterococcus faecium</i> - Isolate von gesunden Schweinen Salmonellen von Geflügelschlachthöfen			Moreno <i>et al.</i> , 2000
Italian Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program	ITAVARAM	Italien	2003	Salmonellen von lebensmittelliefernden Tieren und vom Menschen Verschiedene Krankheitserreger vom Tier			Anonymus, 2004
Norwegian Monitoring Program for Antimicrobial Resistance in the Veterinary and Food Production Sectors	NORM-VET	Norwegen	2000	Mastitiserreger vom Rind "Winter-Ulcus"-Erreger vom Lachs Indikatorbakterien aus den Faeces von Rind und Schaf sowie vom Rindfleisch Zoonoseerreger von Schaf und Geflügel	Kontrolliert auch den Antibiotikaeinsatz in der Human- wie Veterinärmedizin, sowie in Aquakulturen		Norm und Norm-Vet, 2002
Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring	SVARM	Schweden	2000	Pathogene Erreger, Zoonoseerreger, Indikatorbakterien aller wichtigen lebensmittelliefernden Tiere	Schweden testet bereits seit 1978 Salmonellen vom Tier	http://www.sva.se	Aarestrup , 2004 McEwen <i>et al.</i> , 2006
Monitoring of Antimicrobial Resistance Usage in Animals in The Netherlands	MARAN	Niederlande	2002	Zoonoseerreger von Mensch und Tier Kommensale vom Tier (<i>E. coli</i> und Enterokokken)	Sammelt Daten zum Antibiotikaeinsatz in der Nutztierindustrie		Mevius und van Pelt, 2002
Department of Environment, Food and Rural Affairs		Großbritannien	k. A.	Pathogene Erreger, Zoonoseerreger, Indikatorbakterien von Rind, Schaf und Schwein	Daten werden in regionalen Untersuchungsämtern erhoben und jährlich vom Department of Enviroment, Food and Rural Affairs online veröffentlicht	http://www.defra.gov.uk/animalh/diseases/zoonoses/index.htm	McEwen <i>et al.</i> , 2006

k. A.: Keine Angabe

2.1.3.3 Monitoringprogramme in Deutschland

Im Jahre 2001 wurde das "German Resistance Monitoring"-Projekt (GermVet) vom ehemaligen Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) initiiert. Aus dem BgVV entstanden 2002 zwei neue Bundesbehörden, das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) sowie das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (Schröter und Wallmann, 2003). Träger des GermVet-Projekts ist heute das BVL. Dessen Intention liegt in der Testung bakterieller Infektionserreger vom Nutztier, um über die bisher wenig untersuchte Verbreitung resistenter veterinärpathogener Bakterien Aufschluss zu erlangen und durch Langzeitbeobachtung Veränderungen hinsichtlich der Empfindlichkeit der Erreger frühzeitig zu erkennen.

Komplementär dazu gibt es seit 2003 das GermVet-Projekt des Bundesverbands für Tiergesundheit e.V. (BfT). Dessen Ziel ist die Empfindlichkeitstestung ausgewählter pathogener Bakterien von Kleintier und Pferd sowie die Testung einiger Erreger von Rind und Schwein, die vom BVL-GermVet-Projekt nicht erfasst werden. Im Rahmen des BfT-GermVet-Projekts entstand die vorliegende Arbeit.

Vor Beginn des eigentlichen BVL-GermVet-Projekts wurde 2001 zunächst eine Pilotstudie durchgeführt, in der typische Mastitiserreger (*E. coli*, Staphylokokken, bestimmte Streptokokken) des Rindes sowie *Pasteurella multocida* und *Mannheimia haemolytica* aus Atemwegsinfektionen des Schweines untersucht wurden. Um zu gewährleisten, dass die untersuchten Isolate einer repräsentativen Stichprobe der in Deutschland vorkommenden natürlichen Bakterienpopulation entsprechen, mussten einige Faktoren bei der Planung berücksichtigt werden. Es wurden nur Erreger aus antibiotisch nicht vorbehandelten Infektionen getestet, um eine durch Antibiotikaeinsatz möglicherweise erfolgte Selektion der Erreger auszuschließen. Des Weiteren wurde auf die regionale und zeitliche Verteilung der Probenahme geachtet, um eventuelle Schwankungen erfassen zu können. An der Sammlung der Isolate beteiligten sich 39 Untersuchungseinrichtungen, die Testung aller Proben wurde vom ehemaligen BgVV mittels Bouillonmikrodilution nach den Angaben des Dokumentes M31-A2 vom „Clinical Laboratory and Standards Institute“ (CLSI, 2002) durchgeführt. Bei der Auswahl der zu testenden Antibiotika wurden zum einen Leitsubstanzen berücksichtigt, um pharmakologische Gruppen mit möglichst einem Wirkstoff abdecken zu können, zum anderen achtete man darauf, auch antimikrobielle Wirkstoffe zu verwenden, die in der Humanmedizin eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass die Resistenzrate der hierbei getesteten Isolate wesentlich geringer war, als zunächst erwartet wurde. Auch im Vergleich zu den

europäischen Nachbarländern waren die überprüften Erreger empfindlicher gegenüber den getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen (Wallmann *et al.*, 2003 a; Wallmann *et al.*, 2003 b). Das BVL-GermVet-Projekt wurde in den vergangenen Jahren auf Erreger aller der Lebensmittelgewinnung dienenden Tierarten (außer Pferd) incl. Taube, Süßwassernutzfisch und Geflügel ausgedehnt und umfasst gegenwärtig 56 Indikationen (d. h. eine definierte Erregergruppe aus einem definierten Organsystem).

Das BfT-GermVet-Projekt untersucht seit 2004 ergänzend zum BVL-GermVet-Projekt 31 Indikationen von Kleintieren, Pferd, Rind und Schwein, soweit diese von der BVL-Studie nicht berücksichtigt wurden (s. Tab. 2.2). Das BfT-GermVet-Projekt stellt insofern ein Novum dar, als es bisher weltweit noch kein Monitoringprogramm gibt, das Krankheitserreger der Hobbytiere in diesem Maße berücksichtigt.

Die Wirkstoffauswahl wurde bezüglich der Leitsubstanzen nach denselben Kriterien durchgeführt, die auch beim BVL-GermVet-Projekt ausschlaggebend waren. In die Testung wurden jedoch ausschließlich für die Tiermedizin zugelassene Wirkstoffe einbezogen, insgesamt werden Empfindlichkeiten gegenüber 24 Antibiotika getestet (s. Material und Methoden).

Es wurde geplant, im Laufe von zwei Jahren von jeder Indikation 100 Bakterienisolate im Rahmen einer Einmalerhebung zu testen. Die Isolate müssen hinsichtlich ihrer Herkunft denselben Kriterien entsprechen wie die vom BVL-GermVet getesteten Erreger. Die Empfindlichkeitsprüfungen werden von drei Institutionen durchgeführt (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität [FU] Berlin, Institut für Tierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft [FAL] Braunschweig und Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität [LMU] München). Die Empfindlichkeitstestung erfolgt mittels Bouillonmikrodilution nach CLSI-Dokument M31-A2 (2002).

Schrifttum

Tab. 2.2: Im BfT-Germvet-Projekt untersuchte Indikationen

Tierart	Organ / -system	Erreger
Rind	Urogenitaltrakt	<i>E. coli</i> <i>Arcanobacterium (A.) pyogenes</i>
	Nabelinfektion / Septikämie	<i>A. pyogenes</i>
	<hr/>	
Schwein	Urogenitaltrakt / Mastitis-Metritis-Agalaktie (MMA) -Syndrom	<i>E. coli</i> koagulasepositive Staphylokokken (incl. <i>S. hyicus</i>) β-hämolysierende Streptokokken
	ZNS / Bewegungsapparat	<i>Streptococcus (St.) suis</i> <i>A. pyogenes</i>
	Haut	koagulasepositive Staphylokokken (incl. <i>S. hyicus</i>) <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
	<hr/>	
Pferd	Respirationstrakt	<i>St. equi</i> <i>Actinobacillus equuli</i>
	Genitaltrakt	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> β-hämolysierende Streptokokken
	<hr/>	
Hund/Katze	Respirationstrakt	koagulasepositive Staphylokokken β-hämolysierende Streptokokken <i>Pasteurella multocida</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>E. coli</i>
	Urogenitaltrakt	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> β-hämolysierende Streptokokken
	Haut/Ohr/Maulbereich	koagulasepositive Staphylokokken β-hämolysierende Streptokokken <i>Pasteurella multocida</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
	Gastrointestinaltrakt	<i>E. coli</i>
	<hr/>	

2.2 Methoden der *In-vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung

Antibiotika beeinflussen die Vermehrungsfähigkeit eines Bakteriums. Diese vorhandene oder, im Falle eines resistenten Erregers, nicht vorhandene Empfindlichkeit kann *in-vitro* mittels verschiedener Methoden bewertet werden.

Man unterscheidet im Wesentlichen zwei Vorgehensweisen zur Empfindlichkeitsbestimmung: Die Reihenverdünungsverfahren, bei denen die sog. „Minimale Hemmkonzentration“ (MHK) ermittelt wird, und die Agardiffusion (sog. „Plättchentest“). Eine Kombination dieser beiden Techniken stellt der E-Test dar (Schwarz *et al.*, 2003).

2.2.1 Agardiffusion

Bei der Agardiffusion diffundiert das Antibiotikum aus einem Filterpapierplättchen in einen Agar. Dadurch entwickelt sich innerhalb des Agars ein Konzentrationsgefälle des Antibiotikums, was nach Beimpfung des Agars mit einer Bakteriensuspension und anschließender Inkubation eine als „Hemmhof“ sichtbare bakterielle Wachstumsinhibition zur Folge hat. Die Größe des Hemmhofdurchmessers (HHD) variiert je nach Empfindlichkeit des Erregers, d. h. sehr sensible Bakterien besitzen einen sehr großen, resistente dagegen einen sehr kleinen bis gar keinen HHD. Die Größe des HHD erlaubt bei Vorliegen geeigneter Grenzwerte (siehe unten) eine Einteilung in „resistent“, „sensibel“ oder „intermediär“. Die Agardiffusion besitzt den Vorteil, schnell und einfach durchführbar zu sein. Nachteilig sind die aufwändige Standardisierung der Testung sowie die rein qualitative Aussagefähigkeit. Der Plättchentest erlaubt keine Quantifizierung bezüglich der Wirkstoffkonzentration, die im Tier bzw. im erkrankten Organ erreicht werden muss, um eine effiziente Erregerbekämpfung zu gewährleisten (Schwarz *et al.*, 2003).

2.2.2 Methoden zur Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration

Unter MHK versteht man die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums in Mikrogramm/Milliliter ($\mu\text{g/ml}$), bei der das bakterielle Wachstum sichtbar gehemmt wird. Werden 50 % der Isolate bei einer bestimmten Konzentration gehemmt, wird dies als MHK_{50} bezeichnet, sind es 90 % als MHK_{90} . An Hand dieser beiden Termini lässt sich eine

allgemeine Aussage bezüglich der Resistenzlage einer Bakterienpopulation machen (Davison *et al.*, 2000).

Zwischen MHK und HHD besteht eine umgekehrte Proportionalität. Isolate mit einer hohen MHK besitzen einen kleinen HHD und Isolate mit einer niedrigen MHK einen großen HHD.

Um der einfach und schnell durchführbaren Methodik der Agardiffusion auch eine quantitative Aussagemöglichkeit zu geben, wurden Versuche unternommen, diese Korrelation in mathematische Regressionsgleichungen umzusetzen. Alle auf diese Art berechneten Formeln sind jedoch mit einer hohen Fehlerquote behaftet und daher abzulehnen. Der Hauptgrund hierfür ist, dass der HHD eine eindeutige Messgröße ist, die MHK dagegen ein Intervall mehrerer Konzentrationsstufen eines Antibiotikums (Schwarz *et al.*, 2003). Dies bedeutet, dass ein Isolat, das bei einer Konzentration von 8 µg/ml des Wirkstoffs noch Wachstum zeigt, bei 16 µg/ml jedoch nicht mehr, zwar einen ermittelten theoretischen MHK-Wert von 16 µg/ml besitzt, die "wahre MHK" aber zwischen >8 und ≤ 16 µg/ml liegt (CLSI, 2002). So ist auch nachvollziehbar, dass zwei Isolate mit derselben MHK nicht zwangsläufig denselben HHD besitzen (Schwarz *et al.*, 2003).

Wie bereits erwähnt, ist der E-Test eine Kombination aus Agardiffusion und Reihenverdünnung, die ebenfalls der MHK-Ermittlung dient. Wie bei der Agardiffusion diffundiert hier der Wirkstoff in den Agar und inhibiert damit das bakterielle Wachstum. Im Unterschied zum Plättchentest ist jedoch keine definierte Wirkstoffmenge auf ein Plättchen, sondern ein Konzentrationsgradient des Antibiotikums auf einem Teststreifen aufgetragen, wodurch sich ein Konzentrationsgefälle um den Streifen herum im Agar bildet. Das Bakterienwachstum wird daher nicht wie bei der Agardiffusion kreisrund, sondern ellipsoid gehemmt. Die MHK wird mittels einer Skalierung auf dem Teststreifen an der Stelle abgelesen, an der das sichtbare Bakterienwachstum auf den Streifen trifft.

Der E-Test spielt in der Routinediagnostik nur bei schwer kultivierbaren Erregern (z. B. Anaerobiern) eine Rolle, da er einen hohen Kostenaufwand verursacht. Auch sind nicht alle Wirkstoffe/Wirkstoffkombination kommerziell erhältlich (Schwarz *et al.*, 2003).

Neben dem E-Test gibt es zwei weitere Möglichkeiten, die MHK eines Erregers gegenüber einem bestimmten Antibiotikum zu eruieren: Dies ist zum einen die Bouillon-, zum anderen die Agardilution. In beiden Fällen wird eine Verdünnungsreihe des antibiotischen Wirkstoffes, zumeist im Verhältnis 1:2, angefertigt. Bei der Bouillondilution wird der Wirkstoff in einer definierten Nährbouillon gelöst und in mehreren Stufen verdünnt, bei der Agardilution geschieht dasselbe in einem definierten Agar (CLSI, 2002; Schwarz *et al.*, 2003).

2.2.2.1 Agardilution

Bei der Agardilution ist das Antibiotikum in binär logarithmischen (\log_2)-Verdünnungsstufen in einem Agar enthalten. Jede Agarplatte einer Verdünnungsreihe entspricht dabei einer Konzentrationsstufe. Bei dem Agar handelt es sich nach CLSI-Vorgaben (2002) um Müller-Hinton-Agar (MHA). Dieser kann zur Testung von anspruchsvollen Bakterien, die auf reinem MHA nicht wachsen, mit 5 % defibriniertem Schaf-, Kaninchen-, Rinder- oder Pferdeblut versetzt werden.

Zunächst wird eine Bakteriensuspension in isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) angefertigt, deren optische Dichte dem McFarland-Standard 0,5 (McF 0,5) entspricht. Bei photometrischer Messung soll die optische Dichte bei 625 Nanometern (nm) zwischen 0,08 und 0,1 ($OD_{625} = 0,08-0,1$) liegen. Die Bakteriendichte einer derart adjustierten Suspension liegt nach Angaben des CLSI-Dokuments M31-A2 (2002) bei ca. 10^8 koloniebildenden Einheiten/Milliliter (10^8 KBE/ml). Die Suspension kann sowohl direkt von 24 Stunden alten Kolonien angefertigt werden als auch mit Bakterien, die in einem Medium bis zur gewünschten Dichte inkubiert wurden (Wachstumsmethode). Die Suspension wird daraufhin 1:10 verdünnt, und in einer Größenordnung von 1 μ l auf die Agaroberfläche mittels Replikator, Standardimpföse oder Pipette übertragen. Die Bebrütung erfolgt 16-20 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C. Bei kapnophilen Bakterien ist auch Bebrütung bei 3-5 Volumenprozent (Vol %) Kohlenstoffdioxid (CO_2) zulässig, allerdings ist mittels Referenzstämmen eine Einflussnahme des CO_2 auf den pH-Wert der Agaroberfläche zu kontrollieren.

Die MHK ist hier die geringste Konzentration eines Wirkstoffs, die eine Koloniebildung umfassend verhindert, einzelne Kolonien bleiben dabei unberücksichtigt.

Die Agardilution ist sehr aufwendig und spielt in der Routinetestung nur bei solchen Bakterien eine Rolle, bei denen mit keiner anderen Methode eine Empfindlichkeitstestung durchführbar ist (s. Tab. 2.3) Da sie jedoch als Referenzmethode gilt, nimmt sie innerhalb der Methodenetablierung für Resistenzteste eine zentrale Rolle ein (CLSI, 2002).

2.2.2.2 Bouillondilutionsverfahren

Bei den Bouillondilutionsverfahren unterscheidet man die Mikro- und die Makrodilution. Bei der Bouillon-Makrodilution liegt die Antibiotikadilution im Reagenzglas in einem großen Volumen, bei der Mikrodilution dagegen in Mikrotiterplatten in einem kleinen Volumen vor.

Das Prinzip ist jedoch bei beiden gleich: Ein Wirkstoff wird, zumeist im Verhältnis 1:2, einer Reihenverdünnung unterzogen. Danach wird eine bestimmte Menge einer Bakteriensuspension mit standardisierter Dichte in eine Nährbouillon pipettiert. Dieses sog. „Inokulum“ wird anschließend der Antibiotikaverdünnung zugegeben. Nach Bebrütung des Ansatzes ist bakterielles Wachstum durch die Trübung des Mediums zu erkennen, in der Mikrotiterplatte äußert sich diese durch die sog. „Knopfbildung“.

In der Routinediagnostik und auch bei Monitoringprogrammen spielt die Bouillonmakrodilution keine Rolle, da deren Anfertigung zu aufwendig ist. Die für die Mikrodilution benötigten Mikrotiterplatten sind kommerziell erhältlich, wobei die antibiotische Verdünnungsreihe bereits in lyophilisierter Form in den 96-Loch-Platten enthalten und vom Hersteller geprüft ist.

In der Routinediagnostik sind die Mikrotiterplatten oft so konfiguriert, dass pro Wirkstoff nur die Konzentrationen um die Grenzwerte für „empfindlich“, „intermediär“ und „resistent“ enthalten sind, was als sog. „Breakpointmethode“ bezeichnet wird (Schwarz *et al.*, 2003). Zusätzlich können noch Kreuzresistenzen verschiedener Wirkstoffklassen in Form von Stellvertretersubstanzen (z. B. Tetracyclin für Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Doxycyclin) berücksichtigt werden (Werckenthin *et al.*, 2005). Für Monitoringstudien werden in der Regel weitere Konzentrationsbereiche überprüft, um genauere Aussagen über MHK-Werte und eine Resistenzentwicklung schon innerhalb der empfindlichen Bakterienpopulation treffen zu können.

2.2.3 Normen und Grenzwertproblematik

Zur Beurteilung der Ergebnisse der einzelnen Verfahren sowie zu deren Durchführung stehen verschiedene Normen zur Verfügung. Die wichtigste Vorschrift zur Empfindlichkeitsmessung veterinärmedizinisch relevanter Bakterien ist das Dokument M31-A2 des US-amerikanischen CLSI (2002), da es als einzige Norm Angaben über tierpathogene Erreger macht und weltweit anerkannt ist. In Europa sind die sechs wichtigsten Institutionen, die Normen bezüglich Empfindlichkeitstestung und Grenzwerte herausgeben das „Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie“ (CA-SFM) in Frankreich, die „Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen“ (CRG) in den Niederlanden, die „NWGA“ in Norwegen, die „Swedish Reference Group of Antibiotics“ (SRGA), das „Deutsche Institut für Normung e.V.“ (DIN), sowie die „British Society for Antimicrobial Chemotherapy“ (BSAC) in Großbritannien. Seit 1997 gibt es in Europa Bestrebungen, die verschiedenen nationalen

Institutionen auf europäischer Ebene im „European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing“ (EUCAST) zusammenzuführen, und damit unter Berücksichtigung der nationalen Interessen die Durchführung der Empfindlichkeitstestungen und vor allem die Grenzwertfestlegung zu harmonisieren (Kahlmeter *et al.*, 2003).

In Deutschland wird in der Veterinärmedizin bei internationalen Forschungsprojekten oder Resistenzstudien in der Regel nach den Vorgaben des CLSI-Dokuments M31-A2 (2002) vorgegangen. Auch in der Routinediagnostik ersetzt es mittlerweile häufig die bisher verwendete, humanmedizinisch orientierte Norm DIN 58940 (2000). Es gibt in Deutschland jedoch keine Vorschrift darüber, mittels welcher Durchführungsverfahren die Empfindlichkeitsmessung von Bakterien zu erfolgen hat. Die jeweiligen Normen machen unterschiedliche Angaben bezüglich erforderlicher Bakterienmenge, Testmedien und technischer Durchführung der Empfindlichkeitstestung. Eine Einteilung der Bakterien in resistant, sensibel oder intermediär darf deshalb nur nach den Kriterien erfolgen, die in der Norm angegeben werden, nach der auch die Testung durchgeführt wurde. Unter dem Begriff „sensibel“ versteht das CLSI (2002) eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Wirkstoffkonzentration, die zur Inhibition der Bakterien nötig ist, im betroffenen Organismus auch erreicht werden kann. Dies wiederum ist abhängig von der Pharmakodynamik des Agens. „Resistent“ dagegen sind die Bakterien, deren MHK gegenüber einem bestimmten Antibiotikum so hoch ist, dass der zur Bakterienabtötung bzw. -wachstumshemmung notwendige Wirkstoffspiegel im Tier bei nach „*lege artis*“ erfolgter Dosierung auf keinen Fall erreicht werden kann. In der Grauzone dazwischen liegen die „intermediären“ Erreger. Der intermediäre Bereich ist vor allem als Pufferzone zu verstehen, um Bakterien auf Grund von kleineren technischen Problemen nicht als falsch resistant („major error“) oder falsch sensibel („very major error“) einzustufen.

Für diese Einteilung werden die sog. „Grenzwerte“ herangezogen, die von der jeweiligen Norm erhoben wurden. Die Grenzwerte der einzelnen Antibiotika zwischen den verschiedenen Normen variieren zum Teil erheblich. Ursache für diese Diskrepanzen ist die bereits angesprochene unterschiedliche methodische Durchführung sowie die unterschiedliche Bezugnahme der Normen. Die oben genannte DIN-Norm orientiert sich in der Bewertung der nach ihr ermittelten Ergebnisse ausschließlich an Wirkstoffkonzentrationen, die in der Humanmedizin am Zielort erreicht werden können. Da sich Pharmakokinetik und -dynamik häufig nicht vom Menschen auf Tiere übertragen lassen, resultiert dies in potentiell falschen Grenzwerten und damit als Konsequenz in als falsch resistant oder als falsch sensibel bewerteten Krankheitserregern.

Einige der im CLSI-Dokument M31-A2 (2002) veröffentlichten Werte wurden inzwischen angepasst bzw. ergänzt und 2004 im CLSI-Dokument M31-S1 veröffentlicht. In diesem finden sich einige Vorschläge bezüglich der zu testenden Antibiotika innerhalb der Routineempfindlichkeitsbestimmung von Krankheitserregern des Nutztieres, Empfehlungen zur Testung einiger anspruchsvoller Organismen sowie Grenzwerte für einige veterinärmedizinisch bedeutsame Bakterien, wobei die Angaben der Grenzwerte einiger Wirkstoffe tierartspezifisch erfolgen. Bei Antibiotika, für die keine tierartspezifischen Grenzwerte existieren, werden auch Grenzwerte aus der Humanmedizin übertragen. Gleichzeitig werden in dem Dokument sowohl die in dem jeweiligen Organ zu erwartende Wirkstoffkonzentration, als auch der Erreger selbst berücksichtigt. So liegt beispielsweise bei respiratorischen Infektionen des Hundes der Grenzwert für Resistenz gegenüber Enrofloxacin von allen Erregern bei $\geq 4 \mu\text{g/ml}$, bei Atemwegerkrankungen des Rindes ausgelöst durch *Pasteurella multocida* dagegen bei $\geq 2 \mu\text{g/ml}$.

Da im Ergänzungsdokument M31-S1 (2004) viele veterinärmedizinisch relevante Bakterien nicht berücksichtigt sind, ist die MHK-Ermittlung mittels Bouillonmikrodilution prinzipiell zu bevorzugen. Ihr Vorteil ist, dass sie eine quantitative Aussage macht und es daher ermöglicht, unter Berücksichtigung der Pharmakodynamik eines Medikaments, einen Therapieerfolg bei fehlenden Grenzwerten zumindest abschätzen zu können (Schwarz *et al.*, 2003). Nachteilig sind der im Gegensatz zur Agardiffusion größere Arbeitsaufwand, sowie die fehlende Flexibilität bezüglich der untersuchten Wirkstoffe.

2.2.4 Bouillonmikrodilution nach den Vorgaben des CLSI-Dokumentes M31-A2 (2002)

Wie bei der Agardilution wird zunächst eine Bakteriensuspension in NaCl angefertigt, deren Dichte der des McF 0,5 entsprechen soll. Da im Inokulum eine Bakteriendichte von ca. 5×10^5 KBE/ml einzuhalten ist, wird empfohlen, 50 μl der Suspension in 10 ml des Testmediums zu geben.

Als Testmedium sieht das CLSI (2002) für schnellwachsende, unkomplizierte Bakterien wie *Escherichia (E.) coli*, Pseudomonaden oder Staphylokokken die Müller-Hinton-Bouillon (MHB) vor. Dieses Medium ist kommerziell erhältlich und weitgehend standardisiert, d. h. es kommen im Chargenvergleich üblicherweise nur geringe Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung vor. Zudem weist es einen niedrigen Gehalt an Substanzen auf, die Sulfonamide, Trimethoprim und Tetracycline hemmen. Die MHB muss kationenadjustiert sein (d. h. sie muss eine Konzentration von 20 bis 25 Milligramm [mg] Kalzium

[Ca²⁺]/Liter [1] und 10 bis 25 mg Magnesium [Mg²⁺]/l aufweisen), da es sonst zu falschen Ergebnissen bei der MHK-Ermittlung von Tetracyclinen bei allen Bakterien und zu falschen Ergebnissen bei der Empfindlichkeitsprüfung von *Pseudomonas (P.) aeruginosa* gegenüber Aminoglykosiden kommen kann. Die kationenadjustierte Müller-Hinton-Bouillon (CaMHB) ist ebenfalls käuflich zu erwerben.

Für die Testung von anspruchsvolleren Bakterien dürfen Blut oder Blutbestandteile der CaMHB zugegeben werden. Für hochanspruchsvolle Bakterien wie hämophile Bakterien empfiehlt das CLSI die Verwendung von „Veterinary fastidious medium“ (VFM). Dabei handelt es sich um CaMHB, der neben lysiertem Pferdeblut (IPb) noch Supplement C™ (BD Diagnostics), ein Hefeextrakt, zugegeben wird. Von den CLSI-Dokumenten M31-A2 (2002) und M31-S1 (2004) berücksichtigte Erreger, für die zur MHK-Ermittlung mittels Bouillonmikrodilution Zusätze nötig sind, sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Die MHK ist bei der Bouillonmikrodilution als die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes definiert, bei der rein visuell kein bakterielles Wachstum mehr feststellbar ist. Sie kann bei schnell wachsenden Spezies beispielsweise nach 16 bis 20 Stunden aerober Inkubation abgelesen werden.

Da in dieser Arbeit ausschließlich nach den Vorgaben der CLSI-Dokumente M31-A2 (2002) und M31-S1 (2004) vorgegangen wurde, beziehen sich alle Angaben bezüglich technischer Durchführung und Interpretation ebenfalls auf diese Dokumente.

Tab. 2.3: Notwendige Modifikationen von Standardmethoden zur Empfindlichkeitstestung von hochanspruchsvollen und „Problem-Bakterien“ nach den CLSI-Dokumenten M31-A2 (2002) und M31-S1 (2004)

Erreger	Methode	Medium	Inkubation
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Bouillonmikrodilution	bei Testung von Sulfonamiden und Trimethoprim CaMHB unter Zugabe von Thymidin Phosphorylase	18-24 Stunden (h)/ 35 °C/aerob
<i>Histophilus somni</i>	Agardilution/Agardiffusion/ Bouillonmikrodilution	Chocolate (Kochblut) MHA bzw. VFM	20-24 h/35 °C/5-7 Vol% CO ₂
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Bouillonmikrodilution	VFM	20-24 h/35 °C/5-7 Vol% CO ₂
<i>Campylobacter sp.</i>	Agardilution	MHA mit 5 % defibriniertem Schafsblut	38 h/36 °C 42 h/24 °C beides bei 10 Vol% CO ₂ , 5 Vol% Sauerstoff (O ₂) und 85 Vol% Stickstoff (N ₂) oder mikroaerophile Umgebung
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bouillonmikrodilution	CaMHB + IPb (2-5 %)	20-24 h/35 °C
<i>Listeria sp.</i>	Bouillonmikrodilution	CaMHB + IPb (2-5 %)	18 h /35 °C
<i>Pasteurella multocida</i>	Bouillonmikrodilution	CaMHB	20-24 h/35 °C
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Agardiffusion	MHA + 5 % Schafblut	20-24 h/35 °C

2.3 Arcanobacterium pyogenes

2.3.1 Taxonomie

Arcanobacterium pyogenes gehört in der Familie der *Actinomycetaceae* zum Genus *Arcanobacterium*.

Das Genus *Arcanobacterium* wurde 1982 von Collins neu eingeführt, da sich das ehemals als *Corynebacterium haemolyticum* bezeichnete *Arcanobacterium haemolyticum* von der Typspezies des Genus *Corynebacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*, biochemisch und morphologisch zu sehr unterschied, als dass es weiter dem selben Genus angehören konnte (Collins *et al.*, 1982). Zunächst blieb *A. haemolyticum* der einzige Vertreter, während *A. pyogenes*, das bereits 1893 erstmals beschrieben (Lucet, 1893) und als *Bacillus pyogenes* bezeichnet wurde (Holth, 1908), weiterhin dem Genus *Corynebacterium* zugeordnet blieb.

Im Jahre 1982 wurde es auf Grund von physiologischen, metabolischen und biochemischen Charakteristika dem Genus *Actinomyces* (Reddy *et al.*, 1982; Collins und Jones, 1982)

angegliedert und konnte erst 1997 zusammen mit *Arcanobacterium bernardiae* (ehemals *Actinomyces bernardiae*) durch 16S rRNA-Analysen dem Genus *Arcanobacterium* zugeordnet werden (Ramos *et al.*, 1997).

Diesem Genus gehören heute neben *A. pyogenes* folgende Vertreter an: Die bereits angesprochenen humanpathogenen Spezies *A. haemolyticum* (Collins *et al.*, 1982) und *A. bernardiae* (Funke *et al.*, 1995), *A. phocae*, das erstmals bei Meeressäugetieren isoliert wurde (Ramos *et al.*, 1997), *A. pluranimalium*, welches in klinischen Proben von Hirschen und Schweinswalen entdeckt wurde (Lawson *et al.*, 2001) und *A. hippocoleae*, das von Hoyles *et al.* (2002) in Zusammenhang mit einer Vaginitis beim Pferd beschrieben wurde.

In einer bisher nur online veröffentlichten Studie wurde die Isolierung zweier neuer Spezies, *A. bialowiezense* sp. nov. und *A. bonasi* sp. nov., von Balanoposthitiden europäischer Bisonbullen publiziert (Lehnen *et al.*, 2006).

2.3.2 Morphologie, Wachstumsverhalten und biochemische Eigenschaften

A. pyogenes ist ein mit nur 0,2-0,5 x 0,6-1,9 µm im Durchmesser (Reddy *et al.*, 1982) kleines, unbewegliches und nicht sporulierendes Stäbchen (Schaal, 1986; Narayanan *et al.*, 1998). Die Zellwand von Arcanobakterien ist grampositiv, bei über 24 Stunden alten Isolatn kann sie jedoch in der Gramfärbung auch negativ erscheinen (Reddy *et al.*, 1982). Das Zellbild des Bakteriums ist nicht einheitlich gestaltet: Arcanobakterien sind pleomorph, d. h. sie können von stäbchenartiger, coryneformer oder auch kokkoider Gestalt sein, oft sind sie in V-, T- oder palisadenartiger Form angeordnet (Reddy *et al.*, 1982; Schaal, 1986).

Makroskopisch bildet *A. pyogenes* auf Blutagar glatte, zirkuläre Kolonien, die weiß bis farblos sind (Schaal, 1986). Nach 24-stündiger Inkubation in mikroaerophiler Atmosphäre sind sie stecknadelstichgroß und zeigen auf Grund der geringen Diffusionsstrecke eine noch unvollständig erscheinende Hämolyse (Funke *et al.*, 1997). Nach 48 Stunden ist der Koloniedurchmesser auf einen Millimeter angewachsen, die Hämolysezone ist jetzt als deutlich vollständig zu erkennen und im typischen Fall den doppelten bis dreifachen Koloniediameter groß (Reddy *et al.*, 1982). Die Hämolyse ist bei porcinen Stämmen zumeist stärker ausgeprägt (Jost und Billington, 2005). Als verantwortlich für die Hämolyse gilt das Cholesterin-abhängige Cytolysin Pyolysin. Dabei handelt es sich um ein extrazelluläres Toxin, das an eukaryotische Zellmembranen bindet, Poren ausbildet und damit Zelllyse verursacht (Jost und Billington, 2005). Der Erreger verfügt zudem über zahlreiche Proteasen (Jost *et al.*, 1999). Diagnostisch macht man sich diese proteolytischen Fähigkeiten von *A.*

pyogenes durch den Nachweis der Serolyse auf dem sog. „Löffler-Serum“ zu Nutze. Es handelt sich hierbei um eine für *A. pyogenes* spezifische Reaktion, die auch zur Differenzierung von anderen Arcanobakterien herangezogen werden kann.

A. pyogenes ist in der Lage Biofilme auszubilden (Olson *et al.*, 2002). Dabei handelt es sich um einen Verbund der Mikroorganismen auf einer festen oder flüssigen Oberfläche, der von einer organischen Matrix umgeben ist. Durch die multizelluläre Struktur der Biofilme sind die Erreger widerstandsfähiger gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen und Phagozytose. Biofilme spielen daher eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von persistierenden und chronischen Infektionen (Jost und Billington, 2005).

Arcanobakterien sind vom metabolischen Standpunkt aus gesehen aerotolerante Anaerobier (Reddy *et al.*, 1982), d. h. sie lassen sich zwar aerob anzüchten, ihr Stoffwechsel ist jedoch streng fermentativ. Die Endprodukte ihres Kohlenhydratabbaus sind demzufolge Laktat, Succinat, Acetat und Formiat, nicht jedoch CO₂ (Reddy *et al.*, 1982). Daher sind sie bezüglich ihrer Nährmedien auf fermentierbare Zucker angewiesen.

Reddy *et al.* (1982) wiesen in Deletionsversuchen nach, dass eine Supplementierung der Nährbouillon mit Hämin (Eisen(III)-Protoporphyrin oder Häm; prosthetische Gruppe von Proteinen wie Myoglobin, Hämoglobin, Katalase, Peroxidase und Cytochrom *c* [Stryer, 1999]) und HCO₃⁻ für die Vermehrung dieser Bakterien notwendig ist, obgleich sich beide Zusätze zu einem gewissen Grad substituieren. Um gutes Bakterienwachstum zu erreichen, wird empfohlen, dem Nährmedium Blut oder Serum zuzugeben (Guérin-Faublée *et al.*, 1993 b), sowie die Inkubationsatmosphäre mit CO₂ oder das Medium mit HCO₃⁻ anzureichern (Schaal, 1986).

In den Tabellen 2.4 und 2.5 sind die für *A. pyogenes* wichtigsten biochemischen und metabolischen Eigenschaften bzw. die für diese Spezies typischen Charakteristika zusammengefasst.

Tab. 2.4: Wichtige biochemische und metabolische Charakteristika von *A. pyogenes*

Biochemische/enzymatische Eigenschaften	Angaben nach Reddy <i>et al.</i>, 1982¹ und Schaal, 1986	Prozentzahl positiver Reaktionen nach API² Coryne-Testsystem, Fa. BioMérieux
Katalase	- ³	0
Nitratreduktion	-	0
Nitritreduktion	-	0
Urease ⁴	-	0
α -Glucosidase	-	94
Alkalische Phosphatase	-	65
β -Glucuronidase	d	100
β -Galactosidase	d	91
<i>N</i> -Acetyl- β -Glucosaminidase	+	41
Hydrolyse von		
Esculin	negativ	0
Gelatine ⁴	+	88,3
Fermentation⁴		
Glucose	+	100
Glycogen	+	11
Lactose	+	91
Ribose	+	100
Maltose	d	97
Mannose	d	0
Xylose	d	100
Saccharose	-	50

Legende:

+ : mind. 90 % sind positiv

- : höchstens 10 % sind positiv

d : 11 - 89 % sind positiv

¹Reddy führte alle Versuche, die zu den hier dargestellten Ergebnissen führten, ausschließlich anaerob durch

²API = „Analytical Profile Index“

³Laut Reddy ist bisher nur von einem katalasepositiven Stamm berichtet worden

⁴Reaktionen laufen im API Coryne-Testsystem unter anaeroben Bedingungen ab

Schrifttum

Tab. 2.5: Biochemische und metabolische Differenzierung innerhalb des Genus *Arcanobacterium* (Angaben nach Hoyles *et al.*, 2002)

	<i>A. hippocoleae</i>	<i>A. bernardiae</i>	<i>A. haemolyticum</i>	<i>A. phocae</i>	<i>A. pyogenes</i>
Fermentation von					
D-Arabitol	-	d	-	-	-
Glykogen	-	d	-	+	d
Laktose	+	-	+	-	+
Pullulan	-	+	-	-	-
Ribose	-	+	d	d	d
Saccharose	-	-	d	+	d
D-Xylose	-	-	-	d	+
Hydrolyse von					
Gelatine	-	d	-	-	+
Hippurat	+	-	-	-	d
Produktion von					
Saure Phosphatase	-	-	+	+	-
Alanylphenylalanin- prolinarylamidase	-	+	+	+	+
β -Glucuronidase	+	-	d	-	+
Pyrazinamidase	-	+	+	+	-
Pyrolydonylaryl- amidase	-	d	d	+	+
Phosphoamidase	+	-	-	-	-

Legende:

+ : mind. 90 % sind positiv

- : höchstens 10 % sind positiv

d : 11 - 89 % sind positiv

2.3.3 Klinische Bedeutung von *A. pyogenes* in der Human- und Veterinärmedizin

A. pyogenes ist ein obligater Schleimhautbewohner des Respirations- und Urogenitaltrakts der Haustiere (Nattermann und Horsch, 1977; Jost *et al.*, 2005). Bei Rind und Schwein besiedelt es zudem die Pansen- bzw. Magenschleimhäute (Narayanan *et al.*, 1998; Jost *et al.*, 2002). Auch bei einem Vogel konnte es isoliert werden (Trinh *et al.*, 2002).

Auf Grund seiner weiten Verbreitung beim Rind stand *A. pyogenes* bereits Ende des 19. Jahrhunderts im Fokus zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen (Nattermann und Horsch, 1977) und schon 1908 wurde eine erste Literaturübersicht über das Vorkommen des Erregers beim Rind publiziert (Holth, 1908). Auch heute hat *A. pyogenes* weltweit pathogene Bedeutung bei purulenten Entzündungen landwirtschaftlicher Nutztiere (Schaal, 1986;

Lämmler, 1990; Yoshimura *et al.*, 2000; Trinh *et al.*, 2002), bei denen es als einer der häufigsten opportunistischen Infektionserreger gilt (Jost und Billington, 2005).

Bei Rind, Schwein, Ziege, Schaf und Kaninchen ist es an eitrig abszedierenden Entzündungen, insbesondere Arthritiden, Endometritiden und Bronchopneumonien (Guérin-Faubleé *et al.*, 1993 b; Yoshimura *et al.*, 2000; Jost *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2005) beteiligt.

Nattermann und Horsch (1977) wiesen den Erreger in 28,8 % von 2130 klinischen Proben von Rindern nach. Dabei handelte es sich um Untersuchungsmaterial aus Schwanzphlegmonen, Abszessen, Epiphysiolysen, Leberabszessen, Panaritien, abortierten Feten und Eihäuten bei Nachgeburtsverhalten. Zusammen mit Streptokokken sind hauptsächlich Arcanobakterien für Endokarditiden beim Rind verantwortlich (Gründer, 2002). Beim Hausrind und Büffel spielen sie zudem eine wichtige Rolle als Ursache für postpartale Endometritiden. Dabei handelt es sich zumeist um Mischinfektionen mit *E. coli*, *Fusobacterium (F.) necrophorum* und *Bacteroides sp.* (Cohen *et al.*, 1996; Jadon *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005). Folgen des gestörten Puerperiums sind eine verminderte Konzeptionsrate und damit eine verlängerte Zwischenkalbezeit (Williams *et al.*, 2005).

In Koinefektion mit *F. necrophorum* verursacht *A. pyogenes* zudem Leberabszesse beim Rind. Beide Bakterien wirken dabei synergistisch, indem *F. necrophorum* die wirtseigenen Leukozyten zerstört und damit die Bindegewebsinvasion von *A. pyogenes* ermöglicht, während *A. pyogenes* Botenstoffe sezerniert, die wiederum Wachstum und Invasivität von *F. necrophorum* stimulieren (Roberts, 1967). Daher kann *A. pyogenes* trotz der primären Verantwortlichkeit von *F. necrophorum* in 90 % der Fälle aus Leberabszessen isoliert werden, welche in US-amerikanischen „feedlots“ (Rindermastbestände) erhebliche finanzielle Verluste nach sich ziehen (Jost *et al.*, 2004). Kasari *et al.* (1988) berichteten ebenfalls von einer Mischinfektion dieser beiden Erreger in Zusammenhang mit einer septischen Arthritis, assoziiert mit einer Osteomyelitis der distalen Zehenglieder eines Rindes. Auch bei einer Antilopenart (Blau- oder Rotfußducker) sind *F. necrophorum* und *A. pyogenes* gemeinsam aus Abszessen des Gesichts- und Unterkieferbereichs isoliert worden (Roeder *et al.*, 1989).

Bei den Hauswiederkäuern sowie beim Schwein sind Arcanobakterien als Erreger von purulenten Mastitiden (Lämmler, 1990; Lämmler und Hartwig, 1995), den „Pyogenes-Mastitiden“ von besonderer Bedeutung. Beim Rind sind aus epidemiologischen und pathogenetischen Gründen zwei getrennte Formen bekannt: Die sporadisch auftretende *Mastitis apostematosa* der Kühe und die enzootisch auftretende „Sommermastitis“ der Färsen und Jungrinder, die auch als „Holsteinische Euterseuche“, „böartige Euterseuche“, „Weideseuche“, „Fliegenstich“ oder „Einstich“ bekannt ist. Bei ersterer handelt es sich um

eine chronische, eitrig-abszedierende Mastitis, die sekundär im Endstadium von Mastitiden oder Zitzenverletzungen auftreten kann. Die „Sommermastitis“ zeigt sich als purulente Galaktophoritis und Mastitis, welche enzootisch verläuft, und bei deren Entstehung Weideinsekten als Vektoren fungieren (Lämmler und Hartwig, 1995). Beiden Formen gemeinsam ist, dass es sich meist um Mischinfektionen mit anaeroben Bakterien handelt (Lämmler und Hartwig, 1995).

Bei Hunden und Katzen konnte *A. pyogenes* gelegentlich aus Otitiden und Cystitiden isoliert werden (Billington *et al.*, 2002 a). Gulbahar und Gurturuk (2002) berichteten von einer Mischinfektion mit Mycoplasmen, die bei einem Katzenwelpen mit Pyothorax diagnostiziert wurde.

A. pyogenes wurde außerdem in Zusammenhang mit einer purulenten Arthritis bei einer katalonischen Gemse (Lavin *et al.*, 1998) und bei intrakranialen Abszessen vom nordamerikanischen Weißwedel- oder Virginiahirsch (Baumann *et al.*, 2001) beschrieben. Bei dieser Tierart partizipiert es außerdem mit *Fusobacterium* sp. an der Necrobacillose (Chirino-Trejo *et al.*, 2003).

Obgleich *A. pyogenes* beim Menschen bisher nicht als Kommensale bekannt ist (Funke *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1998), gibt es dennoch einige Berichte über humane Infektionen mit dem Erreger, hauptsächlich aus dem ruralen Raum. Dabei scheinen ebenso wie bei der Sommermastitis des Rindes v. a. Stechfliegen eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von *A. pyogenes* zu spielen (Coyle und Lipsky, 1990). So wurde der Erreger zwischen 1979 und 1980 in einer ländlichen Region im Osten Thailands in Zusammenhang mit einem endemischen Ausbruch von Beinulcera bei 495 Schülern zwischen sieben und vierzehn Jahren isoliert. Auf jedem Ulkus konnten dabei kleine Fliegen entdeckt werden (Kotrajaras *et al.*, 1982; Kotrajaras und Tagami, 1987). Hierbei soll es sich laut Coyle und Lipsky (1990) um orientalische Augenfliegen gehandelt haben, die bereits vorhandene kleine Läsionen an den Beinen der Kinder (die vermutlich beim Spielen in der Umgebung entstanden) mit Arcanobakterien infizierten, was zudem eine Sekundärbesiedelung mit Staphylo- und Streptokokken nach sich zog (Kotrajaras *et al.*, 1982; Kotrajaras und Tagami, 1987; Coyle und Lipsky, 1990).

Generell scheinen *A. pyogenes*-Infektionen beim Menschen eine gewisse Vorschädigung des Wirtes vorauszusetzen. So wurde in einer dänischen Studie in den Jahren 1968 bis 1992 bei elf Patienten mit Entzündungsprozessen *A. pyogenes* nachgewiesen, acht der Patienten hatten bereits schwere Vorerkrankungen wie Prostata- oder Zervikalkarzinome (Gahrn-Hansen und

Frederiksen, 1992). *A. pyogenes* verursachte hier z. T. in Koinfektion mit anderen Erregern Abszesse, Otitiden, Cystitiden und Cholecystitiden bis hin zur Septikämie.

Barnham berichtete 1988 von einer Patientin, die, ebenfalls aus einem ländlichen Bezirk stammend, an einem Kolonkarzinom erkrankte und nach einer Uteruscurettage eine Bakteriämie mit *A. pyogenes* entwickelte. Lynch *et al.* beschrieben 1998 eine septische Arthritis, die bei einem diabetischen Farmer auftrat.

2.3.4 Empfindlichkeitstestung und bekannte Resistenzen

Trotz der klinischen Relevanz gibt es für *A. pyogenes* auf Grund seiner in der Literatur beschriebenen allgemeinen Penicillinempfindlichkeit (Schaal, 1986; Guérin-Faubleé *et al.*, 1993; CLSI, 2002) bisher kein evaluiertes Verfahren zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillonmikrodilution.

Auch andere Methoden der Empfindlichkeitsmessung sind für dieses Bakterium entweder nicht etabliert oder führen - wie die Agardiffusion - bedingt durch die geringe Größe und langsame Vermehrungsrate von Arcanobakterien zu keinem verlässlichen Ergebnis (Arvidson *et al.*, 1981), weshalb das CLSI (2002) diese Methode bei Arcanobakterien ausdrücklich verwirft und zur Durchführung der Bouillonmikrodilution rät. Das Dokument M31-A2 (CLSI, 2002) enthält aber keinerlei Empfehlungen bezüglich Nährmedium oder Inkubationsbedingungen.

Hinsichtlich der Resistenzlage von Arcanobakterien finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Dies ist zum einen auf die unterschiedlichen untersuchten Populationen selbst zurückzuführen, zum anderen auf die verschiedenen Methoden der Empfindlichkeitstestung, die neben Agar- und Bouillonmikrodilution – als Supplemente wurden 2 % FKS (Olson *et al.*, 2002), 1 % Tween 80 (Fernández *et al.*, 2001) und 2 % (Billington *et al.*, 2002 b) bzw. 5 % (Krabisch, persönliche Mitteilung, Tiergesundheitsdienst [TGD] Bayern, 2004) IPb verwendet – auch die Agardiffusion miteinschlossen. Guérin-Faubleé *et al.* (1993 a) ermittelten die MHK von 103 Arcanobakterien mittels Agardilution. Außerdem stellten sie Vergleiche zwischen Agardiffusion und Agardilution an. Bei der Interpretation der Ergebnisse stimmten Agardiffusion und Agardilution hinsichtlich der qualitativen Aussage in 98,8 % der Fälle überein. Dabei zeigten 0,7 % einen „major error“ und 0,5 % einen „very major error“. Die als „falsch sensibel“ interpretierten Messwerte entstanden ausnahmslos bei der Testung von Tetracyclin, weshalb hier die MHK in nur 84,5 % der Testungen mit dem Ergebnis der Agardiffusion übereinstimmte. Außerdem

konnten keine Korrelationen zwischen Hemmhofdurchmesser (HHD) und MHK gefunden werden; bei allen getesteten Antibiotika war der HHD größer, als es die MHK erwarten ließ.

Olson *et al.* (2002) untersuchten die Empfindlichkeit von aus Arcanobakterien gebildeten Biofilmen. Dabei waren die als Einzelzellen frei in einem flüssigen Nährmedium ("planktonartig") vorliegenden Bakterien sensibel gegenüber Tetracyclin, Penicillin G, Cloxacillin, Streptomycin, Ceftiofur, Ampicillin und Oxytetracyclin, der Biofilm aus den gleichen Bakterien dagegen hoch resistent gegenüber allen getesteten Antibiotika. Dahingehend ist möglicherweise auch die Untersuchung von Hirvonen *et al.* (1994) zu deuten, die bei experimentell mit *A. pyogenes* ausgelösten Mastitiden von Rindern trotz sofortiger Therapie mit Penicillin G keine Heilung erzielen konnten.

Nach Schaal in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) besitzen Arcanobakterien grundsätzlich eine Sensibilität gegenüber den bereits angesprochenen Penicillinen, außerdem gegenüber Cephalosporinen, Tetracyclinen, Macroliden und Vancomycin. Bei Mischinfektionen oder Penicillinunverträglichkeit werden in der Literatur Makrolidantibiotika (CLSI, 2002) und Tetracycline (Quinn *et al.*, 1994; Morck *et al.*, 1998) empfohlen. Gleichzeitig gelten Makrolid- und Tetracyclinresistenz als weit verbreitet (Aarestrup, 2006). Die Tabelle 2.6 gibt einen Überblick über die in der Literatur veröffentlichten MHK-Werte wichtiger, in Deutschland in der Veterinärmedizin zugelassener Wirkstoffe.

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen
(Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie	
β-Lactame	Amoxicillin	0,25	0,25	0,25	5	BMD	suppl. mit 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001	
		≤ 0,03	0,06	≤ 0,03 - 0,06	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a	
		≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996	
	Amoxicillin/ Clavulansäure	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996	
		Ampicillin	≤ 0,016	0,023	≤ 0,016 - 0,032	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
			≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125	20	AD	MHA	Rind/ Deutschland	von Buchholz, 1985
	0,025		0,05	≤ 0,012 - 0,05	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
	0,025		k. A.	≤ 0,012 - 0,05	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
	Cefoperazon	0,12	0,12	0,06 - 0,25	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a	
		≤ 0,125	≤ 0,125	≤ 0,125 - 0,25	20	AD	MHA	Rind/Deutschland	von Buchholz, 1985	
	Ceftiofur	≤ 0,06	0,125	≤ 0,06 - 0,25	22	AD	Columbia Agar-3%Pb	Rind/ k. A.	Sheldon <i>et al.</i> , 2004	
		0,78	1,56	0,39 - 1,56	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
0,78		k. A.	0,78 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000		

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
β-Lactame	Cloxacillin	0,2	0,2	0,05 - 0,039	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		0,2	k. A.	0,1 - 0,39	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Penicillin	≤ 0,016	≤ 0,016	≤ 0,016	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		0,5	0,5	0,008 - 0,5	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/ Frankreich	Guérin-Faubleé, 1993 a
		≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996
		< 0,012	0,25	< 0,012 - 0,05	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		< 0,012	k. A.	< 0,012 - 0,05	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
Penicillin G (MHK in IE/ml)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	10	AD	MHA	Rind/ Deutschland	Endres, 1983	
Makrolide/ Lincosamide	Clindamycin	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	16	AD	MHA	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996
		≤ 0,06	>64	≤ 0,06 - >64	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002
	Erythromycin	≤ 0,016	≤ 0,016	≤ 0,016	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
Makrolide/ Lincosamide	Erythromycin	≥ 64	≥ 64	≤ 0,1 - ≥ 64	10	AD	MHA	Rind/Deutschland	Endres, 1983
		0,008	0,25	0,008 - 0,25	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		≤ 0,03	≥ 128	≤ 0,03 - ≥ 128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
		≤ 0,06	≥ 64	≤ 0,06 - ≥ 64	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002
		0,025	0,025	≤ 0,012 - 0,025	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		0,025	k. A.	0,025 - >100	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Lincomycin	≤ 0,12	≤ 0,12	≤ 0,12	16	AD	MHA	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		16	16	k. A.	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		≤ 0,03	64	≤ 0,03 - 128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
		0,1	0,1	≤ 0,012 - 0,2	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		0,1	k. A.	0,05 - >100	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		Spiramycin	≤ 0,03	64	≤ 0,03 - ≥ 128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich
0,125	0,25		0,06 - 0,25	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996	

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
Makrolide/ Lincosamide	Tilmicosin	0,05	0,05	≤ 0,012 - 0,05	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		0,05	k. A.	0,05 - ≥ 100	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Tylosin	0,8	12,5	0,1 - 50	9	BMD	k. A.	Rind/USA	Narayanan <i>et al.</i> , 1998
		≤ 0,06	≥ 64	≤ 0,06 - ≥ 64	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002
Aminoglykoside	Dihydrostreptomycin	25	≥ 100	0,39 - 100	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		50	k. A.	0,78 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Gentamicin	1,5	3	1,5 - 3	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		2	2	2	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		0,5	1	0,25 - 1	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faubleé, 1993
	Kanamycin	1	16	0,5 - 16	20	AD	MHA	Rind/ Deutschland	von Buchholz, 1985
		1,56	1,56	0,2 - 100	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		0,78	k. A.	0,39 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Kanamycin	0,5	8	0,5 - 8	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
Aminoglykoside	Kanamycin	4	4	1 - 4	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
	Spectinomycin	0,25	0,25	0,12 - 2	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
		≥ 128	≥ 128	0,25 - ≥ 128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
Fluorchinolone	Enrofloxacin	0,78	0,78	0,39 - 0,78	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		1,5	2	1 - 2	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/ Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		1	1	bis 1	10	AD	MHA-0,001% NAD	Rind/Kanada	Prescott und Yielding, 1990
		1	1	1	22	AD	Columbia Agar-3%Pb	Rind/ k. A.	Sheldon <i>et al.</i> , 2004
		0,78	k. A.	0,39 - 1,56	7	BMD	CaMHB-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
Chloramphenicol-gruppe	Chloramphenicol	2	2	1 - 2	10	AD	MHA	Rind/ Deutschland	Endres, 1983
		4	4	4	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/ Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		1	1	0,5 - 4	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
		0,5	0,5	0,25 - 8	16	AD	k. A.	Rind/ Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996
		1,56	1,56	0,39 - 1,56	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
Chloramphenicol-gruppe	Chloramphenicol	1,56	k. A.	0,78 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Florfenicol	0,5	0,5	0,25 - 0,5	16	AD	MHA	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		1,56	1,56	0,78 - 1,56	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		1,56	k. A.	0,78 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
	Thiamphenicol	1,56	1,56	0,78 - 1,56	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
		1,56	k. A.	0,39 - 1,56	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000
Sulfonamidhaltige Antibiotika	Sulfadoxin/ Trimethoprim	≥ 32	≥ 32	≥ 32	10	AD	MHA	Rind/Deutschland	Endres, 1983
	Sulfisoxazol	64	64	64	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
	Sulfonamid	≥ 512	≥ 512	≥ 512	20	AD	MHA	Rind/Deutschland	von Buchholz, 1985
	Trimethoprim	0,5	0,5	0,5	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		8	64	4 - 128	20	AD	MHA	Rind/Deutschland	von Buchholz, 1985
	Trimethoprim/ Sulfadimidin/ Sulfathiazol	≥ 512	≥ 512	64 - ≥ 512	20	AD	MHA	Rind/Deutschland	von Buchholz, 1985

Schrifttum

Tab. 2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung: Legende s. S. 37)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie	
Tetracycline	Chlor-tetracyclin	50	50	1,6-50	9	BMD	k. A.	Rind/USA	Narayanan <i>et al.</i> , 1998	
		0,12	8	≤ 0,06 - 32	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002	
		16	32	0,5 - 32	20	AD	MHA	Rind/ Deutschland	von Buchholz, 1985	
	Doxycyclin	≥ 128	≥ 128	0,25 - ≥ 128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a	
		3,13	12,5	0,05 - 12,5	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
		12,5	k. A.	0,1 - 12,5	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
	Oxytetracyclin	Oxytetracyclin	32	32	16 - 32	10	AD	MHA	Rind/ Deutschland	Endres, 1983
			0,25	0,5	0,125 - 1	16	AD	k. A.	Rind/Finnland	Jousimies-Somer <i>et al.</i> , 1996
			25	100	0,4 - 100	9	BMD	k. A.	Rind/USA	Narayanan <i>et al.</i> , 1998
			16	32	0,5 - 32	22	AD	Columbia Agar-3%Pb	Rind/?	Sheldon <i>et al.</i> , 2004
0,25			8	≤ 0,06 - ≥ 32	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002	
6,25			25	0,2 - 25	42	AD	MHA-5%Pb	Rind/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	
12,5			k. A.	0,78 - 50	7	AD	MHA-5%Pb	Schwein/Japan	Yoshimura <i>et al.</i> , 2000	

Schrifttum

Tab.2.6: Verteilung der Minimalen-Hemmkonzentrations-Werte von *A. pyogenes* gegenüber verschiedenen Wirkstoffklassen (Fortsetzung)

Wirkstoffgruppe	Getesteter Wirkstoff	MHK ₅₀ (in µg/ml)	MHK ₉₀ (in µg/ml)	MHK-Spektrum	Anzahl getesteter Isolate	Methode	Testmedium	Herkunft der Isolate	Studie
Tetracycline	Tetracyclin	0,094	0,19	0,064 - 0,19	16	E-Test	k. A.	Weißwedelhirsch/Kanada	Chirino-Trejo <i>et al.</i> , 2003
		16	16	16	5	BMD	suppl. 1% Tween 80	Schaf/Spanien	Fernández <i>et al.</i> , 2001
		128	>128	1 - >128	103	AD	MHA-5%Pb	Wiederkäuer/ Frankreich	Guérin-Faublée, 1993 a
		0,25	16	≤ 0,06 - >16	48	BMD	CaMHB-2%Pb	Rind, Schwein, Hund, Katze, Ara/USA	Trinh <i>et al.</i> , 2002

Legende:

BMD: Bouillonmikrodilution

AD: Agardilution

k. A.: Keine Angabe

2.4 Tetracycline

2.4.1 Geschichte, Struktur und antibakterielle Wirkung von Tetracyclinen

Im Jahre 1948 wurde das erste Tetracyclin, Aureomycin (heute „Chlortetracyclin“), von Benjamin Mingo Duggar als Produkt von *Streptomyces (S.) aureofaciens* entdeckt. Kurze Zeit später fand man Oxytetracyclin bei *S. rimosus* (Mascaretti, 2003; Kühne und Mitzscherling, 2004). Tetracyclin selbst wurde 1953 entdeckt. In den 1960er und -70er Jahren wurden semisynthetische Wirkstoffe wie Minocyclin oder Doxycyclin entwickelt. Von Ersterem wurden in letzter Zeit auf Grund der zunehmenden Resistenzen neue Derivate kreiert, die einen 9-Glycylamido-Substituenten besitzen. Diese synthetisch hergestellten Analoga der Tetracycline werden als Glycylcycline bezeichnet (Chopra und Roberts, 2001; Roberts, 2003; Zhanel *et al.*, 2004). Sie besitzen dieselbe breite antimikrobielle Wirkung wie ihre Vorgänger, überwinden jedoch bakterielle Resistenzmechanismen besser. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist Tigecyclin (Zhanel *et al.*, 2004). Bisher ist jedoch noch keines dieser Derivate in Deutschland zugelassen.

Tetracycline bestehen aus vier linear kondensierten Butylringen, an die je nach Derivat unterschiedliche funktionelle Gruppen gebunden sind. Therapeutisch genutzte Derivate wie Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin, Doxycyclin oder Minocyclin unterscheiden sich dabei nur an den Ringpositionen fünf, sechs und sieben.

Tetracycline bilden mit bi- und trivalenten Kationen Komplexe, weshalb die Resorptionsmenge abhängig von der Nahrungsmittelaufnahme ist (Kroker, 1996; Chopra und Roberts, 2001; Zhanel *et al.*, 2004). Durch die Chelatbildung mit Kalzium verursachen sie Zahnverfärbungen und stören das embryonale Wachstum, weshalb sie bei tragenden Tieren bzw. schwangeren Frauen und auch bei Kindern und Jungtieren kontraindiziert sind (Kroker, 1996; Roberts, 2002; Mascaretti, 2003; Michalova *et al.*, 2004).

Die „klassischen“ Tetracycline Tetracyclin, Doxycyclin, Minocyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin gelangen bei gramnegativen Bakterien wahrscheinlich als positiv geladener Magnesium-Tetracyclin-Komplexe durch Porine (OmpC [„outer membrane protein C“] und OmpF) der äußeren Membran in den periplasmatischen Raum. Dort dissoziiert der Komplex wieder und das nunmehr freie, ungeladene und schwach lipophile Tetracyclin ist in der Lage, durch die Lipidschicht der Zytoplasmamembran zu gelangen. Auch bei grampositiven Erregern scheint es der neutrale und lipophile Zustand des Agens zu sein, der die Plasmamembran passiert. Die Aufnahme in diese geschieht über aktiven, vom pH-Gradienten

abhängigen Transport (Kroger *et al.*, 1996; Chopra und Roberts, 2001; Mascaretti, 2003; Roberts, 2003). Im Zellinneren bildet es vermutlich mit Magnesium einen Komplex und bindet reversibel an die 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Dadurch wird die Bindung von Amino-Acyl-tRNA an das Ribosom und damit die Proteinbiosynthese inhibiert. Deshalb gelten die „klassischen“ Tetracycline als bakteriostatisch (Kroger, 1996; Chopra und Roberts, 2001; Mascaretti, 2003; Zhanel *et al.*, 2004).

Es gibt jedoch auch Tetracycline, die bakterizid sind. Diese werden als „atypische Tetracycline“ bezeichnet und beinhalten die Wirkstoffe Chelocardin, Anhydrotetracyclin, 6-Thiatetracyclin und Anhydrochlortetracyclin (Chopra, 1994; Roberts, 1996; Zhanel *et al.*, 2004). Bei diesen interagiert das Agens nicht mit dem Ribosom, sondern mit der Zytoplasmamembran, was zu einem gestörten Stoffaustausch und damit zum Untergang der Zelle führt (Chopra, 1994; Roberts, 1996; Zhanel *et al.*, 2004). Da die Wirkstoffe starke zytotoxische Nebenwirkungen haben, sind die atypischen Tetracycline in Europa nicht zugelassen (Michalova *et al.*, 2004).

2.4.2 Einsatzmöglichkeiten von Tetracyclinen

Auf Grund ihrer selektiven Wirkung (Tetracycline besitzen eine nur schwache Affinität zu den 80S-Ribosomen von Eukaryoten, wohingegen sie sich in den meisten Bakterienzellen stark anreichern [Roberts, 1996; Chopra und Roberts, 2001; Roberts, 2003]) und des breiten Wirkspektrums wurden Tetracycline als erste Wirkstoffgruppe mit dem Terminus „Breitspektrumantibiotika“ versehen (Roberts, 1997; Mascaretti, 2003). Sie stehen heute hinter den Penicillinen an zweiter Stelle der am häufigsten eingesetzten Antibiotika weltweit (Roberts, 2002); ihr Anteil an den bei Nutztieren angewandten Antibiotika in der EU 1997 betrug 67 % (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Kühne und Mitzscherling, 2004).

Neben ihrer Aktivität gegenüber einer Vielzahl grampositiver und -negativer Bakterien sind sie auch gegen Chlamydien, Mycoplasmen und Rickettsien wirksam (Chopra und Roberts, 2001; Mascaretti, 2003). Dem entsprechend werden sie in der Veterinärmedizin zur Behandlung von gastrointestinalen, respiratorischen, dermalen, urogenitalen und zentralnervösen Infektionen bis hin zu Sepsis eingesetzt.

Auch mit dem Scrapie-assoziierten Prion-Protein PrP^{Sc}, das als das für BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) und vCJD (neue Variante Kreuzfeld-Jakob-Disease) verantwortliche Agens gilt, scheinen Tetracycline zu interagieren. Forloni *et al.* (2002) beobachteten bei *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen eine herabgesetzte Resistenz des PrP^{Sc}

gegenüber Protease und eine verminderte Akkumulation der Prionen im Gehirn. Dies führte dazu, dass die mit Tetracyclin simultan behandelten PrP^{Sc}-infizierten Versuchstiere zum einen eine verlängerte Inkubationsphase hatten und zum anderen bei einem Drittel der Tiere bei niedriger Infektionsdosis kein Ausbruch der Krankheit feststellbar war. In diesem Kontext sei auch auf die anti-amyloidogene Wirkung von Tetracyclin und Doxycyclin *in-vitro* hingewiesen, was sie zukünftig in der Behandlung der Alzheimer-Krankheit interessant werden lassen könnte (Forloni *et al.*, 2001). Bei Minocyclin stellte man in Zusammenhang mit der Parkinson-Krankheit einen protektiven Effekt bezüglich der Degeneration dopaminerger Neurone fest (Du *et al.*, 2001).

Auch bei der Therapie von Magengeschwüren spielen Tetracycline auf Grund der zunehmenden Resistenz von *Helicobacter pylori* gegenüber den als Standardtherapie eingesetzten Antibiotika Clarithromycin und Methronidazol eine immer wichtiger werdende Rolle (Chopra und Roberts, 2001; Ribeiro *et al.*, 2004).

Aktuelle Bedeutung erlangte v. a. Doxycyclin durch seine Wirksamkeit gegen *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* und *Bacillus anthracis*, Erreger, die als potentielle biologische Waffen gelten (Roberts, 2005).

Zudem können sie gegen Protozoen wie *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica (insbesondere zur Prophylaxe; bei Infektion mit mefloquinonresistenten *P. falciparum* ist es das Mittel der Wahl [Roberts, 2002]), *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis* und *Toxoplasma gondii* eingesetzt werden (Chopra und Roberts, 2001). Auch Infektionen mit Nematoden können scheinbar mit Tetracyclinen bekämpft werden (Roberts, 2002). Die Mechanismen der antiparasitären Wirksamkeit von Tetracyclinen sind noch nicht geklärt. Bei *P. falciparum* wird die Affinität des Agens zu den mitochondrialen 70S Ribosomen hypothetisiert. Andere Parasiten besitzen jedoch keine Mitochondrien, dennoch sind Tetracycline bei ihnen wirksam (Chopra und Roberts, 2001; Roberts, 2002). Berichte über tetracyclinresistente Protozoen wurden bislang noch nicht publiziert.

Die Glycylcycline könnten in der Zukunft eine wichtige Rolle bei der Behandlung von schwer bis nicht behandelbaren Erregern wie methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)- und *S. epidermidis* (MRSE)-Stämmen, penicillinunempfindlichen Isolaten von *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) und vancomycinresistenten Enterokokken (VRE) spielen, gegen die sie *in-vitro* wirksam sind (Zhanel, *et al.*, 2004).

Tetracycline besitzen neben ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit auch antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften, indem sie die Antikörperproduktion in Plasmazellen

senken und die Phagozytoseaktivität polymorphkerniger Leukozyten reduzieren. Zudem inhibieren sie die Chemotaxis von Leukozyten und beeinträchtigen die Lipase- und Kollagenaseaktivität. Daher können sie auch bei rheumatischer Arthritis, Psoriasis, gangränisierender Pyodermie, Pleuralergüssen, rezidivierendem Pneumothorax und Thyreoidalzysten angewandt werden (Roberts, 1996).

Kurz nach ihrer Entdeckung wurde 1948 die wachstumsstimulierende Wirkung von Tetracyclinen bei Schweinen und Masthähnchen festgestellt, was den Beginn ihres Einsatzes als „Leistungsförderer“ bedeutete. Auf Grund der in den 1960er Jahren einsetzenden Diskussion über die Anwendung von Antibiotika in der Tiermast wurde 1978 ein EU-weites Verbot der Verwendung von Tetracyclinen als Futtermittelzusatzstoffe erlassen (Kühne, 2004). In den USA werden sie jedoch noch heute als Wachstumsförderer und zur Prophylaxe in der Tierzucht eingesetzt (Schwarz und Chaslus-Dancla, 2001; Jost *et al.*, 2003). Oxytetracyclin findet dort Verwendung bei Hühnern, Rindern, Bienen, Lachsen und Welsen. Mittlerweile übersteigt die von der US-amerikanischen Futtermittelindustrie eingesetzte Menge von Antibiotika die der Humanmedizin. Auch bakterielle Erkrankungen von Nutzpflanzen werden mit Oxytetracyclin bekämpft (Roberts, 1996).

2.4.3 Resistenz gegenüber Tetracyclinen

Bakterieller Resistenz gegenüber Tetracyclin liegen zumeist erworbene Resistenzgene zu Grunde (Mascaretti, 2003). Vor den 1950er Jahren war so gut wie keine Resistenz gegen Tetracyclin feststellbar, lediglich 2 % von 433 Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, die in den Jahren 1917 bis 1954 gesammelt worden waren, wiesen eine Unempfindlichkeit auf (Hughes und Datta, 1983). Im Jahre 1953 wurde das erste tetracyclinresistente Bakterium, *Shigella dysenteriae*, entdeckt. Die erste multiresistente *Shigella*-Art fand man 1955. Sie wies Resistenzen gegenüber Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol auf. Dies entsprach einem Anteil von 0,02 % von 5327 getesteten Isolaten. Bei einer Untersuchung aus dem Jahre 1960 in Japan lag der Anteil dieser multiresistenten Stämme bereits bei 10 % (Watanabe, 1963). In den 1970er und -80er Jahren stellte man einen Anstieg der Tetracyclinresistenz bei *Enterobacteriaceae*, Staphylokokken, Streptokokken, *Bacteroides spp.* und *Neisseria gonorrhoeae* fest (Roberts, 2002). Zwischen 1988 und 1993 waren in einer Studie 60 % der *Shigella flexneri*-Isolate multiresistent gegenüber Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol, dieselbe Kombination, die bereits bei der ersten multiresistenten *Shigella*-Spezies festgestellt worden war (Roberts, 1996). Als in den 1960er

Jahren multiresistente *Shigella dysenteriae* näher untersucht wurden, stellte man fest, dass der resistente Phänotyp bei Kokultivierung mit empfindlichen Stämmen auf diese übertragbar war (Watanabe, 1963). Dies war der erste Hinweis auf die schon angesprochene erworbene Resistenz, vermittelt durch Tetracyclinresistenzgene, die sog. *tet*-Gene.

2.4.3.1 Resistenzmechanismen

Im Wesentlichen gibt es zwei Mechanismen bakterieller Resistenz gegenüber Tetracyclinen: Ribosomale Schutzproteine, die die Bindung des Agens an das bakterielle Ribosom unterbinden, und Effluxproteine, die für ein Ausschleusen des Tetracyclins aus der Bakterienzelle sorgen. Verantwortlich hierfür sind die sog. Tet-Proteine, die von den *tet*-Genen kodiert werden (s. Tab. 2.8 und 2.9).

Des Weiteren gibt es bislang drei *tet*-Gene (s. Tab. 2.10), die für die enzymatische Inaktivierung von Tetracyclinen verantwortlich sein sollen. Bisher ist deren tatsächliche Funktionsfähigkeit aber noch unbestätigt (Speer *et al.*, 1991; Diaz-Torrez *et al.*, 2003; Chopra und Roberts, 2003). Auch mutationsvermittelte (über Punktmutationen [Ross *et al.*, 1998] bzw. Basenaustausch [Michalova *et al.*, 2004]) Tetracyclinresistenzen sind bei *Propioni acnes* und *Helicobacter pylori* beschrieben worden.

Der Mechanismus des spezifischen Efflux aus der Bakterienzelle wurde erstmals 1971 (Franklin und Snow, 1971) beschrieben. Wie aus Tabelle 2.8 zu entnehmen ist, sind aktuell 23 *tet*-Gene bekannt, die für Effluxproteine kodieren. Beim Ausschleusen von Tetracyclinen handelt es sich um aktiven, energieabhängigen Transport (Roberts, 2005), wobei das Tet-Protein in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist und im Austausch gegen ein Proton den Magnesium-Tetracyclin-Komplex aus der Zelle pumpt (Roberts, 1996; Michalova *et al.*, 2004; Roberts, 2005). Alle Effluxproteine (Ausnahme Tet B) vermitteln Resistenz gegenüber Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin und Doxycyclin, nicht aber gegenüber Minocyclin und den Glycylcyclinen (Chopra und Roberts, 2003).

Bezüglich der Regulation der *tet*-Gene gibt es Unterschiede zwischen grampositiven und gramnegativen Organismen (Michalova *et al.*, 2004). Bei gramnegativen Bakterien besteht die Tetracyclinresistenz vermittelnde Determinante aus zwei Genen, einem Strukturgen, das für das Effluxprotein kodiert, und einem Regulatorgen. Die Funktion beider ist von der Anwesenheit von Tetracyclin abhängig. In Abwesenheit des Antibiotikums bindet das vom Regulatorgen kodierte Repressorprotein an den Operator des Strukturgens, wodurch dessen Transkription verhindert wird. Befindet sich jedoch der Magnesium-Tetracyclin-Komplex in

der Zelle, bindet sich dieser an das Repressorprotein (dafür genügen schon Tetracyclinkonzentrationen im nanomolaren Bereich), welches daraufhin seine Konfiguration ändert und vom Operator des Strukturgens dissoziiert. Dies hat die Synthese des Effluxproteins zur Folge. Die Synthese endet, wenn der Tetracyclinegehalt in der Zelle soweit gesunken ist, dass der Regulator wieder an den Operator bindet (Roberts, 1996; Chopra und Roberts, 2003; Michalova *et al.*, 2004). Die Eigenschaft der Induzierbarkeit eines *tet*-Gens durch Repressorproteine findet sich bei in grampositiven Bakterien vorkommenden Effluxgenen nur bei *tet(Z)* und *tet(33)* (Tauch *et al.*, 2000; Tauch *et al.*, 2002).

Von den für Tetracycline spezifischen Effluxsystemen sind die unspezifischen Multi-Drug Transporter zu unterscheiden. Diese sind in der Lage, mehrere Klassen von Antibiotika aus der Zelle zu schleusen, unter anderem auch Tetracycline (Butaye *et al.*, 2003), weswegen sie insbesondere bei gramnegativen Bakterien eine wichtige Rolle innerhalb des Resistenzgeschehens spielen (Michalova *et al.*, 2004).

Der Resistenzmechanismus des ribosomalen Schutz wurde erstmals 1986 bei Streptokokken beschrieben (Burdett, 1986). Aktuell sind elf Gene bekannt, die für ribosomale Schutzproteine kodieren (s. Tab. 2.9). Im Gegensatz zu den meisten Effluxproteinen vermitteln sie auch Schutz gegenüber Minocyclin (Chopra und Roberts, 2003; Michalova, 2004). Diese Zytoplasmaproteine sind ca. 72,5 kDa groß und besitzen strukturelle Ähnlichkeit mit Elongationsfaktoren. Die genauen Regulationsmechanismen sind jedoch noch nicht geklärt (Chopra und Roberts, 2003). Infolge der Bindung eines Tetracyclins an das Ribosom verändert dieses seine Gestalt, wodurch die Elongation unterbrochen wird und die Proteinbiosynthese stoppt. Von den ribosomalen Schutzproteinen wird angenommen, dass sie durch Bindung an das Ribosom eine Konformationsänderung an der das Tetracyclin bindenden Stelle des Ribosoms hervorrufen, weshalb das Agens vom Ribosom dissoziiert. Abschließend gelangt das Ribosom zurück in die zur Proteinbiosynthese befähigte Struktur (Roberts, 2005).

2.4.3.2 *tet*-Gene

Levy *et al.* definierten 1989 Tetracyclinresistenz vermittelnde Determinanten als „natürlich auftretende, im Allgemeinen nah benachbarte genetische Einheiten, die alle Gene - sowohl struktureller als auch regulatorischer Funktion - umfassen, die an der Resistenz beteiligt sind“. Diese *tet*-Gene sind innerhalb der Bakterienpopulation weit verbreitet und können auch bei apathogenen Kommensalen der Mundflora oder des Gastrointestinaltraktes von Mensch und

Tier nachgewiesen werden (Roberts *et al.*, 1991; Barbosa *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000; Villedieu *et al.*, 2003; Stanton und Humphrey, 2003). Grund hierfür ist die horizontale Übertragungsmöglichkeit vieler Resistenzgene, wobei apathogene Organismen sowohl als Reservoir als auch als Vektoren dienen können. Chee-Sanford *et al.* führten 2001 eine Untersuchung zum Vorkommen von *tet*-Genen in Abwasserkanälen und Grundwasserreservoir durch, die unterhalb von US-amerikanischen Schweinezuchtanstalten lagen, in denen Tetracycline zu Therapie, Prophylaxe und Wachstumsförderung eingesetzt wurden. Aus dem aus dem Wasser gewonnenen DNA-Pool konnten acht Tetracyclinresistenz vermittelnde Gene isoliert werden. Bakterien, die diese Determinanten tragen, werden zum einen über das Wasser wieder in den Nahrungskreislauf zurückgeführt, zum anderen findet ein genetischer Austausch mit Bodenbakterien statt, was insgesamt eine Ausbreitung der Tetracyclinresistenz zur Folge hat.

Da im Laufe der Jahre immer mehr Tetracyclinresistenz vermittelnde Determinanten entdeckt wurden und bei deren Benennung kein einheitliches Schema existierte, führten Levy *et al.* 1989 erstmals eine universell gültige, alphabetisch geordnete Nomenklatur ein, indem der allgemeinen, kursiv geschriebenen Bezeichnung „*tet*“ ein in Klammern geschriebener Buchstabe des Alphabets angehängt wurde. Grundlage der Einteilung in die verschiedenen Klassen von *tet*-Genen (symbolisiert durch die Buchstaben) war dabei die DNA-DNA Hybridisierung.

Zudem berücksichtigten sie, dass es neben Determinanten, zu denen nur ein Strukturgen gehört, auch solche mit regulatorischer Einheit gibt. In diesen Fällen schlugen sie für das Strukturgen den Terminus *tetA* (sollten noch weitere dieser Gene vorhanden sein, werden diese folgerichtig als *tetB*, *tetC* usw. benannt) zusätzlich zu der eigentlichen Bezeichnung des Gens vor, während das regulatorische Gen als *tetR* angegeben werden soll. So besteht beispielsweise *tet(Z)* aus der regulatorischen Einheit *tetR(Z)* und aus dem Strukturgen *tetA(Z)*. In den darauf folgenden Jahren wurden weitere *tet*-Gene entdeckt, so dass das Alphabet für die Nomenklatur nicht mehr ausreichte. Daher arbeitete dieselbe Arbeitsgruppe 1999 eine Ergänzung zu der ursprünglichen Einteilung aus, indem sie die numerische Benennung der alphabetischen anschluss (Levy *et al.*, 1999). Außerdem erweiterte sie die Definition einer Tetracyclinresistenz vermittelnden Determinante insofern, als dass zwei Gene in unterschiedliche Klassen einzugruppiert sind, wenn die Homologie der Aminosäuresequenz ihrer Produkte bei max. 80 % liegt.

Im Moment sind 35 *tet*- und drei *otr* (= Oxytetracyclinresistenz)-Gene bekannt. Da sich deren Anzahl aber laufend erhöht, wurde eine Website (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>) zur Erfassung des aktuellen Stands eingerichtet (s. Tab. 2.7-2.10).

Bei porcinen *Megasphaera elsdenii*-Stämmen konnte 2003 zum ersten Mal eine Rekombination zweier *tet*-Klassen beobachtet werden, es handelte sich dabei um eine Mosaik-Genkombination aus *tet*(W) und *tet*(O) (Stanton und Humphrey, 2003). Da das von diesem Mosaik kodierte Protein eine Aminosäuresequenzhomologie von 89,1 bzw. 91,9 % zu Tet(W) aufwies, hätte das Gen selbst als *tet*(W) bezeichnet werden müssen. Davon nahmen die Autoren jedoch auf Grund von Struktur und Herkunft des Gens Abstand, so dass eine endgültige Bezeichnung noch aussteht.

Tab. 2.7: Vorkommen von *tet*-Genen bei grampositiven und -negativen Bakterien (Stand März 2006; Angaben nach <http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Gene, die nur bei grampositiven Bakterien beschrieben sind (incl. <i>Mycobacterium</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> und <i>Ureaplasma</i>) N = 14	Gene, die sowohl bei grampositiven als auch -negativen Bakterien isoliert wurden N = 7	Gene, die nur bei gramnegativen Bakterien gefunden wurden N = 15
<i>tet</i> (P), (T), (U), (V), (Z), (32), (33), (36), (38); <i>otr</i> (A), (B), (C); <i>tcr3</i> ; <i>tet</i>	<i>tet</i> (K), (L), (M), (O), (Q), (S), (W)	<i>tet</i> (A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (J), (X), (Y), (30), (31), (34), (36), (39)

Tab. 2.8: Vorkommen der für Efflux kodierenden *tet*-Gene (Stand: März 2006; Angaben nach <http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Gen	Bakteriengenera
<i>tet</i> (A)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (B)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Brevundimonsa</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Mannheimia</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Treponema</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (C)	<i>Aeromonas</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (D)	<i>Aeromonas</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (E)	<i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (G)	<i>Escherichia</i> , <i>Mannheimia</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (H)	<i>Actinobacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Mannheimia</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pasteurella</i>
<i>tet</i> (J)	<i>Proteus</i>
<i>tet</i> (K)	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>tet</i> (L)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Actinobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Geobacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Mannheimia</i> , <i>Morganella</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Veillonella</i>
<i>tet</i> (P)	<i>Clostridium</i>
<i>tet</i> (V)	<i>Mycobacterium</i>
<i>tet</i> (Y)	<i>Escherichia</i> , <i>Photobacterium</i>
<i>tet</i> (Z)	<i>Corynebacterium</i>
<i>tet</i> (30)	<i>Agrobacterium</i>
<i>tet</i> (31)	<i>Aeromonas</i>
<i>tet</i> (33)	<i>Corynebacterium</i> , <i>Arcanobacterium</i> ¹ , <i>Arthrobacter</i> ²
<i>tet</i> (35)	<i>Stenotrophomonas</i> , <i>Vibrio</i>
<i>tet</i> (38)	<i>Staphylococcus</i>
<i>tet</i> (39)	<i>Acinetobacter</i>
<i>tcr</i> ³	<i>Streptomyces</i>
<i>otr</i> (B)	<i>Mycobacterium</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>otr</i> (C)	<i>Streptomyces</i>

¹ Angabe nach Jost *et al.*, 2003

² Angaben nach Agerso und Sandvang, 2005

Tab. 2.9: Vorkommen der für ribosomalen Schutz kodierenden *tet*-Gene (Stand März 2006; Angaben nach <http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Gen	Bakteriengenera
<i>tet</i> (M)	<i>Abiotrophia, Acinetobacter, Actinomyces, Aerococcus, Afipia, Bacillus, Bacterionema, Bacteroides, Bifidobacterium, Catenibacterium, Clostridium, Corynebacterium, Eicenella, Enterobacter, Enterococcus, Erysipelothrix, Escherichia, Eubacterium, Fusobacterium, Gardnerella, Gemella, Granulicatella, Haemophilus, Kingella, Klebsiella, Lactobacillus, Pantoea, Lactococcus, Listeria, Microbacterium, Mitsuokella, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Pasteurella, Peptostreptococcus, Photobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Pseudomonas, Ralstonia, Selenomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Ureaplasma, Veillonella, Vibrio</i>
<i>tet</i> (O)	<i>Actinobacillus, Aerococcus, Butyrivibrio, Campylobacter, Enterococcus, Eubacterium, Lactobacillus, Megasphaera, Mobiluncus, Neisseria, Peptostreptococcus, Staphylococcus, Streptococcus</i>
<i>tet</i> (S)	<i>Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Listeria, Staphylococcus, Veillonella</i>
<i>tet</i> (T)	<i>Streptococcus</i>
<i>tet</i> B(P) ¹	<i>Clostridium</i>
<i>tet</i> (Q)	<i>Bacteroides, Capnocytophagia, Clostridium, Eubacterium, Gardnerella, Lactobacillus, Mitsuokella, Mobiluncus, Neisseria, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Streptococcus, Veillonella</i>
<i>tet</i> (W)	<i>Actinomyces, Arcanobacterium, Bacillus, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Clostridium, Enterococcus, Fusobacterium, Lactobacillus, Megasphaera, Mitsuokella, Neisseria, Prevotella, Porphyromonas, Roseburia, Selenomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Veillonella</i>
<i>tet</i> (32)	<i>Clostridium, Enterococcus, Eubacterium, Streptococcus</i>
<i>tet</i> (36)	<i>Bacteroides, Clostridium, Lactobacillus</i>
<i>tet</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>otr</i> (A)	<i>Mycobacterium, Streptomyces</i>

¹ kommt nur in Kombination mit *tet*A(P) vor (Chopra und Roberts, 2003)

Tab. 2.10: Vorkommen der für enzymatischen Abbau kodierenden *tet*-Gene incl. *tet*(U) mit unbekanntem Mechanismus (Stand März 2006; Angaben nach <http://faculty.washington.edu/marilynr/>)

Gen	Bakteriengenera
<i>tet</i> (X)	<i>Bacteroides</i>
<i>tet</i> (34)	<i>Aeromonas, Pseudomonas, Serratia, Vibrio</i>
<i>tet</i> (37)	Unbekannt ¹
<i>tet</i> (U)	<i>Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus</i>

¹wurde aus einem Sammelpool der oralen Bakterienflora isoliert (Diaz-Torres *et al.*, 2003)

2.4.3.3 Transfer von *tet*-Genen

Generell kann der Genaustausch zwischen Bakterien über drei Mechanismen (Rolle und Mayr, 1993; Kayser, 1997; Mascaretti, 2003) verlaufen: Transduktion (Bakteriophagen fungieren als Vektoren von bakterieller DNA), Transformation (Aufnahme und Einbau freier DNA) und Konjugation (Übertragung von mobilen/mobilisierbaren genetischen Elementen von einer Donor- auf eine Akzeptorzelle).

Die wichtigste Stellung innerhalb der genetischen Elemente zum Transfer von Resistenzdeterminanten haben die Plasmide inne. Allgemein sind Plasmide unabhängig vom Chromosom im Zytoplasma lokalisierte, meist zirkuläre DNA-Moleküle, deren genetische Informationen zwar zu selektiven Vorteilen führen können, für das Bakterium jedoch nicht essentiell sind. Plasmide beherbergen sog. „Replikons“. Ein Replikon ist eine Einheit von Genen, die sich selbst repliziert. Die genetische Ausstattung eines Plasmids korreliert dabei mit seiner Größe. „Megaplasmide“, die die Größe eines kleinen Chromosoms besitzen, können über mehrere integrierte Replikons verfügen, während sehr kleine Plasmide, sog. „kryptische“ Plasmide, nur für die Gene kodieren, die sie zur Replikation benötigen (Frost *et al.*, 2005). Da Plasmide zur vom Chromosom unabhängigen Replikation befähigt sind, können von einem Plasmid mehrere Kopien angefertigt werden, die im Zuge der Zellteilung zur Weitergabe an die Tochterzellen bestimmt sind (Werckenthin, 1997). Große Plasmide liegen in nur ein bis zwei Kopien in der Zelle vor (sog. „low copy“-Plasmide), kleine dagegen in bis zu 100 Kopien („high copy“-Plasmide) (Kayser, 1997). Die Anzahl seiner Kopien reguliert das Plasmid selbst. Unterschiedliche Plasmide mit demselben Replikationsmechanismus können nicht in einer Zelle koexistieren, ein Phänomen, das als „Inkompatibilität“ bezeichnet wird und als Grundlage zur Klassifizierung der Plasmidgruppen herangezogen wurde (Frost *et al.*, 2005). Plasmide können über Transduktion, Transformation und Konjugation/Mobilisierung horizontal in der Bakterienpopulation ausgetauscht werden, wobei die Konjugation/Mobilisierung den wichtigsten Mechanismus darstellt. Die mit *tra*-Genen ausgestatteten „konjugativen Plasmide“ können selbst die Konjugation einleiten und sich so eigenständig von einem Donor in einen Rezipienten transferieren. Mobilisierbare Plasmide können diesen Prozess nicht selbstständig einleiten, aber im Zuge der Konjugation mit einem konjugativen Plasmid zusammen übertragen werden (Frost *et al.*, 2005).

Die ersten Plasmide wurden in den 1950er Jahren entdeckt. Als man später andere transferierbare genetische Elemente, die Transposons, fand, war dies die Erklärung dafür, wie ehemals ohne Resistenzgene ausgestattete Plasmide diese neue genetische Information erhalten hatten (Hall *et al.*, 1996). Transposons können von einem genetischen Element (z. B. dem Chromosom) in ein anderes (z. B. das Plasmid) „springen“ oder ihre Lokalisation innerhalb von einem Element ändern und die von ihnen flankierten Gene in eine neue Umgebung integrieren (Mascaretti, 2003). Durch Akkumulation von Transposons auf einem Plasmid werden diese Träger von vielen verschiedenen Resistenzgenen. Diese „Mehrfachresistenzplasmide“ können bis zu zehn verschiedene Resistenzgene tragen (Kayser, 1997). Das einfachste Transposon ist eine Insertionssequenz (IS). Dabei handelt es sich um

eine kurze DNA-Sequenz (600-700 bp lang [Thomas und Nielsen, 2005]), die nur für das zur Transposition notwendige Enzym Transposase kodiert. Flankiert wird die Sequenz von identischen, jedoch gegenläufigen Basenfolgen von 10-40 Nukleotiden, den „inverted repeats (IR)“. Die Transposase erkennt die Enden der IS, die sog. „direkt repeats“ (Kayser, 1997; Mascaretti, 2003).

Enthält ein Transposon neben dem Gen für die Transposase auch noch ein weiteres, z. B. ein Resistenzgen, spricht man von einem zusammengesetzten („composite“) Transposon. Hier wird das Resistenzgen von zwei identischen oder zumindest nah verwandten IS flankiert (Kayser, 1997; Mascaretti, 2003). Eine weitere Klasse von Transposons, die „Tn3 verwandten“ Transposons, ist zur sog. „Replikative Transposition“ in der Lage. Dabei verbleibt das ursprüngliche Transposon an seinem Herkunftsort, während eine Kopie von ihm in die Ziel-DNA eingebaut wird (Kayser, 1997; Mascaretti, 2003).

Konjugative Transposons verfügen zusätzlich zu den für die replikative Transposition notwendigen Genen sowohl über *tra*-Gene als auch über andere, z. B. Resistenz vermittelnde Gene. Konjugative Transposons sind i. d. R. in das Chromosom integriert, beim Transfer werden sie aus dem Chromosom herausgeschnitten, dupliziert und eine Kopie des Transposons gelangt in den Rezipienten (Kayser, 1997). Konjugative Transposons sind zudem analog zu konjugativen Plasmiden in der Lage, nicht-konjugative, aber mobilisierbare Plasmide zu mobilisieren, indem sie ihre *tra*-Gene zur Verfügung stellen (Werckenthin, 1997).

Konjugative Transposons spielen in Hinblick auf den eingangs erwähnten Gentransfer zwischen apathogenen Darmbewohnern und bakteriellen Krankheitserregern eine wichtige Rolle. Anaerobe Darmkommensalen beherbergen sowohl Resistenzgene als auch konjugative Transposons, die prinzipiell an jedes Bakterium weitergegeben werden können, das in Kontakt mit ihnen treten kann, d. h. zumindest fakultativ anaerob ist. Beweis für diesen Gentransfer ist die Tatsache, dass identische Resistenzgene bei unterschiedlichen Bakterien in unterschiedlichen Wirten identifiziert werden konnten (Scott, 2002).

Als man in den frühen 1980er Jahren Kartierungen von Plasmiden und Transposons anfertigte, wurde die Beobachtung gemacht, dass auch verschiedene Resistenzgene oft von derselben Sequenz flankiert werden. Die Erklärung hierfür war, dass DNA-Einheiten, die ein Resistenzgen tragen, als sog. Genkassetten in die Wirts-DNA integriert werden. Diese Genkassetten sind dabei Bestandteile von Integrons, die die Kassettengene „einfangen“ können. Genkassetten können sowohl frei im Zytoplasma vorliegen als auch im Genom in ein Integron integriert sein (Hall *et al.*, 1996). Die Genkassette selbst besitzt keinen Promotor für

die Transkription, dieser wird ihr vom Integron zur Verfügung gestellt. Das Integron kann sich nicht selbst transponieren, weshalb es oft Bestandteil konjugativer Plasmide oder Transposons ist, bzw. sich von diesen mobilisieren lässt (Hall *et al.*, 1996; Michalova, 2004). In den letzten Jahren wurde eine neue genetische Einheit, die sog. „Genomic islands“, entdeckt. Bei diesen Inseln handelt es sich um große chromosomale Regionen, auf denen ein oder mehrere Gene lokalisiert sind, die dem sie beherbergenden Bakterium einen selektiven Vorteil verschaffen. Neben diesen Genen kodieren die „Genomic islands“ für Integrasen oder Transposasen und können vom Chromosom entfernt oder an einen anderen Rezipienten weitergegeben werden (Dobrindt *et al.*, 2004).

Die Übertragung von *tet*-Genen ist oft mit Plasmiden, Transposons und konjugativen Transposons assoziiert. Diese können neben der Tetracyclinresistenz auch Unempfindlichkeit gegenüber anderen Antibiotikaklassen oder Schwermetallen vermitteln (Roberts, 2005).

2.4.4 *tet*-Gene bei *A. pyogenes*

Bei *A. pyogenes* sind bisher zwei Gene beschrieben worden. Diese sind zum einen *tet(W)*, dessen Produkt ein ribosomales Schutzprotein ist und als hauptverantwortlich für Tetracyclinresistenz bei Arcanobakterien gilt (Billington *et al.*, 2002), zum anderen *tet(33)*, das auf einem Plasmid lokalisiert ist und ein Ausschleusen von Tetracyclin aus der Bakterienzelle hervorruft (Jost *et al.*, 2003).

2.4.4.1 *tet(W)*

Im Jahre 1997 beobachtete eine Forschergruppe einen in hoher Frequenz stattfindenden Transfer einer Tetracyclinresistenz vermittelnden Determinante bei dem obligat anaeroben Pansenkommensalen *Butyrivibrio (B.) fibrisolvens*. Diese Determinante zeigte nur eine geringe Sequenzhomologie zu *tet(M)* und *tet(O)*. Deswegen und auf Grund der Tatsache, dass diese Determinante auch Minocyclinresistenz vermittelte, schien die Annahme eines neuen für ribosomalen Schutz kodierenden Gens am wahrscheinlichsten (Scott *et al.*, 1997). Zwei Jahre später wurde dieses Gen von derselben Forschergruppe als neue Tetracyclinresistenz vermittelnde Determinante „*tet(W)*“ identifiziert (Barbosa *et al.*, 1999). Das Gen zeigt einen für ribosomalen Schutz vermittelnde Gene hohen G+C Gehalt von 53 %. *B. fibrisolvens* selbst besitzt nur einen G+C Gehalt von 36-41 %, ein Hinweis dafür, dass *tet(W)* ursprünglich von einem anderen Bakterium stammen muss. Als Indiz für einen in jüngster Zeit geschehenen

Intergenush-Transfer des Gens zwischen Pansenbewohnern werteten Barbosa *et al.* (1999) auch die Tatsache, dass sie *tet(W)* auch bei *Selenomonas ruminantium* und *Mitsuokella (M.) multacida* isolieren konnten, ebenfalls Anaerobier desselben Biotops. Außerdem identifizierten sie es auch bei einem porcinen *M. multacida*-Stamm. Ein Jahr später fanden Scott *et al.* *tet(W)* bei zwei anaeroben Bakterien aus dem humanen Gastrointestinaltrakt, die zu 99 % Sequenzhomologie zu dem bei *B. fibrisolvens* vorkommenden Gen zeigten.

Im Jahre 2001 wiesen Aminov *et al.* *tet(W)* in den Faeces und auch im Futter von Schweinen nach, was auf eine weitere Verbreitung des Gens hindeutete.

Billington *et al.* fanden 2002 *tet(W)* erstmals bei *A. pyogenes* und damit auch zum ersten Mal bei einem nicht strikt anaeroben Bakterium (Billington *et al.*, 2002 b). Das Gen zeigte 92 % Sequenzhomologie zu *tet(W)* von *B. fibrisolvens*. Außerdem konnte in der unmittelbaren Umgebung des Gens bei 25 % der Stämme ein sog. *mob*-Gen identifiziert werden. Dieses *mob*-Gen kodiert für ein bei grampositiven Bakterien vorkommendes Mobilisierungsprotein und kann generell sowohl auf konjugativen als auch mobilisierbaren Plasmiden oder Transposons lokalisiert sein. Billington *et al.* (2002 b) konnten jedoch keinen direkten Effekt des Mob-Proteins auf die Übertragbarkeit von *tet(W)* nachweisen. Da aber zumindest bei einigen der *mob*-positiven Stämme beide Gene übertragen wurden und es auch keinen *tet(W)*-negativen Stamm mit diesem Gen gab, stellten sie die Hypothese auf, dass beide auf demselben mobilen genetischen Element liegen, dessen genauere Natur jedoch noch unklar blieb. Es wurde allerdings die Vermutung angestellt, dass *tet(W)* chromosomal lokalisiert ist. Gründe hierfür waren die im Gegensatz zu *tet(W)* von *B. fibrisolvens* sehr niedrige Transferrate des Gens, die Tatsache, dass nur ein kleines Plasmid (pAP1) ohne konjugative oder mobilisierbare Eigenschaften gefunden wurde und dass in der Nachbarschaft des *tet(W)*-Gens ein Haushaltsgen identifiziert werden konnte.

Bezüglich der durch *tet(W)* hervorgerufenen Tetracyclinresistenz in *A. pyogenes* ergaben sich bei der Studie von Billington *et al.* (2002 b) folgende Werte für die MHK: Aus zwei Stämmen wurde das Gen isoliert und anschließend in *E. coli* inkloniert. Der mit dem ersten Isolat rekombinante *E. coli*-Stamm wies eine MHK von 16 µg/ml auf, der mit dem anderen Stamm rekombinante eine von 32 µg/ml. Zusätzlich wurde ein *A. pyogenes*-Stamm, getestet; er zeigte eine MHK von 8 µg/ml, wobei dieser Wert aufgrund der fehlenden Etablierung einer Methode zur MHK-Bestimmung bei *A. pyogenes* nicht direkt vergleichbar bzw. nur als Anhaltspunkt zu sehen ist.

Da wie oben bereits erwähnt *A. pyogenes* das erste fakultativ anaerobe Bakterium war, bei dem *tet(W)* isoliert wurde, stellten Billington *et al.* (2002 b) die Hypothese auf, dass *A.*

pyogenes als sog. „Brücke“ zwischen aeroben und anaeroben Bakterien hinsichtlich der weiteren Verbreitung von *tet(W)* fungieren könnte.

Obwohl kurze Zeit später *tet(W)* auch bei aeroben Bakterien der Mundhöhle isoliert wurde (Villedieu *et al.*, 2003) und Arcanobakterien aus dem Respirationstrakt als Donatoren des Gens hätten dienen können, erscheint diese These heute eher unwahrscheinlich. Melville *et al.* wiesen 2004 die Lokalisation von *tet(W)* auf dem konjugativen Transposon TnB1230 bei *B. fibrisolvens* nach. Das Gen wird dabei von zwei identischen „direct repeat“-Sequenzen flankiert, die vermutlich genetische Information über eine für Sauerstoff nicht sensible Nitroreduktase besitzen. Die Autoren wiesen außerdem nach, dass die 350 bp lange Region direkt „upstream“ vom *tet(W)*-Gen zur Ausprägung der Tetracyclinresistenz unabdingbar ist. Bei der Untersuchung von sechs unterschiedlichen Magen-Darm-Anaerobiern von Mensch, Rind und Schwein zeigte sich, dass diese Sequenz hochkonserviert ist, und nur bei zweien konnten überhaupt Sequenzunterschiede festgestellt werden (die jedoch so gering waren, dass die Homologie trotzdem bei über 93 % lag). Eine Vergleich dieser Sequenz mit der von *A. pyogenes* ergab jedoch eine Homologie von nur 64 %. Da auch die Sequenz des *tet(W)*-Gens selbst bei *A. pyogenes* größere Unterschiede aufweist als die Sequenzen der *tet(W)*-Gene der Anaerobier untereinander, kann daraus der Schluss gezogen werden, dass *A. pyogenes* „sein“ *tet(W)*-Gen entweder nicht direkt von der untersuchten anaeroben Darmkommensalen erhalten hat oder dass ein Transfer schon vor längerer Zeit stattgefunden hat (Roberts, 2005). Das *tet(W)*-Gen konnte bisher bei neunzehn verschiedenen Genera identifiziert werden. Es ist sowohl bei grampositiven als auch -negativen, aeroben wie anaeroben Bakterien zu finden und ist nach *tet(M)* das am weitesten verbreitete Gen, das für ribosomalen Schutz kodiert. Im Vergleich zur Verbreitung aller *tet*- und *otr*-Gene steht es an dritter Stelle (s. Tab. 2.7-2.10)

2.4.4.2 *tet(33)*

Das Gen *tet(33)* wurde erstmals bei *Corynebacterium glutamicum* auf dem 27,8 kbp großen Plasmid pTET3 beschrieben (Tauch *et al.*, 2002). Das Gen wurde hier von zwei identischen Insertionssequenzen (IS6100) flankiert, in weiteren Versuchen zeigte sich IS6100 transpositionsaktiv. Tet(33) bewies eine zu 65 % identische Aminosäuresequenz zu dem ebenfalls erstmals bei *C. glutamicum* isolierten Tet(Z) (Tauch *et al.*, 2000). Wie *tet(Z)* kodiert auch *tet(33)* für ein Effluxprotein, dessen Ausprägung bei beiden von einem Repressorprotein reguliert wird, d. h. *tet(33)* besteht aus den Einheiten *tetA(33)* und *tetR(33)*. Nach *tet(Z)* war *tet(33)* erst das zweite durch einen Repressor regulierte Gen, das bei grampositiven Bakterien

identifiziert werden konnte. Bei *C. glutamicum* war *tet(33)* induzierbar und bewirkte eine MHK von 16 µg/ml.

Bei *A. pyogenes* wurde es 2003 entdeckt (Jost *et al.*, 2003). Hier war es auf dem 9304 bp großen Plasmid pAP2 lokalisiert, jedoch nicht von einer Insertionssequenz flankiert. Es war nicht induzierbar und die von ihm hervorgerufene MHK lag bei 1µg/ml. In Kombination mit *tet(W)* wurden 16 µg/ml erreicht (hier jedoch ist dasselbe anzumerken wie bei *tet(W)*: Auch diese MHK-Ermittlung kann sich auf keine etablierte Methode beziehen und ist daher ebenfalls nur als Anhaltspunkt zu werten), wobei *tet(W)* alleine eine MHK von 8 µg/ml erreichen sollte und alle sensiblen Stämme eine MHK von unter 0,06 µg/ml aufwiesen.

Bisher konnte *tet(33)* bei *Arthrobacter protophorniae* (Agero und Sandvang, 2005), *C. glutamicum* und *A. pyogenes* identifiziert werden und ist bei letzterem wesentlich seltener als *tet(W)*.

2.4.4.3 Plasmide von *A. pyogenes*

Die Inzidenz von Plasmiden bei *A. pyogenes* ist nicht hoch. Bisher sind nur zwei Plasmide beschrieben worden, das bereits erwähnte pAP2, sowie pAP1.

Das Plasmid pAP2 ist 9304 bp groß und trägt neben *tet(33)* auch das Makrolidresistenzgen *erm(X)*, das mit IS6100 assoziiert werden konnte (Jost *et al.*, 2003).

Das Plasmid pAP1 hat eine Größe von 2,4 kbp und konnte bei zwei von 38 Isolaten identifiziert werden. Auf Grund seiner geringen Größe handelt es sich bei pAP1 vermutlich um ein kryptisches Plasmid (Billington *et al.*, 1998).

3. Material und Methoden

Im Folgenden werden zunächst die in dieser Arbeit untersuchten Bakterienisolate, die für die phäno- und genotypischen Analysen verwendeten Referenzstämme, sowie die für die Polymerase-Ketten-Reaktionen genutzten Primer angegeben. Danach werden die einzelnen Methoden beschrieben, die bei den jeweiligen Untersuchungen angewandt wurden. Detaillierte Angaben bezüglich verwendeter Geräte, enzymatischer Reagenzien, Chemikalien, Testkits und Nährmedien sind dem Anhang zu entnehmen.

3.1 Material

3.1.1 Untersuchte Isolate von *A. pyogenes*

In dieser Dissertation wurden insgesamt 115 *A. pyogenes*-Stämme untersucht. Diese setzten sich zusammen aus 54 Isolaten, die in der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, sowie aus 64 Isolaten, die vom BfT-GermVet-Projekt deutschlandweit gesammelt wurden (im Folgenden als „LMU-“ bzw. „BfT-Arcanobakterien“ bezeichnet).

Die Isolatnummern und ihre Herkunft sind Tabelle 3.1 und 3.2 zu entnehmen. Verschiedene Isolate, die demselben Tier entstammen, sind in den Tabellen entsprechend gekennzeichnet. Alle Tiere kamen aus bayerischen Betrieben. Informationen bezüglich antibiotischer Vorbehandlung liegen nicht vor.

Von den „BfT-Arcanobakterien“ entstammten 25 Isolate der Indikation Urogenitaltrakt-Rind, 30 der Indikation Omphalitis/Septikämie-Rind und neun der Indikation Bewegungsapparat/ZNS-Schwein. Keines der Tiere war antibiotisch vorbehandelt. Die Herkunft der Stämme ist über ganz Deutschland verteilt.

Material und Methoden

Tab. 3.1: Hintergrundinformationen zu den in der bakteriologischen Diagnostik der Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin isolierten *A. pyogenes*-Isolaten

Isolatnummer	Isolierungsjahr	Tierart	Erkrankung
144	2004	Rind	Rückenmarksabszeß
264	2003	Rind	Euterabszeß
1229	2003	Rind	Bursitis
1257	2003	Schwein	Rhinitis
1269	2003	Rind	Omphalophlebitis
1332	2003	Rind	Polyarthrit
1677	2003	Rind	Pneumonie
1847	2003	Rind	Pneumonie
1890	2003	Rind	Bauchwandabszeß
1891	2003	Rind	Phlegmone
1950	2003	Rind	Sepsis
1954	2003	Rind	Abort
1959	2003	Rind	Phlegmone
1974	2003	Rind	Mastitis
1976 ¹	2003	Rind	Nephritis, Endometritis
1977 ¹	2003	Rind	Nephritis, Endometritis
1978	2003	Rind	Nephritis, Endometritis
1982 ²	2003	Schwein	Pneumonie
1983 ²	2003	Schwein	Pneumonie
1985	2003	Schwein	Pneumonie
2023	2003	Schwein	Abszeß Pneumonie
2031	2003	Schwein	Osteomyelitis, Polyarthrit
2349	2003	Rind	Karpalgelenksentzündung
2641	2003	Schwein	Endometritis
2642	2003	Schwein	Endometritis
2649	2003	Rind	Fesselgelenksabszeß
2928	2003	Schwein	Nabelabszeß
2931	2003	Schwein	Pneumonie
3611	2003	Rind	Arthritis
3809	2003	k. A.	k. A.
3850	2003	Rind	Pneumonie
3869	2003	Rind	Endometritis
3891	2003	Schwein	Nabelabszeß
3922 ³	2003	Rind	Phlegmone
3923 ³	2003	Rind	Phlegmone
3938	2003	Rind	Tarsitis
3968	2003	Rind	Omphalitis
4004	2003	Rind	Mastitis
4039 ⁴	2003	Rind	Lochiometra
4040 ⁴	2003	Rind	Lochiometra
4075	2003	Schwein	Enteritis
4249	2003	Rind	Abszeß im Wirbelkanal
4368 ⁵	2003	Rind	Nabelabszeß
4371 ⁵	2003	Rind	Nabelabszeß
4390	2003	Rind	Endometritis
4399	2003	Rind	Klauentzündung
4631	2003	Rind	Abszeß Cond. occipitalis
4783 ⁶	2003	Rind	Mastitis
4790	2003	Rind	Mastitis
4855	2003	Schwein	Abszeß
4939 ⁶	2003	Rind	Mastitis
5009	2003	Schwein	Tarsitis
5244	2003	Schwein	Metritis
5504	2003	Rind	Mastitis

Legende:

k. A.: Keine Angaben

¹⁻⁶ Isolate mit gleicher Fußnote stammen vom selben Wirt

Material und Methoden

Tab. 3.2: Hintergrundinformationen zu den im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes zur Verfügung gestellten *A. pyogenes*-Isolaten

BfT-Nummer	Tierart	Ort der Infektion	PLZ	Ort
91	Rind	Urogenitaltrakt	18276	Lüssow
141	Rind	Urogenitaltrakt	47495	Rheinberg
291	Rind	Septikämie	18190	Überhaf
292	Rind	Septikämie	19374	Mestlin
293	Rind	Septikämie	18551	Sagrad
294	Rind	Septikämie	17335	Neuensund
405	Schwein	Bewegungsapparat	21388	Soderstorf
478	Rind	Urogenitaltrakt	16868	Wusterhausen
479	Rind	Urogenitaltrakt	18276	Kuhs
480	Rind	Urogenitaltrakt	17091	Rosenow
481	Rind	Septikämie	17109	Demmin
530	Schwein	Infekt. ZNS	29643	Neuenkirchen
747	Rind	Urogenitaltrakt	15806	Groß Schulzendorf
996	Schwein	Bewegungsapparat	31246	Lahstedt
1027	Rind	Urogenitaltrakt	14806	Werbig
1071	Rind	Urogenitaltrakt	88069	Tettngang
1077	Rind	Urogenitaltrakt	88457	Kirchdorf
1081	Rind	Urogenitaltrakt	88436	Eberhardzell
1086	Rind	Septikämie	17379	Lübs
1087	Rind	Septikämie	17099	Roga
1088	Rind	Septikämie	16775	Gr. Wotersdorf
1089	Rind	Septikämie	18317	Kückenlage
1094	Rind	Urogenitaltrakt	19357	Karstädt
1113	Schwein	Bewegungsapparat	40667	Meerbusch
1114	Schwein	Bewegungsapparat	31535	Neustadt
1115	Schwein	Bewegungsapparat	59558	Lippstadt
1116	Schwein	Bewegungsapparat	59558	Lippstadt
1128	Rind	Urogenitaltrakt	21785	Kehdingbruch
1162	Rind	Urogenitaltrakt	88477	Schwendi
1163	Rind	Urogenitaltrakt	88499	Bechingen
1191	Rind	Urogenitaltrakt	14728	Stölln
1250	Schwein	ZNS	38315	Schladen
1318	Rind	Urogenitaltrakt	64823	Groß-Umstadt
1319	Rind	Septikämie	18551	Sagard
1320	Rind	Septikämie	39615	Benster
1321	Rind	Septikämie	17391	Medow
1322	Rind	Septikämie	39579	Bellingen
1323	Rind	Septikämie	15324	Neubarmin
1324	Rind	Septikämie	17291	Göritz
1325	Rind	Septikämie	03249	Großmar
1326	Rind	Septikämie	19386	Greven
1327	Rind	Septikämie	17440	Gr. Ernhof
1328	Rind	Septikämie	18249	Bernitt
1508	Rind	Urogenitaltrakt	14547	Wittbrietzen
1545	Rind	Urogenitaltrakt	14793	Ziesar
1546	Rind	Urogenitaltrakt	15831	Blankenfelde-Mahlow
1858	Rind	Urogenitaltrakt	06386	Quellendorf
1895	Rind	Urogenitaltrakt	87477	Sulzberg
1914	Rind	Urogenitaltrakt	39579	Bellingen
1941	Rind	Septikämie	16835	Seebeck
2035	Rind	Urogenitaltrakt	19357	Karstädt
2239	Schwein	Bewegungsapparat	31618	Liebenau
2412	Rind	Urogenitaltrakt	06386	Quellendorf
2413	Rind	Urogenitaltrakt	06386	Quellendorf
2654	Rind	Septikämie	17192	Gr. Geivitz
2655	Rind	Septikämie	17111	Wotenick
2656	Rind	Septikämie	39517	Schellendorf

Tab. 3.2: Hintergrundinformationen zu den im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes zur Verfügung gestellten *A. pyogenes*-Isolaten (Fortsetzung)

BfT-Nummer	Tierart	Ort der Infektion	PLZ	Ort
2657	Rind	Septikämie	16258	Neurüdnitz
2658	Rind	Septikämie	18314	Frauendorf
2659	Rind	Septikämie	16259	Güsterbiserlose
2660	Rind	Septikämie	16866	Watzke
2662	Rind	Septikämie	59320	Ennigerloh
2663	Rind	Septikämie	19417	Kleekamp
2664	Rind	Septikämie	17192	Neu Falkenhagen

3.1.2 Referenzstämme

Referenzstämme wurden, zur Identifizierung, zur Methodenetablierung der Bouillonmikrodilution für *A. pyogenes* oder zur Überprüfung der Mikrotiterplatten benutzt. Verschiedene Referenzstämme fanden außerdem Anwendung bei den genetischen Untersuchungen.

3.1.2.1 Referenzstämme für die phänotypischen Untersuchung

In der Tabelle 3.3 sind die jeweils verwendeten Isolate, in Tabelle 3.4 die MHK-Referenzwerte der CLSI-Referenzstämme (2004) angegeben.

3.1.2.2 Referenzstämme und Primer für die genotypischen Untersuchung

Bei Durchführung der PCR-Analysen wurde mit Hilfe in der Literatur erwähnter Positivkontrollen das Funktionieren der PCR kontrolliert. Für die Screening-PCRs von *tet(W)* und *tet(33)* wurde in Ermangelung einer solchen zunächst auf die Positivkontrolle verzichtet. Nach Klonierung und Sequenzierung der ersten positiven Amplifikate wurden diese bei den weiteren durchgeführten PCRs als Kontrollproben verwendet (s. Tab. 3.5).

Die Auswahl der Primer wurde, soweit nicht in der Literatur erwähnt, mittels des Computerprogramms „Lasergene“ (DNASTAR, Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzen der Primer sowie ihre Lokalisation im jeweiligen Gen sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Material und Methoden

Tab. 3.3: Zur phänotypischen Untersuchung verwendete Referenzstämme

Spezies	DSM-Nummer ¹	ATCC-Nummer ²	Besonderheit	Herkunft	Verwendungszweck	Bezugsquelle	Literatur
<i>A. pyogenes</i>	20630	19411	Typstamm	Schwein	Positivkontrolle bei der Identifizierung von Arcanobakterien Kontrolle hinsichtlich Anwendbarkeit bei Methodenetablierung Bouillonmikrodilution	DSMZ ³	Reddy <i>et al.</i> , 1982
<i>A. pyogenes</i>	20594	-		Rind	Positivkontrolle bei der Identifizierung von Arcanobakterien Kontrolle hinsichtlich Anwendbarkeit bei Methodenetablierung Bouillonmikrodilution	DSMZ ³	Collins <i>et al.</i> , 1980
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	20689	19410	Typstamm	Schaf	Negativkontrolle bei der Identifizierung von Arcanobakterien	DSMZ ³	
<i>E. coli</i>	1103	25922			MHK-Referenzstamm	BVL ⁴	CLSI, 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	2570	29212			MHK-Referenzstamm	BVL ⁴	CLSI, 2004
<i>Staphylococcus aureus</i>	2569	29213			MHK-Referenzstamm	BVL ⁴	CLSI, 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1117	27853			MHK-Referenzstamm	BVL ⁴	CLSI, 2004

¹Stammnummer Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

²American Type Culture Collection

³Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

⁴Stämme wurden dem Institut im Rahmen des BVL-Ringversuchs zur Verfügung gestellt (Wallmann *et al.*, 2005)

Tab. 3.4: MHK-Referenzwerte (in µg/ml) der Referenzstämme (CLSI, 2004)

Antibiotikum	<i>Enterococcus faecalis</i> (DSM 2570, ATCC 29212)	<i>Staphylococcus aureus</i> (DSM 2569, ATCC 29213)	<i>E. coli</i> (DSM 1103, ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 1117, ATCC 27853)
Amoxicillin/Clavulansäure	0,25/0,12-1,0/0,5	0,12/0,06-0,5-0,25	2/1-8/4	-
Ampicillin	0,5-2	0,5-2	2-8	-
Cephazolin	-	0,25-1	1-4	-
Ceftiofur	-	0,25-1	0,25-1	16-64
Cephalothin	-	0,12-0,5	4-16	-
Chloramphenicol	4-16	2-8	2-8	-
Clindamycin	4-16	0,06-0,25	-	-
Enrofloxacin	0,12-1	0,03-0,12	0,008-0,03	1-4
Erythromycin	1-4	0,25-1	-	-
Florfenicol	2-8	2-8	2-8	-
Gentamicin	4-16	0,12-1	0,25-1	0,5-2
Oxacillin	8-32	0,25-2	-	-
Penicillin	1-4	0,25-2	-	-
Spectinomycin	64-256	64-256	8-64	≥256
Tetracyclin	8-32	0,12-1	0,5-2	8-32
Tilmicosin	8-32	1-4	-	-
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	8/152-32/608

Material und Methoden

Tab. 3.5: Für Untersuchungen mittels PCR verwendete Positivkontrollen

Detektion von	Charakteristika des vorliegenden Bakterienklones						Charakteristika des Ausgangsstammes				
	Spezies	Stamm	Klonname	Plasmidname	Vektor	Fragmentgröße	Stammname	Spezies	Genlokus	Genbanknr.	Literatur
<i>tet(K)</i>	-	-	-	-	-	-	CW29	<i>Staphylococcus lentus</i>	pSTS12	-	Werckenthin, 1997
<i>tet(L)</i>	-	-	-	-	-	-	CW49	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Chromosom	-	Werckenthin, 1997
<i>tet(M)</i>	-	-	-	-	-	-	CW44	<i>Staphylococcus intermedius</i>	pSCS33	-	Werckenthin, 1997
<i>tet(O)</i> ¹	<i>E. coli</i>	JM 107	-	pAT121	pUC19	1670 bp	BM2509	<i>Campylobacter coli</i>	pIP1433	-	Sougakoff <i>et al.</i> , 1987
<i>tet(Q)</i> ¹	<i>E. coli</i>	DH5 α	-	pBSK1.2-5	pBIISK+	1973 bp	1126	<i>Bacteroides fragilis</i>	Transfer-element	Z21523	Lepine et al 1993
<i>tet(W)</i> ²	<i>E. coli</i>	TOPO 10F'	tetW up1	-	TOPO 2.1	954 bp	3922-03	<i>A. pyogenes</i>	Chromosom	-	-
<i>tet(W)</i> ²	<i>E. coli</i>	TOPO 10F'	tetW do1	-	TOPO 2.1	1134 bp	3922-03	<i>A. pyogenes</i>	Chromosom	-	-
<i>tet(33)</i> ²	<i>E. coli</i>	TOPO 10F'	tet33 3	-	TOPO 2.1	698 bp	1950-03	<i>A. pyogenes</i>	Chromosom	-	-
<i>tet(Z)</i> ³	<i>E. coli</i>	DH5 α MCR	-	pAGHD1	pUC19	Gen komplett 11239 bp	22243	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	pAG1	AF12100	Tauch <i>et al.</i> , 2000

¹ Zur Verfügung gestellt von Herrn S. Schwarz, FAL Braunschweig

² In der vorliegenden Arbeit entwickelte Positivkontrollen

³ Zur Verfügung gestellt von Herrn A. Tauch, Institut für Genomforschung, Zentrum für Biotechnologie, Universität Braunschweig

Material und Methoden

Tab. 3.6: Verwendete Oligonukleotide

Primernamen	Primersequenz	Referenzen/GenBank Zugangsnummer	Lage im Gen (in bp)	Primer nach	Bezugsfirma
tet(W)upfor	TTG GGC CTT GTA TGG AGG AT	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	2079-2098	-	MWG, Ebersberg
tet(W)uprev	CTT ATG GGC GGT ATC TGT CC	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	3013-3032	-	MWG, Ebersberg
tet(W)upintrev	CGT TTT TGG CGC TAC CAT GA	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	2753-2772	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(W)dofor	GCT TGT CTA TCT GCG GCT ATA C	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	2894-2915	-	MWG, Ebersberg
tet(W)dorev	GAC GTT ACA TTA CCT TCT GAA A	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	4005-4026	-	MWG, Ebersberg
tet(W)dointfor	AGC CAC ACC ATC CAT ATC GA	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	3387-3406	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(W)dointrev	TAT GGA TGG TGT GGC TGG C	<i>tet(W)</i> von <i>A. pyogenes</i> /AY049983	3384-3402	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(33)for	CCT GGT GAT GCC GAT TCT TC	<i>tet(33)</i> von pAP2-Plamid von <i>A. pyogenes</i> /AY255627	439-458	-	MWG, Ebersberg
tet(33)rev	CGA AAA CGG ACA GGG AGA TT	<i>tet(33)</i> von pAP2-Plamid von <i>A. pyogenes</i> /AY255627	1117-1136	-	MWG, Ebersberg
tet(O)for	TAG CGG AAC ATT GCA TTT GAG G	<i>tet(O)</i> von <i>Campylobacter jejuni</i> / M18896	1019-1040	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(O)rev	TGC GGG GGT ACT TAC AGG ACT A	<i>tet(O)</i> von <i>Campylobacter jejuni</i> / M18896	1727-1748	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(Q)for	TCT GGA ATG GTG TGA AAT GC	<i>tet(Q)</i> von <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> /X58717	776-795	-	Invitrogen, Karlsruhe
tet(Q)rev	ACC TTG CTT CTC TCT TCG GG	<i>tet(Q)</i> von <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> /X58717	1651-1670	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetM3	ATA GAC ACG CCA GGA CAT AT	<i>tet(M)</i> von <i>Enterococcus faecalis</i> /X04388	347-366	Roberts <i>et al.</i> , 1993	MWG, Ebersberg
tetM4	GGA GCC CAG AAA GGA TTC GG	<i>tet(M)</i> von <i>Enterococcus faecalis</i> /X04388	1442-1462	Roberts <i>et al.</i> , 1993	MWG, Ebersberg
tet(L)for	CAA ACT GGG TGA ATA CAG	<i>tet(L)</i> von <i>Bacillus subtilis</i> /X08034	339-356	Pang <i>et al.</i> , 1994	MWG, Ebersberg
tet(KL)rev	CC(CT) GTT CCC TCT GAT AAA	<i>tet(L)</i> von <i>Bacillus subtilis</i> /X08034 <i>tet(K)</i> von pT181/J01764	1369-1386 2138-2155	Pang <i>et al.</i> , 1994	MWG, Ebersberg
tetA(Z)rev	CAA CGT GAT GCT GCC GAG TCC	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	12120-12140	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetA(Z)for	ATG CCG ATC TTG CCT ACC CTT CT	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	12967-12989	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetA(Z)intrev	AAC GGT CAG AGA GTC GGC	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	12851-12868	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetA(Z)endrev	AGC GCG GTT ATC GAG ATC	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	11873-11890	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetA(Z)extrev	CGG GAG ACT TGA CTG GTG	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	11821-11838	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetR(Z)end	AGG TCA CGA TTC GCT CGA	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	13718-13735	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetR(Z)intfor	TGC GTC CCA TTT CTC GTC	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	13358-13375	-	Invitrogen, Karlsruhe
tetR(Z)extfor	GCT TAT GGT GGA CGG GAT	<i>tet(Z)</i> von pAG1-Plasmid von <i>Corynebacterium glutamicum</i> /AF121000	13774-13791	-	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Layout der verwendeten Mikrotiterplatten

Sowohl für die Methodenetablierung der Bouillonmikrodilution für *A. pyogenes*, als auch für die Durchführung der MHK-Testung im Rahmen des BfT-GermVet-Projekts wurden die Mikrotiterplatten NLV31, 32 und 33 sowie NLV3 der Firma Sensititre (MCS) verwendet, in denen die zu untersuchenden Antibiotika bereits in den gewünschten Konzentrationen in lyophilisierter Form vorgelegt waren. Aus den Abbildungen 3.1 bis 3.4 sind sowohl die Antibiotika als auch die eingesetzten Konzentrationsstufen ersichtlich.

<u>NLV 3</u>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gentamicin	A	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12
Streptomycin	B	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12
Ampicillin	C	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06
Colistin	D	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12
Neomycin	E	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06
Nitrofurantoin	F	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,12
Amoxicillin/ Clavulansäure	G	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/ 0,25	0,25/ 0,12	0,12/ 0,06	WK	WK
-	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 3.1: Belegung der Mikrotiterplatte NLV3 (Fa. Sensititre). Die Zahlen im Koordinatenfeld geben die jeweilige Konzentration (in µg/ml) des Antibiotikums in der Kavität an. Das Wachstum der Bakterien wird zusätzlich in zwei agensfreien Kavitäten überprüft (WK). Die Reihe H ist ohne Wirkstoffbelegung.

<u>NLV 31</u>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ampicillin	A	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Amoxicillin/ Clavulansäure	B	0,015/ 0,07	0,03/0, 015	0,06/0, 03	0,12/0, 06	0,25/0, 12	0,5/0,2 5	1/0,5	2/1	4/2	8/4	16/8	32/16
Penicillin G	C	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Ceftiofur	D	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Cefquinom	E	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Cephalothin	F	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Cephazolin	G	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Cefoperazon	H	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	WK	WK

Abb. 3.2: Belegung der Mikrotiterplatte NLV31 (Fa. Sensititre). Die Zahlen im Koordinatenfeld geben die jeweilige Konzentration (in µg/ml) des Antibiotikums in der Kavität an. Das Wachstum der Bakterien wird zusätzlich in zwei agensfreien Kavitäten überprüft (WK).

Material und Methoden

<u>NLV 32</u>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tulathromycin	A	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Gentamicin	B	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Enrofloxacin	C	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
SxT	D	0,015/ 0,3	0,03/ 0,6	0,06/ 1,19	0,12/ 2,38	0,25/ 4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	8/152	16/304	32/608
Spiramycin	E	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Tetracyclin	F	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Neomycin	G	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Chloramphenicol	H	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	WK	WK

Abb. 3.3: Belegung der Mikrotiterplatte NLV32 (Fa. Sensititre). Die Zahlen im Koordinatenfeld geben die jeweilige Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$) des Antibiotikums in der Kavität an. Das Wachstum der Bakterien wird zusätzlich in zwei agensfreien Kavitäten überprüft (WK). Die Wirkstoffkombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol wurde mit SxT abgekürzt.

<u>NLV 33</u>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Erythromycin	A	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Clindamycin	B	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Tilmicosin	C	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Spectinomycin	D	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Florfenicol	E	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Colistin	F	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
Sulfamethoxazol	G	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Oxacillin/NaCl	H	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	WK	WK

Abb. 3.4: Belegung der Mikrotiterplatte NLV33 (Fa. Sensititre). Die Zahlen im Koordinatenfeld geben die jeweilige Konzentration (in $\mu\text{g/ml}$) des Antibiotikums in der Kavität an. Das Wachstum der Bakterien wird zusätzlich in zwei agensfreien Kavitäten überprüft (WK).

Die Qualitätsprüfung der Mikrotiterplatten wurde mit einem der MHK-Referenzstämmen pro 10 bis 15 untersuchter Bakterienwildstämmen durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Identifizierung von *A. pyogenes*

Alle in der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU München isolierten *A. pyogenes* Isolate („LMU-Arcanobakterien“; N = 54) wurden zusätzlich zu der bereits vorangegangenen Identifizierung im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts makro- und mikroskopisch beurteilt, auf das Vorhandensein von Katalase und Xyloseverstoffwechslung, sowie mittels des „Löffler-Serums“ auf proteolytische Fähigkeiten hin examiniert. Bei einigen Isolaten mit indifferenter Morphologie wurde additiv eine „Bunte Reihe“ in Form des API-Coryne-Testsystems durchgeführt.

Auf Grund der bereits im jeweiligen Diagnostiklabor durchgeführten Identifikation und deren Bestätigung durch die FU Berlin wurden alle vom BfT-GermVet zugesandten Bakterienisolate („BfT-Arcanobakterien“; N = 64) nur morphologisch an Hand des Koloniewachstums beurteilt. Bei hierbei aufkommenden Zweifeln zur Klassifizierung des jeweiligen Bakteriums wurde zusätzlich ein mikroskopisches Präparat angefertigt und die Katalasereaktion durchgeführt. Bei einem devianten mikroskopischen Bild und negativer Katalasereaktion wurde ergänzend das API-Coryne-Testsystem hinzugezogen.

3.2.1.1 Makroskopische Identifizierung

Alle Isolate wurden auf je einer mit fünf Prozent defibriniertem Schafblut (Herkunft von institutseigenen Schafen) substituierten Blutagarplatte (BP) im „Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich“ subkultiviert und anschließend bei 3 Vol% CO₂ und 37 °C bebrütet.

Nach 24 Stunden wurde die noch schwache Hämolysezone und nach 48 Stunden das Kolonieaussehen sowie die komplett ausgebildete Hämolyse bewertet. Die Beurteilung erfolgte nach den in der Literatur bekannten Kriterien (s. Kap. 2.3.2).

3.2.1.2 Mikroskopische Identifizierung

Bei der Gramfärbung wird der unterschiedliche Zellwandaufbau der Bakterien genutzt, um sie hinsichtlich ihrer Anfärbbarkeit in zwei Gruppen, nämlich grampositiv (violett gefärbt) bzw. gramnegativ (rot gefärbt) einzuteilen.

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte im Hellfeld bei 1000facher Vergrößerung. Kriterien für die Beurteilung waren wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben die positive Gramfärbung, die pleomorphe Gestalt und die charakteristische Anordnung der Bakterien zueinander.

3.2.1.3 Katalasereaktion

Mit der Katalasereaktion wird das Vorhandensein von eisenporphyrinhaltiger Katalase untersucht. Arcanobakterien sollten nicht über dieses Enzym verfügen (s. Tab. 2.4).

Dazu wurden drei bis vier 48 Stunden alte Kolonien auf einem Objektträger verrieben und anschließend ein Tropfen Wasserstoffperoxid zugefügt. War dabei eine Blasenbildung zu beobachten, wurde die Reaktion als positiv bewertet, im negativen Fall blieb diese aus.

3.2.1.4 Xyloseverstoffwechselung

Zur Untersuchung der Xylosefermentation wurden 1,5 ml einer auf McFarland-Standard sechs eingestellten Bakteriensuspension in 3 ml Xylose-Reagens gegeben, der Ansatz wurde anschließend für 24 Stunden bei 3 Vol% CO₂ und 37 °C inkubiert. Ein Farbumschlag der ehemals blauen Lösung nach gelb zeigte eine pH-Wert Änderung aufgrund von Säurebildung und damit eine positive Reaktion an. Als Negativkontrolle diente der *Corynebacterium pseudotuberculosis*-Referenzstamm DSM 20689, als Positivkontrolle der *A. pyogenes*-Typstamm DSM 20630.

3.2.1.5 Löfflerserum

Mit dem Löfflerserum wurde die bereits im Abschnitt 2.3.2 erwähnte proteolytische Fähigkeit von Arcanobakterien nachgewiesen. Dazu wurden mit einer sterilen Impfüse Einzelkolonien der zu untersuchenden Isolate in 3 ml NaCl solviert, bis die Trübung der Suspension der eines McFarland-Dichtestandard von 6 entsprach. Anschließend wurden 10 µl der Bakterienlösung auf das Löfflerserum pipettiert. Pro Platte wurden vier Isolate überprüft. Sobald der

Suspensionstropfen auf der Agaroberfläche getrocknet war, wurden die Platten 48 Stunden bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Im positiven Fall war der Agar an der Stelle des Bakterienwachstums zu einer deutlichen Mulde abgeflacht. Als Negativkontrolle diente ebenfalls der *C. pseudotuberculosis*-Referenzstamm DSM 20689, als Positivkontrolle der *A. pyogenes* Typstamm DSM 20630.

3.2.1.6 API-Coryne-Testsystem

Mit dem API-Coryne-Testsystem (Fa. BioMérieux) wurden einige hinsichtlich ihrer Spezies fragwürdige Stämme untersucht. Bezüglich Anfertigung und Auswertung wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

3.2.2 Bakterienasservierung

Von jedem als *A. pyogenes* identifizierten Isolat wurden zwei Aliquote unter Zusatz von Glycerin bei -80 °C kryokonserviert. Dazu wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie mittels einer sterilen Impföse in 3 ml Brain-Heart-Infusion Medium (BHI) verrieben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 24 Stunden bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden pro Stamm zwei Aliquote von 870 µl der Suspension mit je 130 µl sterilem Glycerin in zwei Polypropylen-Reaktionsgefäßen (1,8 ml Fassungsvermögen) homogenisiert. Der fertige Ansatz wurde zunächst für 2-4 Stunden bei 4 °C gekühlt, danach bei -80 °C asserviert.

Die Stämme wurden bei Bedarf aufgetaut, indem von der Oberfläche des gefrorenen Inhalts der Reaktionsgefäße mit einer Einmalimpföse ein wenig Material abgekratzt und damit anschließend auf einer Blutagarplatte ein Drei-Ösen-Ausstrich angefertigt wurde. Die Blutplatte wurde anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ bebrütet. Nach 48 Stunden wurde wiederum eine Subkultur des aufgetauten Stammes erstellt, die nach 48-stündiger Bebrütung bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ weiter verwendet werden konnte.

3.2.3 Untersuchungen zur phänotypischen Resistenzlage der „LMU-Arcanobakterien“ gegenüber ausgewählten Antibiotika

Alle „LMU-Arcanobakterien“ incl. der beiden *A. pyogenes* Referenzstämme DSM 20594 und 20630 wurden mittels einer modifizierten Agardilution auf ihre Resistenz gegenüber einigen in der Literatur beschriebenen antimikrobiellen Therapeutika untersucht.

Getestet wurde dabei die Empfindlichkeit von *A. pyogenes* gegenüber Benzylpenicillin-Natrium, Erythromycin und Tetracyclin. Die Konzentration wurde an die von dem CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebenen Grenzwerte angelehnt. Für Penicillin wurden dabei 0,125 µg/ml, für Erythromycin 0,5 µg/ml und für Tetracyclin 5 µg/ml verwendet.

Zur Herstellung der Stammlösungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Um eine Stammkonzentration von 99,8 µg/µl Penicillin zu erreichen, wurden einer Injektionsflasche (enthält nach Herstellerangaben 0,599 g Benzylpenicillin-Natrium) 6 ml NaCl zugegeben.

Die Stammkonzentration von 19 µg/µl von Erythromycin wurde erreicht, indem 20 mg des Wirkstoffs (pharmakologische Potenz bei 95 %) in 1 ml Ethanol gelöst wurden.

Bei der Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 20 µg/µl Tetracyclin wurden zunächst ca. 100 mg Tetracyclin abgewogen, der abgewogene Wert anschließend mit der pharmakologischen Potenz multipliziert und das Ergebnis durch die gewünschte Stammkonzentration von 20000 µg/ml dividiert (Herstellung der Stammkonzentration nach CLSI, 2002). Das Ergebnis in ml Aqua demineral (A. demin.) wurde danach zur Solubilisierung des Tetracyclins verwendet.

Für jeden der zu testenden Wirkstoffe wurden 500 ml Blutagar nach Herstellerangaben angefertigt und auf 48 °C abgekühlt. Anschließend wurden von der Penicillinstammlösung 0,63 µl, von der Erythromycinstammlösung 13,17 µl und von der Tetracyclinstammlösung 125 µl in den jeweiligen Blutagaransatz überführt.

Der Agar wurde anschließend à 30 ml in 15 Plastikpetrischalen gegossen und zum Erstarren gebracht. Die BP wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

Die zu testenden Stämme wurden 48 h vor der Versuchsdurchführung subkultiviert und bei 3 Vol% CO₂ inkubiert. Danach wurde von jedem Stamm eine Einzelkolonie mittels steriler Impföse abgenommen und im Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich auf der jeweiligen BP ausgestrichen. Pro Platte wurden vier Stämme aufgetragen. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ für 48 Stunden bebrütet.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des jeweiligen Antibiotikums und zum Ausschluss einer das Antibiotikum inhibierenden Einflussnahme des CO₂ auf den pH-Wert der Agaroberfläche wurden die 24 Stunden zuvor subkultivierten und bei aeroben Bedingungen inkubierten MHK-Referenzstämme *Staphylococcus aureus* (DSM 2559, ATCC 25922) zur Überprüfung von Penicillin und Erythromycin und *Enterococcus faecalis* (DSM 2570, ATCC 29212) zur Überprüfung von Penicillin, Erythromycin und Tetracyclin verwendet (CLSI, 2002). Die Auswertung erfolgte mittels Beurteilung des Wachstums. War kein Wachstum feststellbar so wurde der jeweilige Stamm als sensibel bewertet, war Koloniewachstum sichtbar, galt das Isolat als resistenzverdächtig.

3.2.4 Untersuchungen zu möglichen Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten von *A. pyogenes*

Mit den LMU-Isolaten 1257-03 und 4939-03 sowie dem *A. pyogenes* Referenzstamm DSM 20630 wurden zunächst Untersuchungen zum allgemeinen Wachstumsverhalten von *A. pyogenes* unternommen. Getestet wurde dabei das Wachstum in den in der Literatur zur Verwendung in der Bouillonmikrodilution beschriebenen Medien und bei unterschiedlichen atmosphärischen Inkubationsbedingungen.

3.2.4.1 Einfluss der atmosphärischen Bedingungen auf die Koloniemorphologie

Mittels eines Drei-Ösen-Verdünnungsausstriches wurden die drei Isolate auf jeweils zwei BP subkultiviert. Eine Platte wurde bei 37 °C aerob und die andere bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Das Wachstum wurde an Hand der Koloniemorphologie nach 24 und 48 Stunden beurteilt.

3.2.4.2 Einfluss verschiedener Flüssigmedien und atmosphärischer Bedingungen

Von allen drei Isolaten wurden im Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich Subkulturen erstellt und diese bei 37°C und 3 Vol% CO₂ für 48 Stunden inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Testmedien angesetzt: Pro zu testendem Stamm wurden jeweils 2 x 10 ml der verschiedenen Testmedien vorbereitet. Dabei handelte es sich um CaMHB, CaMHB-2%Pb, CaMHB-5%Pb, CaMHB-2%FKS und VFM (vgl. Kap. 2.2.4 und 2.3.4). Zur Herstellung der mit Blut bzw. Serum substituierten Medien wurden 19,6 ml CaMHB mit 400 µl IPb bzw. 400 µl FKS bzw.

19 ml CaMHB mit 1 ml IPb angereichert und in 2 x 10 ml Portionen aufgeteilt. Das VFM-Medium wurde gemäß den Vorgaben des CLSI-Dokuments M31-A2 unter Verwendung von Supplement C und IPb hergestellt. Von den Bakterienkulturen wurden nach 48 Stunden mit einer sterilen Impföse je nach Größe bis zu 10 Einzelkolonien abgenommen und in 5 ml NaCl homogenisiert, so dass die Trübung der dabei entstandenen Suspension visuell der eines McF 0,5 entsprach. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Bakterienlösung in je 10 ml Medium verbracht, so dass von jedem Medium zwei Ansätze à 10 ml mit der Bakterienlösung inokuliert waren. Von jedem Stamm wurden aus einem der beiden CaMHB-Inokula 10 µl entnommen und in 10 ml NaCl überführt. Davon wurden wiederum 100 µl auf einer BP mit einem abgeflamten Metallspatel ausgespatelt (= Dichtekontrolle). Ein Ansatz pro Medium von jedem Bakterium wurde für 24 Stunden bei 3 Vol% CO₂ und ein Ansatz für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen bebrütet. Die BP wurden ebenfalls bei 3 Vol% CO₂ und 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde das Wachstum der Stämme in den jeweiligen Medien bei verschiedenen Inkubationsbedingungen visuell bewertet.

Nach 48 Stunden wurde die Inokulumsdichte durch Auszählen der Kolonien auf der Dichtekontrolle und anschließendem Rückrechnen bestimmt. Die Inokulumsdichte entspricht dabei der gezählten Einzelkolonienmenge multipliziert mit 10⁴. Ihre Einheit ist KBE/ml. Da die Ermittlung der Inokulumsdichte stets nach diesem Muster durchgeführt wurde, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr darauf hingewiesen.

3.2.4.3 Erstellung von Wachstumskurven

Von allen drei Isolaten wurden an unterschiedlichen Tagen Wachstumskurven angefertigt. Dazu wurde das jeweilige Isolat auf einer BP mittels Drei-Ösen-Verdünnungsausstrich subkultiviert und für 48 Stunden unter Zugabe von CO₂ bebrütet. Danach wurde eine Bakteriensuspension in 5 ml NaCl angefertigt, deren Trübung einem McF 0,5 entsprechen sollte. Um diese Trübung zu validieren wurde photometrisch die OD₆₀₀ gemessen. Lag der Messwert der Suspension über der Grenze von 0,10, so wurde der Quotient aus 0,09 und dem Messwert berechnet. Das Ergebnis in ml wurde dem Ansatz entnommen und mit NaCl auf 1 ml aufgefüllt. Lag der Messwert unter der Grenze von 0,08 wurden der Suspension noch weitere Einzelkolonien zugegeben bis die gewünschte Dichte erreicht war oder die Suspension rechnerisch adjustiert werden konnte.

Die adjustierte Bakteriensuspension wurde nachfolgend im Verhältnis 1:10 000 in CaMHB unter Zusatz von 2 % FKS verdünnt und je nach Versuchsprotokoll aerob oder unter Zugabe von CO₂ über 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alle zwei Stunden wurde unter Ausnahme zweier Nachtpausen von jeweils zwölf Stunden 1 ml Bakteriensuspension aus dem 100 ml umfassenden Wachstumsansatz entnommen und in log₁₀ Stufen verdünnt. Von jeder Stufe wurden 100 µl auf einer BP ausgespatelt, nach zwei weiteren Tagen konnten die dabei entstandenen Kolonien ausgezählt werden. In die Auswertung miteinbezogen wurde das Ergebnis derjenigen Verdünnungsstufen, deren Einzelkolonieanzahl auf der Blutplatte im zweistelligen Bereich lag.

Jedes Isolat wurde mindestens zweimal unter der jeweiligen atmosphärischen Bedingung überprüft. Zusätzlich wurde auch eine Wachstumskurve über zwölf Stunden mit dem Referenzstamm *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922) im selben Medium unter aerober Inkubation angefertigt.

Mit zwei Isolaten (dem Referenzstamm DSM 20630 sowie dem Wildisolat 1257-03) wurde zudem je eine Wachstumskurve unter Verwendung von CaMHB-2%Pb in mit 3 Vol% angereicherter Inkubationsatmosphäre und sonst gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt.

3.2.5 Ermittlung der tatsächlichen Bakteriendichte einer auf McF 0,5 adjustierten Bakteriensuspension von *A. pyogenes*

Mit den beiden *A. pyogenes*-Referenzstämmen sowie den Wildstämmen 1257-03 und 4939-03 wurde der tatsächliche Bakteriengehalt pro ml einer zum McF 0,5 adjustierten Suspension untersucht. Dazu wurden mehrere 48 Stunden alte Bakterienkolonien eines jeden Stammes in jeweils 3 ml NaCl verrieben, so dass die visuelle Dichte der Suspension der eines McF 0,5 entsprach. Anschließend wurde ein Aliquot (1,6 ml) photometrisch bei einer OD von 625 nm gemessen. Lag die ermittelte OD zwischen 0,07 und 0,11, so wurde der Quotient aus 9 und dem Messwert errechnet. Das Ergebnis in µl wurde in 9,9 ml NaCl überführt, was einer Verdünnung von 1:100 gleichbedeutend war. Von dieser neuen Suspension wurden 100 µl in wiederum 9,9 ml diluiert, was einer Verdünnung von 1:10⁴ entsprach. Von dieser Dilutionsstufe wurden 100 µl mit 900 µl NaCl versetzt, was eine Verdünnungsstufe von 1:10⁵ ergab. Die Verdünnung wurde noch zweimal bis zur Verdünnungsstufe 10⁷ fortgesetzt. Von dieser sowie von der vorangegangenen Dilutionsstufe wurden jeweils 2x100 µl auf je einer Blutplatte mittels eines sterilen Metallspatels verteilt und die BP anschließend für 48 Stunden

bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Einzelkolonien gezählt und mit 10⁶ bzw. 10⁷ multipliziert. Das Ergebnis in KBE/ml entsprach der Bakteriendichte der Ausgangssuspension und damit der einer auf McF 0,5 adjustierten Bakteriensuspension von *A. pyogenes*. In die Auswertung einbezogen wurde der Mittelwert von den beiden Blutplatten einer Verdünnungsstufe, deren Einzelkolonienanzahl im zweistelligen Bereich lag. Die Dilutionsreihe wurde mit den Referenzstämmen jeweils sieben und mit den Wildstämmen jeweils drei Mal angefertigt.

3.2.6 Untersuchungen zur Einflussnahme verschiedener Parameter auf die MHK

3.2.6.1 Versuche zur Auswertbarkeit und Einflussnahme verschiedener Medien und Inkubationsbedingungen auf die MHK

Die beiden Wildstämme 1257-03 und 4939-03 sowie der *A. pyogenes* Typstamm DSM 20630 wurden auf eine BP subkultiviert und bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ bebrütet. Nach 48-stündiger Inkubation wurde eine Bakteriensuspension in 5 ml NaCl angefertigt, die visuell der Dichte eines McF 0,5 entsprach. Anschließend wurde diese photometrisch bei 600 nm gemessen. Das weitere Vorgehen entsprach dem im Abschnitt 3.2.4.3 geschilderten. Die adjustierte Bakteriensuspension wurde im Verhältnis 1:667 (entspricht 15 µl in 10 ml, in diesem Fall wurden 30 µl in 20 ml Medium verwendet) im Doppelansatz mit der jeweiligen Bouillon verdünnt.

Getestet wurden die Medien CaMHB, CaMHB-2%Pb, CaMHB-2%FKS, CaMHB-5%Pb und VFM. Von dem Inokulum wurden 10 µl in 10 ml NaCl pipettiert, wovon 100 µl mittels eines sterilen Spatels auf einer BP ausgespatelt wurden (Dichtekontrolle). Die BP wurden anschließend für 48 Stunden bei 37 °C unter Zugabe von 3 Vol% CO₂ inkubiert.

Mit jedem Inokulum wurden je zwei NLV32-Mikrotiterplatten bestückt, wobei in jede der 96 Kavitäten 50 µl Inokulum mittels einer Mehrkanalpipette pipettiert wurden. Pro Medium wurde jeweils eine Platte mit CO₂ und eine in aerober Atmosphäre bei jeweils 37 °C inkubiert. Die MHK-Ablesung erfolgte nach 24 Stunden nach CLSI (2002) Vorgaben.

Der Versuch wurde mit jedem Isolat mindestens zweimal durchgeführt. Zur Auswertung wurde bei zwei unterschiedlichen MHK-Werten der jeweils höhere herangezogen.

3.2.6.2 Untersuchungen zur Einflussnahme von FKS auf die Aktivität von Tetracyclin

Die Bouillonmikrodilution wurde in nicht-lyophilisierten 96-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt. Daher wurde zunächst eine Tetracyclin-Stammkonzentration von 20 µg/µl nach derselben Vorgehensweise wie in Kap. 3.2.3 beschrieben hergestellt. Parallel dazu wurde in 11 sterile Reagenzröhrchen jeweils 5 ml CaMHB und in ein weiteres 10 ml CaMHB gegeben. Von der Stammkonzentration wurden anschließend 64 µl in das Röhrchen mit 10 ml CaMHB pipettiert, sodass die Tetracyclinkonzentration in diesem Röhrchen 128 µg/ml betrug. Von diesem ersten Röhrchen wurden anschließend 5 ml in ein zweites, 5 ml CaMHB enthaltendes Röhrchen überführt. Die Tetracyclinkonzentration in diesem Röhrchen betrug damit 64 µg/ml. Dieser Vorgang wurde in neun der verbleibenden Röhrchen wiederholt, das letzte diente als Negativkontrolle ohne Tetracyclinzusatz. Anschließend wurden von jeder Antibiotikaverdünnungsstufe bzw. der Negativkontrolle jeweils eine der zwölf Vertikalreihen der Mikrotiterplatte mit 50 µl pro Kavität mittels einer Mehrkanalpipette gefüllt. Die dadurch hergestellten tetracyclinhaltigen Mikrotiterplatten (der Ansatz einer Verdünnungsreihe genügte für 8 Mikrotiterplatten) konnten bei -20 °C über mehrere Wochen aufbewahrt werden. Da die Tetracyclin-Verdünnungsreihe bei der späteren Inokulation (50 µl Inokulum auf 50 µl Tetracyclinlösung) 1:1 verdünnt wurde, ergab sich somit eine tatsächliche Konzentration von 64 bis 0,06 µg/ml in den elf tetracyclinhaltigen Kavitäten.

Der *A. pyogenes*-Wildstamm wurde 48 Stunden, der MHK-Referenzstamm *E. coli* (DSM 1103, ATCC 25922) 24 Stunden vor der Versuchsdurchführung subkultiviert. Für das Arcanobakterium diente hierbei eine Blutagarplatte, für den Referenzstamm eine Agarplatte ohne weitere Zusätze als Nährboden. Der Wildstamm wurde bei 37 °C und 3 Vol% CO₂, der Referenzstamm bei 37 °C und aerob bebrütet.

Am Tag der Versuchsdurchführung wurden sechs Glaskolben vorbereitet. Der erste wurde mit 33,6 ml CaMHB, die anderen jeweils mit 20 ml CaMHB befüllt. Anschließend wurden in den ersten Kolben 6,4 ml FKS pipettiert (entspricht einem Anteil von 16 % FKS). Aus dem ersten Kolben wurden daraufhin 20 ml entnommen und im zweiten diluiert. Dieser Vorgang wurde bis einschließlich des fünften Kolbens wiederholt, so dass in diesem eine FKS-Konzentration von 1 % enthalten war. Der letzte Kolben blieb ohne Zusatz von FKS. Anschließend wurde der Inhalt der Kolben auf jeweils zwei sterile Reagenzröhrchen à 10 ml portioniert.

Der *A. pyogenes*-Wildstamm wurde wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben in NaCl adjustiert. Anschließend wurden 30 µl der Bakteriensuspension in jeweils ein Röhrchen von jeder FKS-Konzentrationsstufe pipettiert. Von einem der inokulierten Röhrchen wurden 5 µl entnommen

und in 10 ml NaCl überführt. Davon wurden 100 µl auf einer BP ausgespatelt (Dichteplatte). Die Dichteplatte wurde bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ für 48 Stunden inkubiert, anschließend wurde die vorhandene Inokulumskonzentration an Hand der auf der Blutplatte gewachsenen Einzelkolonien berechnet.

Pro FKS-Konzentrationsstufe wurde eine Horizontalreihe einer Mikrotiterplatte mit 50 µl Inokulum mittels einer Mehrkanalpipette pipettiert, wobei die ersten beiden Konzentrationsstufen in zwei Reihen gegeben wurden. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ für 24 Stunden inkubiert und die MHK nach Vorgabe des CLSI (2002) abgelesen.

Der *E. coli*-Referenzstamm wurde auf dieselbe Weise adjustiert wie der Wildstamm. Anschließend wurden von der Bakteriensuspension 100 µl in jeweils 10 ml der vorbereiteten FKS-Konzentrationsstufen gegeben. Das weitere Vorgehen entsprach dem des *A. pyogenes*-Stammes. Sowohl die Dichte- als auch die Mikrotiterplatte wurden für 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Beide konnten nach dieser Zeit ausgewertet werden.

3.2.6.3 Untersuchungen zur Abhängigkeit der MHK von der Inokulumsdichte

Die Wildstämme 4939-03 und 1257-03 wurden 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung subkultiviert und bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert.

Anschließend wurde mit Einzelkolonien der Isolate jeweils eine Bakteriensuspension nach der in Kapitel 3.2.4.3 beschriebenen Methode adjustiert. Parallel dazu wurden in einem Glaskolben 196 ml CaMHB mit 4 ml FKS gemischt. Mit diesem gemeinsamen Ansatz wurden für jeden Stamm sieben sterilen Reagenzröhrchen mit je 10 ml CaMHB-2%FKS befüllt. Aus der Bakteriensuspension eines jeden Isolates wurden je 5, 10, 15, 25, 50, 100 und 200 µl in jeweils ein Röhrchen überführt. Die Dichtekontrolle wurde nach der in Abschnitt 3.2.4.2 beschriebenen Methode mit allen Inokula durchgeführt und ausgewertet.

Die für die MHK-Testung vorgesehenen sieben NLV3-Mikrotiterplatten wurden halbiert, sodass mit dem Isolat 1257-03 nur Neomycin, Nitrofurantoin und Amoxicillin/Clavulansäure und mit dem Isolat 4939-03 nur Gentamicin, Streptomycin, Ampicillin und Colistin getestet wurden. Pro Mikrotiterplatte wurden die Inokula der beiden Stämme untersucht, die dieselbe Suspensionsmenge beinhalteten. In jede Kavität der Mikrotiterplatten wurden 50 µl des Inokulums mittels einer Mehrkanalpipette transferiert. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Die MHK wurde anschließend nach den

Vorgaben des CLSI (2002) abgelesen. Auf eine Auswertung von Colistin wurde auf Grund der intrinsischen Resistenz von grampositiven Bakterien verzichtet (Adam und Christ, 1987).

3.2.6.4 Durchführung der Empfindlichkeitstestung von 40 „BfT-Arcanobakterien“ mittels Bouillonmikrodilution in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb

Von den „BfT-Arcanobakterien“ wurden 40 einer zweifachen MHK-Bestimmung auf der NLV32 Mikrotiterplatte unterzogen. Dazu wurden die Bakterien 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung subkultiviert und bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Die beiden Medien wurden wie oben beschrieben angefertigt, wobei von CaMHB-2%Pb 20 ml (entspricht 400 µl IPb in 19,6 ml CaMHB) hergestellt wurden.

Danach wurde von jedem Stamm mindestens eine visuell dem McF 0,5 angegliche Bakteriensuspension in 3 ml NaCl erstellt. Aus diesem Ansatz wurden 15 µl in 10 ml CaMHB-2%FKS und 30 µl in 20 ml CaMHB-2%Pb überführt. Da bei einigen Isolaten die Versuche mit jeweils einem der unterschiedlichen Medien zu verschiedenen Zeitpunkten stattfanden, dienten in diesen Fällen auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellte Bakteriensuspensionen als Grundlage. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte analog der in Kap. 3.2.6.1 geschilderten, wobei die fertigen Mikrotiterplatten hier nur in mit CO₂ angereicherter Atmosphäre bebrütet wurden. Mit dem CaMHB-2%Pb-Inokulum wurde neben der NLV32 auch die Mikrotiterplatten NLV31 und NLV33 bestückt. Die für die Dichtekontrolle benötigte Inokulumsmenge wurde aus dem CaMHB-2%Pb-Inokulum entnommen.

3.2.7 MHK-Bestimmung für Tetracyclin aller „LMU-Arcanobakterien“ mittels Bouillonmikrodilution in CaMHB-2%FKS

Die Tetracyclinverdünnungsreihe in den Mikrotiterplatten wurde wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben angefertigt.

Jedes der „LMU-Arcanobakterien“ wurde 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung auf BP subkultiviert und bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert.

Am Tag der Versuchsdurchführung wurden für jeden Stamm 9,6 ml CaMHB mit 400 µl FKS versetzt. Von jedem Isolat wurde eine Bakteriensuspension in 3 ml NaCl hergestellt, die visuell einem McF 0,5 entsprach. Davon wurden 1,6 ml photometrisch bei 600 nm gemessen

und die Suspension anschließend nach der in Kapitel 3.2.4.3 beschriebenen Methode adjustiert. Von diesem Ansatz wurden 30 µl in die 10 ml CaMHB-2%FKS überführt.

Vom Inokulum wurden 5 µl in 10 ml NaCl pipettiert, 100 µl davon wurden auf einer BP ausgespatelt (Dichteplatte). Jeweils eine horizontale Reihe der Mikrotiterplatte (entsprechend den Tetracyclin-Endkonzentrationen 64 µg/ml bis 0,06 µg/ml und Negativkontrolle) wurde mittels Mehrkanalpipette mit 50 µl eines Stammes je Kavität beimpft. Pro Mikrotiterplatte wurden demnach acht Bakterienstämme geprüft. Die Mikrotiterplatten und Dichteplatten wurden anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Die Ablesung der MHK erfolgte nach 24 Stunden Bebrütung nach den Kriterien des CLSI (2002), die Inokulumsdichte konnte nach 48-stündiger Inkubation an Hand der Einzelkolonien auf der BP ausgezählt werden. Jedes Isolat wurde mindestens zwei Mal getestet.

Die Testung des MHK-Referenzstammes *Enterococcus faecalis* (DSM 2570, ATCC 29212) erfolgte analog den Vorgaben der CLSI (2002) zur Testung von schnellwachsenden Bakterien. Um einen Einfluss von CO₂ auf die Aktivität des Tetracyclins auszuschließen, wurde der Bouillonmikrodilutionsansatz des Referenzstammes ebenfalls unter gleichen Bedingungen bebrütet.

3.2.8 MHK-Bestimmung für Tetracyclin aller „LMU-Arcanobakterien“ mittels modifizierter Agardilution nach Vorgaben des CLSI (2002)

3.2.8.1 Erstellung einer antibiotischen Verdünnungsreihe in MHA-Platten

Zunächst wurden 1,5 l MHA nach Herstellerangaben angefertigt, autoklaviert und im Wasserbad auf 48-50 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine kleine Menge des flüssigen Agars in einen Becher abgefüllt. Mit Hilfe eines Thermometers wurde die Abkühlung des flüssigen Agars auf 25 °C kontrolliert und der pH-Wert bei dieser Temperatur mit einem pH-Meter bestimmt (Soll-pH-Wert: 7,2-7,4).

Dem Gesamtansatz des MHAs wurden anschließend 75 ml defibriertes Schafblut (von institutseigenen Schafen) zugegeben. Der mit dem Blut versetzte MHA wurde in 12 vorgewärmte Glaskolben portioniert, wobei in den ersten Kolben 180 ml, in die anderen 100 ml abgefüllt wurden. Ein Erstarren des MHA wurde durch konstante Warmhaltung der Kolben bei 48-50 °C im Wasserbad verhindert.

Von der wie in Kapitel 3.2.3 hergestellten Tetracyclinstammlösung wurden 640 µl in 20 ml A. demin. solviert. Die Lösung wurde anschließend in den ersten, 180 ml MHA enthaltenden

Kolben gegeben, wodurch dieser eine Tetracyclinkonzentration von 64 µg/ml enthielt. Von diesem wurden 100 ml in den zweiten Kolben überführt (dadurch war in diesem eine Tetracyclinkonzentration von 32 µg/ml), von diesem wiederum 100 ml in den dritten. Dies wurde solange wiederholt, bis alle Kolben mit Ausnahme des letzten (Negativkontrolle) mit Tetracyclin bestückt waren. Anschließend wurden pro Kolben drei Plastikpetrischalen mit jeweils 30 ml MHA gefüllt. Dadurch entstanden drei Verdünnungsreihen mit Tetracyclin, beginnend bei 64 µg/ml, die niedrigste Dilutionsstufe enthielt 0,06 µg/ml. Der Agar in den Platten wurde bei Raumtemperatur zum Erstarren gebracht und anschließend bei 4 °C für maximal fünf Tage gelagert.

3.2.8.2 Inokulation der tetracyclinhaltigen MHA-Platten

Alle „LMU-Arcanobakterien“ wurden 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung subkultiviert und wie beschrieben inkubiert.

Anschließend wurden von jedem Isolat in jeweils 5 ml NaCl Einzelkolonien mittels einer sterilen Öse verrieben, so dass die Dichte der entstandenen Bakteriensuspension der eines McF 0,5 entsprach. Die Suspension wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 625 nm gemessen und anschließend nach gleicher Vorgehensweise wie in Kap. 3.2.4.3 beschrieben adjustiert. Von dem Bakterienansatz wurden 100 µl in 3 ml NaCl diluiert, wovon 1 µl auf ein gekennzeichnetes Feld auf der MHA-Platte pipettiert wurde. Pro MHA-Platte wurden 12-13 Isolate getestet. Die Platten wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Bakterienwachstum analog der Vorgaben des CLSI (2002) beurteilt.

Als MHK-Referenzstamm wurde der *E. coli*-Referenzstamm (DSM 1103, ATCC 25922) analog der Vorgaben für die Agardilution schnellwachsender Bakterien des CLSI-Dokuments M31-A2 (2002) mitgeführt.

3.2.9 Durchführung der Bouillonmikrodilution von *A. pyogenes* im Rahmen des BfT-GermVet-Projekts

Die noch zu testenden Isolate (N = 22; auf eine Wiederholung der Ergebnisse der im Abschnitt 3.2.6.4 getesteten Isolate konnte verzichtet werden) wurden 48 Stunden vor der Versuchsdurchführung subkultiviert und wie beschrieben inkubiert. Anschließend wurde die Bouillonmikrodilution analog zu der in Abschnitt 3.2.6.4 beschriebenen Methode in 20 ml

CaMHB-2%Pb in den Mikrotiterplatten NLV31-33 durchgeführt. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ bebrütet. Die MHK-Ablesung erfolgte nach 24 Stunden nach den Vorgaben des CLSI (2002). In die Auswertung gingen auch die in Kap. 3.2.6.4 in CaMHB-2%Pb auf allen Platten ermittelten Ergebnisse mit ein.

3.2.10 Statistische Auswertungen

Die statistischen Bewertungen erfolgten mit Hilfe der PC-Software Microsoft®Excel und SigmaStat. Angewandt wurden je nach Fragestellung der „Fisher’s exact Test“, der T-Test nach Student, oder der χ^2 -Test, sowie statistische Regressionsanalysen.

3.2.11 Genotypische Untersuchung

Eingang in die genotypische Untersuchung fanden nur die *A. pyogenes* Stämme aus der bakteriologischen Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ziel war dabei die Identifizierung vorhandener *tet*-Gene sowie der Nachweis von Plasmiden.

Der Nachweis der *tet*-Gene erfolgte mittels PCR mit gegebenenfalls daran anschließender Klonierung und Sequenzierung jeweils eines Vertreters des entsprechenden Genotyps. Bei diesen Untersuchungen wurden nur diejenigen Isolate berücksichtigt, die in der bereits in der vorher durchgeführten Bouillonmikrodilution als tetracyclinresistenzverdächtig registriert worden waren (s. Kap. 3.2.7).

Die Plasmidisolierung wurde über die Herstellung von Minilysaten bzw. mit Hilfe der Affinitätschromatographie durchgeführt, die daran anschließende Kartierung über Restriktionsenzymverdau.

3.2.11.1 Agarosegelelektrophorese

Als Laufpuffer diene Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer (TAE-Puffer [1x]). Je nach Größe des zu erwartenden Fragments wurden 0,8-1,5%ige (w/v) Agarosegele verwendet, bestehend aus dem jeweiligen Anteil Agarose (w/v) und TAE-Puffer (1x).

Die DNA-Probe wurde zur Beschwerung und Sichtbarmachung im Verhältnis 5:4 (Gesamtzell-DNA) bzw. 10:4 (PCR-Amplifikate und Plasmid-DNA) mit einem Bromphenolblau enthaltenden "Blaumarker" versetzt. Als Größenstandards bei PCR-Produkten, Plasmiden und Plasmidrestriktionsfragmenten wurden ein „1 Kilobasenpaar (Kbp)-Größenstandard“ und ein „100 Basenpaar (bp)-Größenstandard“ in einem Volumen von 6 µl benutzt.

Bei Gelen mit DNA-Extrakten (0,8%iges [w/v] Agarosegel) wurde an die Gelelektrophoresekammer zunächst eine Spannung von 40 Volt mittels eines Stromgebers angelegt. Sobald die Blaufront aus den Geltaschen ins Gel gewandert war, wurde die Spannung auf 90 Volt erhöht.

Bei kleineren Fragmenten (PCR-Produkten, Plasmidrestriktionsfragmenten) wurde ein 1 oder 1,5%iges (w/v) Agarosegel verwendet. Die primäre Spannung lag ebenfalls bei 40 Volt, die sekundäre in diesem Fall bei 110 Volt.

Die Dauer eines Gellaufs betrug je nach angelegter Spannung und Größe der Fragmente zwischen 1,5 und 2,5 Stunden.

Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente im Gel wurde 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid (Ethidiumbromid) verwendet. Dazu wurde das Gel für ca. 10-20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 0,1%ig [v/v]) belassen.

Anschließend konnte das in die DNA-Moleküle eingelagerte Ethidiumbromid mittels UV-Bestrahlung auf einem UV-Tisch mit integrierter Kamera auf dem Monitor eines mit der Kamera in Verbindung stehenden Computers sichtbar gemacht werden.

3.2.11.2 Gesamtzell-DNA-Extraktion

Die für die nachfolgende PCR-Untersuchung der Arcanobakterien benötigte Gesamtzell-DNA wurde analog der Methode nach Pospiech und Neumann (1995) angefertigt.

Zunächst wurden 10 ml BHI in ein 15 ml fassendes Polypropylenröhrchen pipettiert. Anschließend wurde eine 48 bis 72 Stunden alte Kolonie des zu untersuchenden Stammes mittels einer Impföse von der BP abgenommen und in das BHI Medium gegeben. Diese

Suspension wurde zwischen 20 und 28 Stunden bei 3 Vol% CO₂ bebrütet und anschließend bei 6 000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und der Bodensatz in 2 ml Tris-EDTA-Natriumchlorid (TES)-Puffer resuspendiert. Die neue Suspension wurde ebenfalls für zehn Minuten bei 6 000 U/min zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen, das Pellet in 500 µl TES-Puffer gelöst und in ein 1,8 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt. Zu der Lösung wurden 5 µl einer Lysozymlösung (100 mg/ml) hinzu pipettiert und bei 37 °C im Thermomixer für eine halbe Stunde inkubiert.

Danach wurden 20 µl einer 10%igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) dazugegeben, gemischt und bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten stehengelassen.

Anschließend wurden 500 µl einer Phenol/Chloroform-Lösung auf das Protein-DNA-Gemisch gegeben. Dieses wurde für fünf Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert, so dass sich eine Zwei-Phasentrennung zeigte. Die obere Phase (bestehend aus Restprotein und DNA) wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt, auf welches wiederum 500 µl der Phenol/Chloroform-Lösung gegeben wurden. Nach einer erneuten fünfminütigen Zentrifugation bei 13 000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser wurde danach mit ca. 500 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (Verhältnis 24:1) gewaschen und wiederum bei 13 000 U/min abzentrifugiert. Hinterher wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und diesem ca. 500 µl Isopropanol zugegeben und der Ansatz geschwenkt bis zarte Fäden sichtbar wurden. Die DNA-Lösung wurde anschließend bei 13 000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA zwischen 15 und 30 Minuten im Exsikkator vakuumgetrocknet.

Die getrocknete DNA wurde danach wieder in 40-50 µl sterilem A. demin. gelöst und zum Quellen über Nacht bei 4 °C gelagert. Die gelöste DNA konnte bei 4 °C für zwei bis drei Wochen stabil gehalten werden. Das Ergebnis der DNA-Isolation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

Da auch die DNA von Staphylokokken-Referenzstämmen isoliert werden musste, soll an dieser Stelle noch auf eine bei diesen Bakterien bestehenden Besonderheiten eingegangen werden: Die Anreicherung in BHI-Bouillon wurde im Gegensatz zu der der Arcanobakterien im aeroben Milieu bei 37 °C unter ständigem Schütteln durchgeführt. Statt Lysozym zur Spaltung der Zellwand wurden 10 µl einer Lysostaphinlösung (1800 U/ml) zugegeben. Ansonsten gab es hinsichtlich des Protokolls keine Unterschiede zu Arcanobakterien.

3.2.11.3 Plasmidisolierung

Zur reinen Abklärung ob des Vorhandenseins von Plasmiden bei *A. pyogenes* wurde die Plasmidisolierung mittels Minilysatgewinnung durchgeführt. Bei Plasmidisolierungen, die eine spätere Bearbeitung des Plasmids zum Ziel hatten, wurde das Plasmid über Affinitätschromatographie gefällt. Dabei handelte es sich um die Plasmide, die auf Grund von Manipulationen rekombinant waren und deren „Insert“ später sequenziert werden sollte, um Plasmide, die Gene enthielten, die als Positivkontrolle in der PCR dienen sollten (s. Tab. 3.5), sowie um Plasmide, an denen eine Kartierung mittels Restriktionsenzymverdau vorgenommen werden sollte.

Alle „LMU-Arcanobakterien“ incl. der sensiblen Stämme wurden auf das Vorhandensein von Plasmiden mittels Minilysatherstellung untersucht.

Eine 48-72 Stunden alte Kolonie wurde in 2 ml BHI-Bouillon verrieben und über Nacht in 3 Vol% CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in ein 1,8 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten bei 7 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 100 µl Puffer P1 homogenisiert. Danach wurden 5 µl Lysozym (100 mg/ml) dazu pipettiert und bei 37 °C für eine halbe Stunde im Thermomixer inkubiert.

Anschließend wurden 200 µl Puffer P2 zugegeben und der Ansatz für fünf Minuten auf Eis belassen. Schließlich wurden 150 µl Minilysatlösung III hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz bei 13 000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert.

Der dabei entstandene Überstand wurde auf 1 ml -20 °C kaltes, absolutes Ethanol gegeben, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 30 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die im Gefäß verbleibende Plasmid-DNA mit 80%igem (v/v), -20 °C kaltem Alkohol gefällt. Diese Lösung wurde danach für 10 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 15 bis 30 Minuten im Exsikkator getrocknet und nachfolgend in 40 µl A. demin. resuspendiert.

Die Überprüfung auf das Vorhandensein eines Plasmids erfolgte über Gelelektrophorese, wobei 10 µl des Minilysats verwendet wurden. Bei positivem Ergebnis wurde anschließend eine Affinitätschromatographie mittels Midisäulen durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Plasmidisolierungen mittels Affinitätschromatographie in Form von Midisäulenerstellung (QIAfilter Plasmid Midi Kit, Fa. Qiagen) wurden mit den für die PCR als Positivkontrolle benötigten Gensonden, den eigenen *tet*-Klonen sowie mit dem Plasmid pCWEA4371 (s. Kap. 4) des Isolats 4371-03 durchgeführt. Bei allen Gensonden bzw. Klonen handelte es sich um Plasmide in *E. coli*-Stämmen. Bei der Extraktion unter Verwendung der Midisäulen wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Im Kit sind die benötigten Puffer 1-3, QBT, QC und QF bereits enthalten. Bei der Extraktion des Plasmids pCWEA4371 wurde die Methode insofern modifiziert, als dass der Ausgangsstamm 4371-03 nicht in 50 ml Luria-Bertani (LB)-Medium angezüchtet wurde, sondern in 50 ml BHI unter Zugabe von CO₂ bebrütet wurde. Außerdem wurde nach Zugabe des Puffers 1 (im Kit enthalten) 40 µl Lysozym pro Ansatz zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für eine halbe Stunde bei 37 °C im Wasserbad belassen. Das weitere Versuchsprotokoll entsprach den Herstellerangaben. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 80 µl A. demin. aufgelöst und bei -20 °C gelagert. Der Erfolg der Plasmidextraktion wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, wobei in gleicher Weise verfahren wurde wie bei den Minilysaten. Für nachfolgende PCR-Untersuchungen wurden die Eluate der Midisäulen ca. 1:100 (je nach Konzentration der Plasmidpräparation, die über die Stärke der Bande auf dem Agarosegel geschätzt wurde) verdünnt.

3.2.11.4 Untersuchungen mittels PCR

Für alle durchgeführten PCR-Untersuchungen wurde folgender Reaktionsansatz von 50 µl Volumen verwendet:

- 1,0 µl DNA
- 1,0 µl (0,2 nmol) von jedem Primer (*forward* und *reverse* Primer)
- 3,0 µl dNTP-Mix (120 µmol/dNTP)
- 5,0 µl 10 x Puffer mit Magnesiumsulfat
- 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 38,5 µl doppelt autoklaviertes A. demin.

Bei jeder durchgeführten PCR wurden eine Positivkontrolle (soweit vorhanden) und ein Ansatz mitgeführt, der statt DNA 1,0 µl doppelt autoklaviertes A. demin. enthielt (Negativkontrolle).

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler. Mit Ausnahme der Hybridisierungstemperatur (s. Tab. 3.7) wurde bei allen durchgeführten PCRs dieselbe Temperaturfolge mit jeweils 30 Zyklen gewählt:

1. 3 Minuten Denaturierung bei 95 °C
2. Zyklen von:
 - 1 Minute Denaturierung bei 95 °C
 - 1 Minute jeweilige Annealingtemperatur
 - 1 Minute Extension bei 72 °C
 - Beginn eines neuen Zyklus bzw. Ende der Amplifikation
3. 7 Minuten vollständige Extension bei 72 °
4. Kühlung auf 4 °C

Jedes Isolat wurde mittels der Screening-PCRs (s. Tab. 3.7) auf das Vorhandensein von *tet(W)*, *tet(33)* und *tet(Z)* überprüft. Bei positivem Ergebnis wurde die entsprechende PCR mit neuer DNA wiederholt, um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Zur Bestätigung von „*tet(W)*upfor-uprev“ wurde die PCR mit „*tet(W)*dofor-dorev“ wiederholt, bei allen anderen positiven Ergebnissen wurde dasselbe Primerpaar verwendet. Bei negativem Ergebnis wurde die PCR ebenfalls mit neuer DNA wiederholt. Bei Isolaten, deren MHK so hoch war, dass sie die Existenz eines weiteren *tet*-Gens wahrscheinlich machte, sowie bei Isolaten, die in jeder der ersten drei PCRs negativ waren, wurde zusätzlich einmalig das Vorhandensein von *tet(K)*, (L), (M), (O) und (Q) überprüft. Eine mögliche Existenz der Gene *tet(K)* und (L) konnte dabei mittels einer einzigen PCR überprüft werden (Pang *et al.*, 1993).

Tab. 3.7: Durchgeführte PCRs

Name der PCR	Primer forward	Primer reverse	Annealing-temperatur (°C)	erwartete Amplifikatlänge (in bp)	Positivkontrolle (DNA-Extraktion)
tet(W)upfor-upintrev	tet(W)upfor	tet(W)upintrev	56	694	-
tet(W)upfor-uprev*	tet(W)upfor	tet(W)uprev	55	954	tetW up1 (Midisäule)
tet(W)upfor-dointrev	tet(W)upfor	tet(W)dointrev	56	1324	-
tet(W)dofor-dorev*	tet(W)dofor	tet(W)dorev	55	1133	tetW do1 (Midisäule)
tet(W)dointfor-dorev	tet(W)dointfor	tet(W)dorev	56	640	-
tet(33)*	tet(33)for	tet(33)rev	57	698	tet33 3 (Midisäule)
tet(O)*	tet(O)for	tet(O)rev	54	730	pAT121 (Midisäule)
tet(Q)*	tet(Q)for	tet(Q)rev	63	895	pBSK1.2-5 (Midisäule)
tet(M)*	tetM3	tetM4	56	1116	CW44 (Midisäule)
tet(K)/(L)*	tet(L)for	tet(KL)rev	52	1051	CW49 (<i>tet(L)</i> ; Gesamtzell-DNA) CW29 (<i>tet(K)</i> ; Midisäule)
tetA(Z)rev-A(Z)for*	tetA(Z)rev	tetA(Z)for	64	870	pAGHD1 (Midisäule)
tetA(Z)rev-R(Z)end	tetA(Z)rev	tetR(Z)end	63	1616	pAGHD1 (Midisäule)
tetA(Z)intrev-R(Z)end	tetA(Z)intrev	tetR(Z)end	63	885	pAGHD1 (Midisäule)
tetA(Z)intrev-R(Z)intfor	tetA(Z)intrev	tetR(Z)intfor	63	525	pAGHD1 (Midisäule)
tetA(Z)endrev-A(Z)for	tetA(Z)endrev	tetA(Z)for	63	1117	pAGHD1 (Midisäule)
tetA(Z)extrev-R(Z)extfor	tetA(Z)extrev	tetA(Z)extfor	63	1971	pAGHD1 (Midisäule)

Bei allen mit „*“ gekennzeichneten Reaktionen handelt es sich um die zum Gen-Screening verwendeten PCRs

3.2.11.5 Klonierungen und Sequenzierungen

Das Amplifikat jeweils eines im Screening für ein *tet*-Gen positiven Isolats wurde zum Zwecke der Sequenzierung in einen Vektor kloniert. Dabei wurde der TOPO TA Cloning Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der den Vektor (pCR 2.1-TOPO-Vektor) und die Empfängerstämme (TOP 10F²-Zellen) zur Verfügung stellt. Hinsichtlich Aufreinigung des PCR-Produktes, Ligation des „Inserts“ in den Vektor und Transformation wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Die Klone wurden anschließend mittels des „Blue-White-Screenings“ selektiert. Dazu wurde der Klonierungsansatz nach vorangegangener Inkubation auf vier Selektionsplatten („LBZ-Platten“) ausgespatelt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Klone, die das Insert tragen,

sind auf den Selektionsplatten weiß, Klone ohne Insert dagegen blau. Ursache dafür ist die Umsetzung von in den Selektivplatten enthaltenem „X-Gal“ (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid) durch β -Galactosidase, was in einer Blaufärbung der Einzelkolonien auf dem Agar resultiert. Sowohl Vektor als auch Empfängerstamm enthalten jeweils einen Teil der genetischen Information für dieses Enzym. Da die Restriktionsstelle zum Einbau des Inserts in der für das Enzym kodierenden Region des Vektors liegt, kann bei erfolgter Ligation des Inserts keine β -Galactosidase im Empfängerstamm gebildet werden, die Einzelkolonien bleiben somit weiß. Zur zusätzlichen Selektion auf die Resistenzdeterminante des Vektors ist der Agar mit Ampicillin (100 μ g/ml) substituiert.

Ca. 50 der weißen Einzelkolonien und eine blaue Kolonie (Negativkontrolle) wurden auf ampicillinhaltigem Luria-Bertani-Agar (LB-Amp) subkultiviert und bei 37 °C für 24 Stunden aerob inkubiert. Danach wurden zunächst von ca. 20 Klonen einschließlich der Negativkontrolle Minilysate erstellt (s. Kap. 3.2.11.3). Anschließend wurde mittels Restriktionfragmentlängenanalyse mit *EcoRI* von wenigstens zwei Klonen die richtige Größe des Inserts überprüft (s. Kap. 3.2.11.6). Die Plasmide beider Klone wurden mittels Affinitätschromatographie (s. Kap. 3.2.11.3) aufgereinigt, durch *EcoRI*-Restriktionsverdau noch einmal überprüft, bezüglich ihrer Konzentration untersucht und zum Sequenzieren an die Firmen MWG, Ebersberg oder AGOWA, Berlin geschickt. Die Sequenzierung erfolgte auf beiden DNA-Strängen. Die Auswertung der Ergebnisse wurde mittels der „Lasergene“-Software (DNASTAR, Konstanz) durchgeführt.

3.2.11.6 Restriktionsfragmentlängenanalyse

Restriktionsfragmentlängenanalysen wurden mittels DNA-Verdau durch die Endonuklease *EcoR* I durchgeführt. Der Klonierungsvektor pCR 2.1. verfügt nur über eine *EcoR* I-Erkennungssequenz, die an der Insertionsstelle des Vektors lokalisiert ist. Durch *EcoR* I kann also im Vergleich zu PCR-Produkt und Negativkontrolle die Größe des Inserts eruiert und damit das Ergebnis der Klonierung überprüft werden.

Für das Plasmid pCWEA4371 wurde neben *EcoR* I auch *Hind* III und *EcoR* V benutzt, um daraus Schlussfolgerungen über die Größe des Plasmids bzw. vorhandene Schnittstellen zu ziehen. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Material und Methoden

- 1,5 µl *EcoR I/Hind III/EcoR V*-Puffer
- 1,0 µl Bovines Serumalbumin (BSA)
- 5-10 µl DNA (geschätzt nach Stärke der Bande des Plasmids auf dem Agarosegel)
- 1 µl *EcoR I/Hind III/EcoR V*
- ad 15 µl Aqua demin.

Die Inkubation betrug eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer. Anschließend wurde die Länge des Restriktionsfragmentes mittels Gelelektrophorese auf einem 1-1,5%igen Gel (abhängig von der erwarteten Größe des Fragments) überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung

Phänotypisch untersucht wurden die Koloniemorphologie, das mikroskopische Bild, das Vorhandensein bakterieller Katalase, die Verstoffwechslung von Xylose sowie die proteolytische Fähigkeit mittels Löffler-Serum (s. Abb. 4.1). In einigen Fällen wurde zudem noch das API-Coryne-Testsystem durchgeführt (Ergebnisse s. Anhang Tab. 8.1 und 8.2). Die Ergebnisse der bakteriologischen Routinediagnostik stimmten hierbei mit den Resultaten der eigenen Untersuchungen mit Ausnahme eines Bakterienstammes überein. Bei den „BfT-Arcanobakterien“ wurden zwei Isolate eruiert, die fälschlicherweise als *A. pyogenes* identifiziert worden waren. Diese drei Stämme wurden aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.



Abb. 4.1: Darstellung des proteolytischen Effekts von *A. pyogenes* auf dem Löffler-Serum: Im Gegensatz zur Negativkontrolle verursachen die beiden Wildstämme (4855-03 und 4939-03) sowie der *A. pyogenes*-Referenzstamm (DSM 20594) eine deutliche Vertiefung (Pfeil) unterhalb des Bakterienrasens.

4.2 Resistenzmuster der „LMU-Arcanobakterien“ gegenüber ausgewählten Antibiotika

Zusätzlich zu den „LMU-Arcanobakterien“ wurden auch die *A. pyogenes*-Referenzstämme DSM 20630 und DSM 20594 in die Untersuchung miteinbezogen.

Die Referenzstämme *Staphylococcus aureus* (DSM 2569; ATCC 25922) und *Enterococcus faecalis* (DSM 2570; ATCC 29212) wiesen auch bei mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre in Übereinstimmung mit den in dem CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebenen Grenzwerten Koloniewachstum in Anwesenheit der drei getesteten Antibiotika auf (s. auch Tab. 3.4).

Von den getesteten *A. pyogenes*-Isolaten wuchs keines auf den mit 0,125 µg/ml bestückten Penicillinblutplatten.

Auf den Erythromycinplatten wuchsen sechs der 55 getesteten Isolate, was einem Anteil von 10,91 % resistenzverdächtigere Isolate entspricht.

Auf den mit 5 µg/ml Tetracyclin angereicherten Blutplatten wuchsen 36 der Teststämme, der Anteil der resistenzverdächtigen Bakterienstämme lag somit bei 65,45 %.

Die einzelnen Resultate sind Tabelle 8.3 zu entnehmen.

4.3 Etablierung der Bouillonmikrodilution für *A. pyogenes*

4.3.1 Untersuchungen zur Einflussnahme von Inkubationsbedingungen, Inokulumdichte und Nährmedium auf die MHK

Alle Vorversuche wurden mit zwei repräsentativen Wildstämmen (1257-03 vom Schwein und 4939-03 vom Rind) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle diente der *A. pyogenes* Referenzstamm DSM 20630 (ATCC 19411).

Untersucht werden sollte das Wachstum von Arcanobakterien unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen sowie in den in der Literatur beschriebenen Medien CaMHB, CaMHB-2%FKS, CaMHB-2%Pb, CaMHB-5%Pb und VFM.

4.3.1.1 Allgemeine Wachstumseigenschaften in verschiedenen Medien/Atmosphären

Bei der Subkultivierung der Arcanobakterien auf Blutplatte und nachfolgender Bebrütung unter 3 Vol% CO₂ bzw. unter aeroben Bedingungen wurde deutlich, dass bei Inkubation mit

3 Vol% CO₂ ein wesentlich besseres Wachstum zu erreichen ist. Die Identifizierung von Einzelkolonien war unter Zugabe von CO₂ bereits nach 24 Stunden an Hand der Hämolysezone, bei aerober Bebrütung dagegen erst nach 48 Stunden (s. Abb. 4.2) möglich. Die Koloniemorphologie war jedoch erst nach 48 Stunden und nur bei Bebrütung mit CO₂ deutlich erkenn- und beurteilbar.

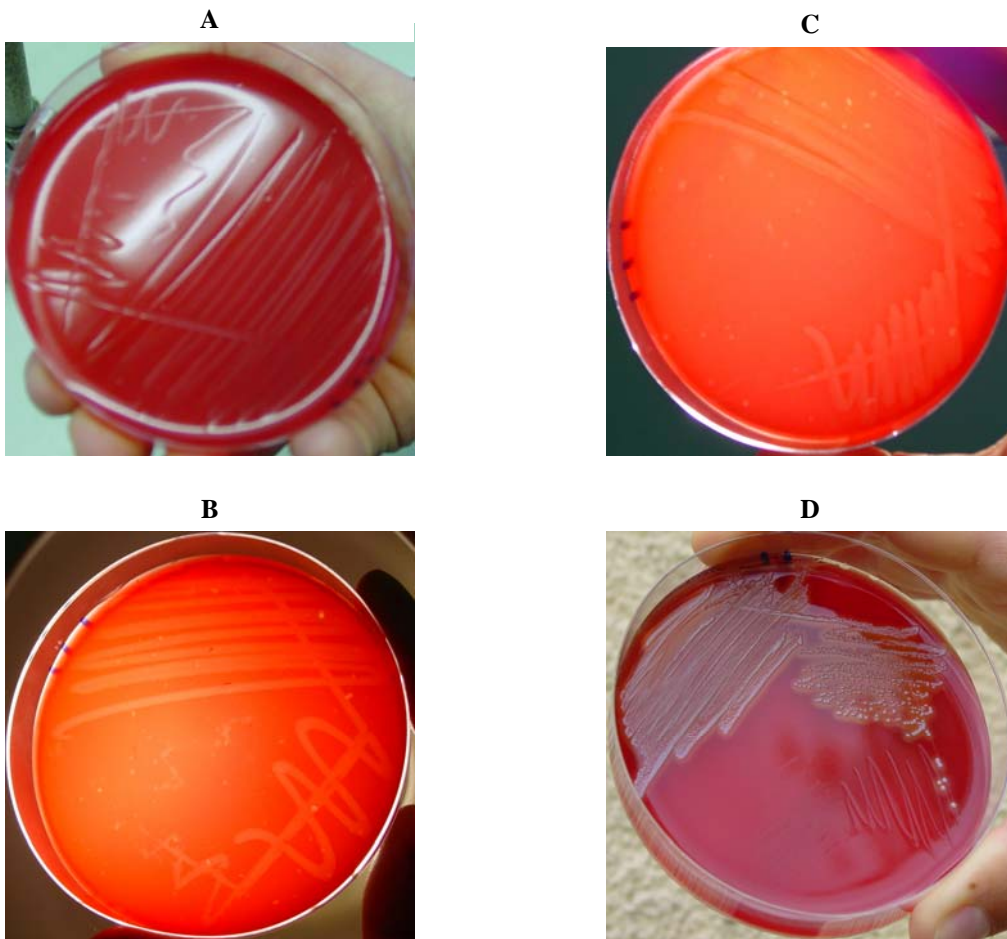


Abb. 4.2: Wachstum von *A. pyogenes* unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils das Bakterienwachstum auf Blutagar bei aerober Bebrütung nach (A) 24 Stunden und (B) 48 Stunden. Die Abbildungen C und D zeigen dasselbe Bakterium unter mikroaerophiler Inkubation nach (C) 24 und (D) 48 Stunden.

Bei der Wachstumsbeurteilung in den in der Literatur genannten Flüssig-Medien (CaMHB-2%Pb, CaMHB-2%FKS und CaMHB-5%Pb) bzw. den Standardmedien für hochanspruchsvolle Bakterien (VFM) und für anspruchslose Erreger (CaMHB) bestätigte sich dieser Eindruck bei allen drei Isolaten (s. Abb. 4.3). In allen Medien war in dem unter CO₂-Zusatz inkubierten Versuchsansatz ein besseres Wachstum in Form einer stärkeren Trübung

zu erkennen. Im Folgenden werden die unterschiedlich ausgeprägten Trübungen in verschiedenen Graden angegeben. Dabei steht „Grad 1“ für keine Trübung, „Grad zwei“ für geringe Trübung, „Grad 3“ für deutliche Trübung und „Grad 4“ für starke Trübung jeweils im Vergleich zum sterilen, nicht bebrüteten Medium.

CaMHB-aerob wies nach 24 Stunden hinsichtlich der Transparenz des Mediums keinerlei Veränderung auf und wurde daher mit Grad 1 bewertet. CaMHB-CO₂, CaMHB-2%Pb-aerob und CaMHB-2%FKS-aerob zeigten in etwa dieselbe mäßige Trübung, wobei in letzteren ein etwas deutlicheres Wachstum erkennbar war. Der Trübungsgrad von CaMHB-CO₂ wurde daher als Grad 2, der von CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb als Grad 2-3 eingestuft. Eine viel stärkere Bakterienzunahme war in CaMHB-2%Pb und CaMHB-2%FKS unter mikroaerophiler Bebrütung zu beobachten, weswegen beide dem Trübungsgrad 3-4 zugeordnet wurden. CaMHB-5%Pb und VFM wiesen unter aerober Inkubation ebenfalls einen Trübungsgrad von 3-4 auf, unter mikroaerophiler Inkubation war die Dichtigkeit im Vergleich zu den anderen Medien nur wenig erhöht, die Trübung entsprach Grad 4.

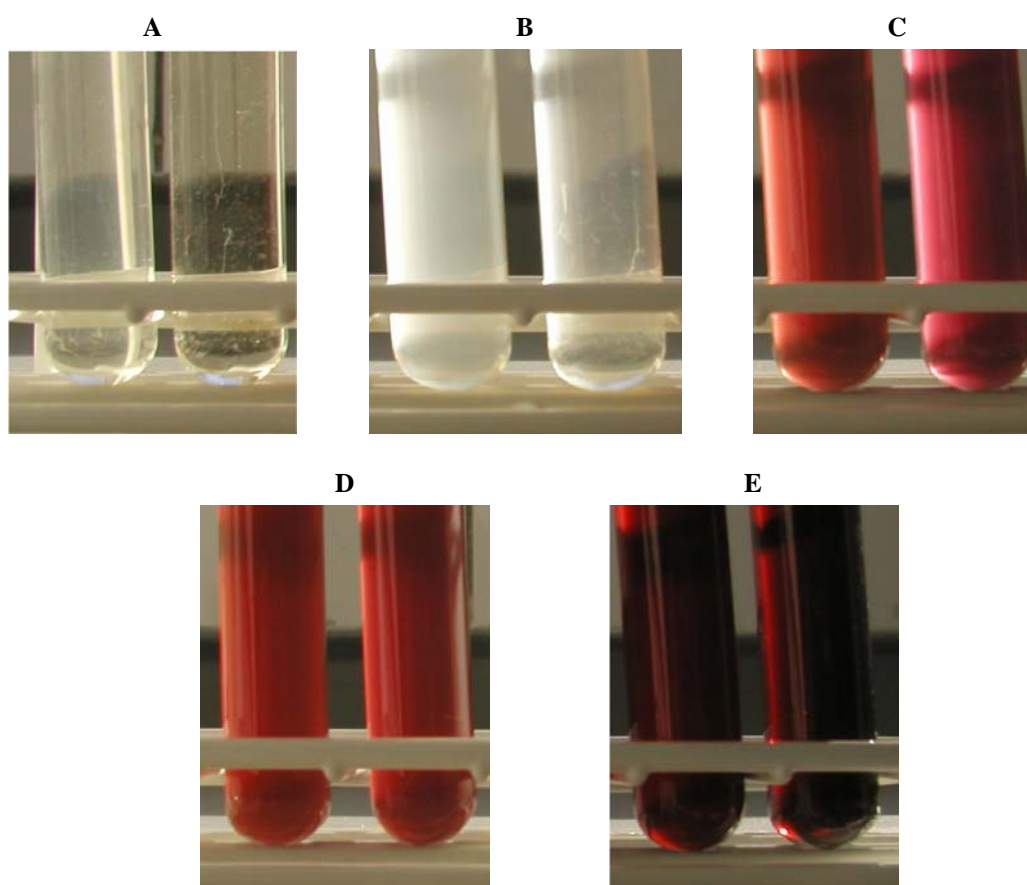


Abb. 4.3: Vergleich des Wachstums eines *A. pyogenes*-Stammes in verschiedenen Medien und unterschiedlichen atmosphärischen Bedingungen:
A: CaMHB; B: CaMHB-2%FKS; C: CaMHB-2%Pb; D: VFM; E: CaMHB-5%Pb.
Das linke Medium wurde jeweils unter CO₂-Zusatz, das rechte unter aeroben Bedingungen inkubiert; Isolat: *A. pyogenes*-Typstamm DSM 20630

Die Bestimmung der Inokulumdichte für alle drei untersuchten Isolate ergab in CaMHB gemäß dem im Material und Methoden-Teil dargestellten Vorgehen eine errechnete Inokulumdichte von $1,1$ bis $4,0 \times 10^6$ KBE/ml.

4.3.1.2 Untersuchungen zur Einstellung der vorgeschriebenen Inokulumdichte

Mittels der *A. pyogenes*-Referenzstämme DSM 20630, DSM 20594 sowie der beiden Wildisolate 4939-03 und 1257-03 wurden Untersuchungen zur Einstellung der vorgeschriebenen Inokulumdichte gemacht.

Dabei wurde zunächst die tatsächliche Bakteriendichte einer zum McF 0,5 eingestellten Suspension von *A. pyogenes* untersucht. In Abbildung 4.4 ist die Verteilung der Mittelwerte von jedem getesteten Bakterium dargestellt.

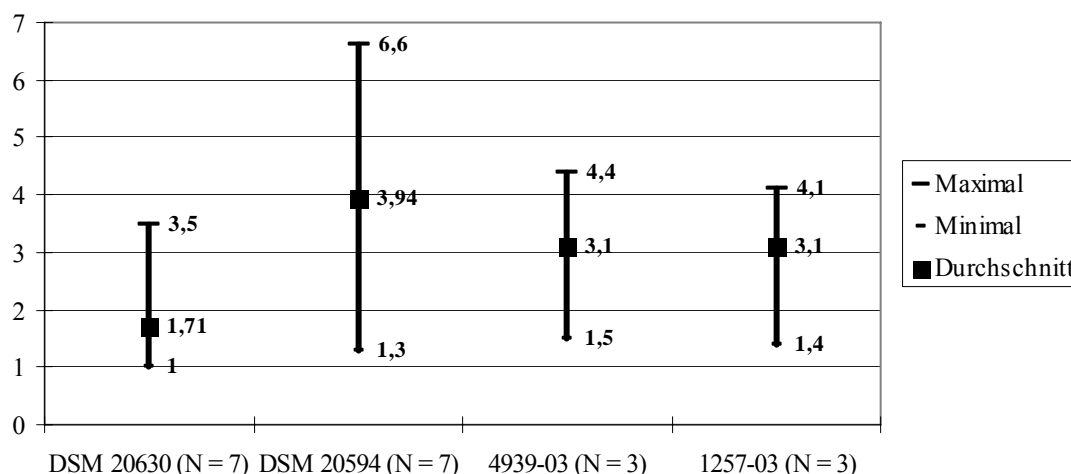


Abb. 4.4: Spannweite der tatsächlichen Bakteriendichte einer zum McF 0,5 adjustierten Bakteriensuspension von vier *A. pyogenes*-Isolaten in Anzahl Einzelkolonien $\times 10^8$ KBE/ml.

Aus diesen Werten ergibt sich, dass die durchschnittliche Bakteriendichte einer zum McF 0,5 eingestellten Bakteriensuspension von Arcanobakterien bei $2,91 \times 10^8$ KBE/ml liegt und damit das Dreifache der von dem CLSI-Dokument M31-A2 (2002) angegebenen Dichte beträgt. In Anbetracht der Höhe und Spannweite der Werte wurde im weiteren Verlauf der Arbeit bei durchgeführten Bouillonmikrodilutionsversuchen die Menge der Bakteriensuspension, die in 10 ml Medium überführt wurde, von $50 \mu\text{l}$ auf $15 \mu\text{l}$ gesenkt (entsprechend einer Verdünnung von 1:667). In die nachfolgende Auswertung gingen alle Dichtewerte mit ein, die im Rahmen der MHK-Untersuchungen der „BfT-“ und der „LMU-Arcanobakterien“ ermittelt wurden (Doppelansätze galten als ein Wert, daher $N = 167$). Mit dieser Modifikation war es möglich, im Bereich von $0,8-10 \times 10^5$ KBE/ml zu bleiben. Der

Mittelwert aller Ergebnisse lag bei $5,63 \times 10^5$ KBE/ml, der Median bei $5,8 \times 10^5$ KBE/ml, die Standardabweichung bei 2,40.

4.3.1.3 Beurteilung der Ablesbarkeit der MHK in den Medien CaMHB, CaMHB-2%FKS, CaMHB-2%Pb, CaMHB-5%Pb und VFM

Mit CaMHB ohne Supplementierung war bei allen drei Isolaten weder unter CO_2 -Zusatz noch unter aeroben Inkubationsbedingungen bakterielles Wachstum sichtbar (s. Abb. 4.5)



Abb. 4.5: Kein sichtbares Wachstum von Arcanobakterien in der Mikrotiterplatte bei Inkubation mit CaMHB unter CO_2 -Zusatz (Isolat: DSM 20630).

Mit VFM und in geringerem Maße auch mit CaMHB-5%Pb war die MHK-Ablesung durch nicht-bakterielle Plaquebildung („Pseudoknöpfe“) erschwert (s. Abb. 4.6). Dass es sich dabei tatsächlich um Bouillon-Plaques handelt, wurde durch nachfolgendes Ausspateln der Knöpfe auf Blutagar, wobei kein bakterielles Wachstum beobachtet werden konnte, bestätigt.

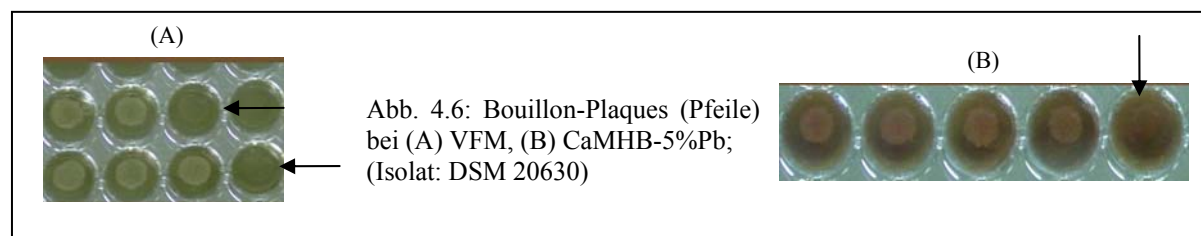


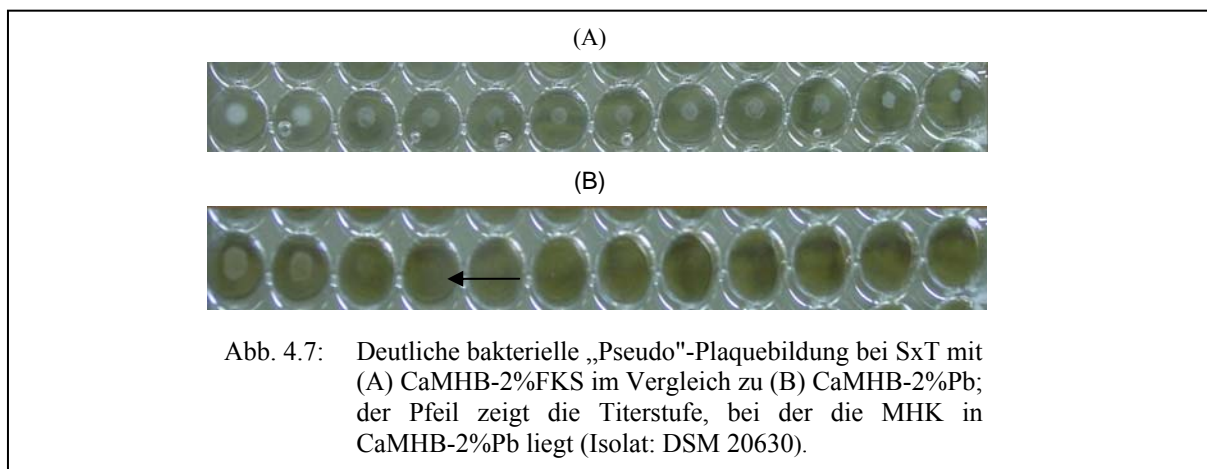
Abb. 4.6: Bouillon-Plaques (Pfeile) bei (A) VFM, (B) CaMHB-5%Pb; (Isolat: DSM 20630)

Bei der Testung von Sulfamethoxazol/Trimethoprim (SxT) in CaMHB-2%FKS war ebenfalls die Bildung von Plaques zu beobachten, die im Gegensatz zum oben beschriebenen Phänomen bakterienhaltig waren (s. Abb. 4.7).

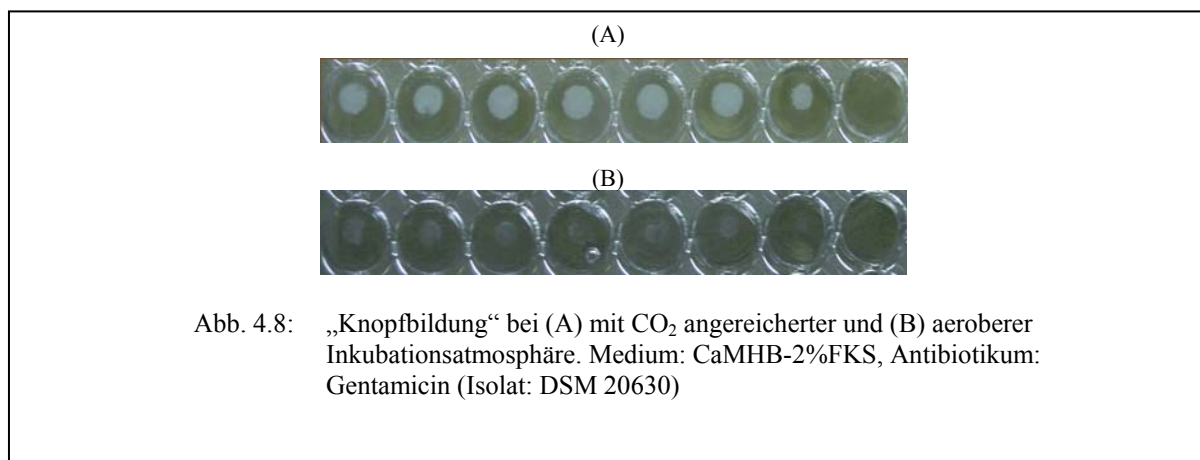
Die sog. „Knopfbildung“ („echtes“ Bakterienwachstum; je ausgeprägter der „Knopf“, desto einfacher lässt sich die MHK ablesen) war bei CaMHB-2%FKS ausgeprägter als bei allen

Ergebnisse

anderen Medien, wodurch die MHK-Werte aller anderen getesteten Antiinfektiva mit dieser Bouillon am besten zu erkennen waren.



Die Ablesung von unter Zusatz von 3 Vol% CO₂ inkubierten Mikrotiterplatten ist im Vergleich zu aerob bebrüteten auf Grund des besseren Wachstums und der damit verbundenen deutlichen „Knopfbildung“ einfacher (s. Abb. 4.8).



4.3.1.4 Einfluss von Medium und Atmosphäre auf die MHK

In Tabelle 4.1 bis 4.3 sind die Ergebnisse der MHK-Testung (der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt, bei unterschiedlichen MHK-Werten ging der jeweils höhere in die Bewertung ein) der beiden Wildstämme 1257-03 und 4939-03, sowie des *A. pyogenes*-Referenzstammes DSM 20630 angegeben. Die Inokulumdichte lag bei allen Messungen im Bereich von 2-8 x 10⁵ KBE/ml.

Ergebnisse

Tab. 4.1: MHK-Werte von Isolat 1257-03 in verschiedenen Medien und Inkubationsbedingungen auf NLV32-Mikrotiterplatte

	Bebrütung in aerober Atmosphäre				Bebrütung unter CO ₂ -Supplementierung			
	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM
Tulathromycin	0,125	0,06	0,03	0,25	0,125	0,125	0,06	0,25
Gentamicin	2	2	2	8	2	2	2	8
Enrofloxacin	1	1	1	1	1	1	1	2
SxT	0,125*	0,06	0,06	0,125	0,25	0,06	0,06	0,125
Spiramycin	0,5	0,06	0,06	0,25	0,12*	0,06	0,06	0,25
Tetracyclin	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25
Neomycin	8	4	4	32	8	4	4	32
Chloramphenicol	2	2	2	1	2	2	1	2

* nur ein MHK-Wert vorhanden, der zweite Wert war auf Grund der Plauebildung nicht ablesbar

Tab. 4.2: MHK-Werte von Isolat 4939-03 in verschiedenen Medien und Inkubationsbedingungen auf NLV32-Mikrotiterplatte

	Bebrütung in aerober Atmosphäre				Bebrütung unter CO ₂ -Supplementierung			
	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM
Tulathromycin	0,125	0,06	0,06	0,125	0,25	0,06	0,06	0,25
Gentamicin	2	1	0,5	8	2	1	1	8
Enrofloxacin	1	0,5	1	1	1	1	1	1
SxT	0,06	0,03	0,06	0,25	0,06	0,03	0,06	0,25
Spiramycin	0,125	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06	0,06	0,125
Tetracyclin	16	16	32	16	16	16	32	32
Neomycin	8	4	4	32	8	4	4	32
Chloramphenicol	2	2	1	1	2	2	2	2

Tab. 4.3: MHK-Werte des *A. pyogenes*-Typstammes DSM 20630 in verschiedenen Medien und Inkubationsbedingungen auf NLV32-Mikrotiterplatte

	Bebrütung in aerober Atmosphäre				Bebrütung unter CO ₂ -Supplementierung			
	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM	CaMHB-2%FKS	CaMHB-2%Pb	CaMHB-5%Pb	VFM
Tulathromycin	0,03	0,03	0,03	0,125	0,06	0,03	0,03	0,125
Gentamicin	1	1	0,5	8	1	1	0,5	8
Enrofloxacin	1	1	1	1	1	1	1	2
SxT	0,25*	0,12	0,25	0,25	0,12	0,25	0,5	0,5
Spiramycin	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06
Tetracyclin	0,25	0,125	0,25	0,125	0,25	0,25	0,5	0,25
Neomycin	4	2	2	32	4	2	2	32
Chloramphenicol	2	1	1	0,5	2	2	2	1

* nur ein MHK-Wert vorhanden, der zweite Wert war auf Grund der Plauebildung nicht ablesbar

Das Medium CaMHB ist in obigen Tabellen nicht enthalten, da hiermit, wie bereits berichtet, keine MHK-Ablesung möglich war. Bei der Sulfonamidkombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim wurde die MHK in diesen Tabellen trotz Doppelansatz z.T. nur von einem

Wert angegeben, da der zweite auf Grund der Pseudo-Plauebildung nicht ablesbar war. Dies betraf ausschließlich Werte, die mit CaMHB-2%FKS ermittelt wurden.

Hinsichtlich der MHK eines Antibiotikums ergaben sich in den verschiedenen Medien Unterschiede von bis zu vier Titerstufen zwischen dem höchsten und dem niedrigsten gemessenen Wert. Bis auf eine Ausnahme (SxT-MHK-Wert von 1257-03 in CaMHB-2%FKS) zeigte VFM in den Fällen, in denen die MHK-Werte mindestens drei Titerstufen auseinander lagen, die höchste MHK (s. Tab. 4.4)

Die größten Unterschiede zeigten sich bei der Testung von Neomycin (die Werte aller Isolate lagen in allen Medien um mindestens drei Stufen auseinander) und Gentamicin (die MHK-Werte des Wildstammes 4939-03 und des Referenzstammes DSM 20630 lagen um mindestens drei Titerstufen auseinander).

Auf Grund der in Abschnitt 4.3.1.3 dargestellten besseren Auswertbarkeit von CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb wurden die in diesen beiden Medien ermittelten MHK-Werte getrennt von den übrigen Nährbouillons miteinander verglichen (s. Tab. 4.5 und 4.6). In den nachfolgend aufgelisteten Übereinstimmungen/Unterschieden zwischen den ermittelten MHK-Werten dieser beiden Medien war zu beobachten, dass im Falle einer Abweichung stets der im CaMHB-2%FKS ermittelte Wert größer war als der im mit 2 % IPb supplementierten CaMHB-Medium.

Bei den unter aeroben Bedingungen ermittelten MHK-Werten (N = 24) zeigten 37,5 % keinen, und 54,17 % einen Unterschied in Höhe von einer Titerstufe. Ein MHK-Wert (von Neomycin) war in CaMHB-2%FKS um zwei Stufen höher als in CaMHB-2%Pb, und ein Wert (von SxT) im mit FKS supplementierten Medium wich um mehr als zwei Titerstufen vom Vergleichswert ab.

Bei den unter Zugabe von CO₂ ermittelten Werten (N = 24) gab es bei 54,17 % keinen Unterschied beim Vergleich der beiden Medien, 41,67 % wiesen eine Differenz von einer Titerstufe auf. Lediglich bei einem Isolat lag die Differenz der MHK von Tulathromycin bei zwei Titerstufen, wobei CaMHB-2%FKS den höheren Wert aufwies.

Eine Übereinstimmung der in diesen beiden Medien ermittelten MHK-Werte ergab sich bei allen drei Isolaten bei der Testung von Chloramphenicol und Enrofloxacin in mit CO₂ supplementierter Inkubationsatmosphäre. Im Gegensatz hierzu divergierten die in den unterschiedlichen Atmosphären ermittelten MHK-Werte bei der Testung von SxT und Neomycin sowohl unter aeroben als auch in mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre konsequenterweise für alle drei getesteten Erreger.

Ergebnisse

Tab. 4.4: Parallelen zwischen MHK-Differenz und Medium

		Aerobe Inkubation			Inkubation unter CO ₂ -Supplementierung		
		Titerstufen- Unterschied zwischen höchstem und niedrigstem MHK- Wert	Höchster Wert in	Niedrigster Wert in	Titerstufen- Unterschied zwischen höchstem und niedrigsten MHK- Wert	Höchster Wert in	Niedrigster Wert in
Tulathro- mycin	1257-03	3	D	C	2	D	C
	4939-03	1	A;D	B;C	2	A;D	B;C
	DSM 20630	2	D	A;B;C	2	D	B;C
Gentamicin	1257-03	2	D	A;B;C	2	D	A;B;C
	4939-03	4	D	C	3	D	C
	DSM 20630	4	D	C	4	D	B;C
Enro- floxacin	1257-03	0	alle gleich		1	D	A;B;C
	4939-03	1	A;C;D	B	0	alle gleich	
	DSM 20630	0	alle gleich		1	D	A;B;C
SxT	1257-03	3	A	B;C	2	D	B;C
	4939-03	3	D	B	2	D	A;B;C
	DSM 20630	1	A;C;D	B	2	C;D	A
Spiramycin	1257-03	1	A;D	B;C	2	A	B;C
	4939-03	1	A	B;C;D	1	A;D	B;C
	DSM 20630	0	alle gleich		1	C	A;B;D
Tetracyclin	1257-03	1	A	B;C;D	1	A;C	B;D
	4939-03	1	C	A;B;C	1	C;D	A;B
	DSM 20630	1	A;C	B;D	1	C	A;B;D
Neomycin	1257-03	3	D	B;C	3	D	B;C
	4939-03	3	D	B;C	3	D	B;C
	DSM 20630	4	D	B;C	4	D	B;C
Chlor- amphenicol	1257-03	1	A;B;C	D	1	A;B;D	C
	4939-03	1	A;B	C;D	0	alle gleich	
	DSM 20630	2	A	D	1	A;B;C	D

Legende:

- A CaMHB-2%FKS
- B CaMHB-2%Pb
- C CaMHB-5%Pb
- D VFM

Grau unterlegt sind alle Werte für MHK-Abweichungen > 2 Titerstufen

Ergebnisse

Tab. 4.5: Vergleich der in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb ermittelten MHK-Werte aller Isolate in aerober Inkubationsatmosphäre

	Anzahl identischer Titerstufen	Anzahl Titerstufen-Differenz = 1	Anzahl Titerstufen-Differenz = 2	Anzahl Titerstufen-Differenz > 2
Tulathromycin	1	2		
Gentamicin	2	1		
Enrofloxacin	2	1		
SxT		2		1
Spiramycin	1	2		
Tetracyclin	1	2		
Neomycin		2	1	
Chloramphenicol	2	1		
Summe	9 (37,5 %)	13 (54,17 %)	1 (4,17 %)	1 (4,17 %)

Tab. 4.6: Vergleich der in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb ermittelten MHK-Werte aller Isolate in mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre

	Anzahl identischer Titerstufen	Anzahl Titerstufen-Differenz = 1	Anzahl Titerstufen-Differenz = 2	Anzahl Titerstufen-Differenz > 2
Tulathromycin	1	1	1	
Gentamicin	2	1		
Enrofloxacin	3			
SxT		3		
Spiramycin	1	2		
Tetracyclin	2	1		
Neomycin		3		
Chloramphenicol	3			
Summe	13 (54,17 %)	10 (41,67 %)	1 (4,17 %)	

Zusammenfassend lässt sich obigen Tabellen entnehmen, dass unter aeroben Bedingungen 91,67 % der MHK-Werte im Vergleich zwischen FKS- und IPb-supplementiertem Medium um nicht mehr als eine Titerstufe voneinander abweichen.

Der Übereinstimmungsgrad unter CO₂-supplementierter Atmosphäre betrug 95,84 % bezogen auf Abweichungen um höchstens eine Titerstufe. In Tabelle 4.7 sind die Übereinstimmungen bzw. Abweichungen der MHK in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen zusammengefasst.

Bei den ermittelten 96 Vergleichswerten stimmten 71 % in ihrer MHK überein. Bei 28 % betrug die Differenz eine Titerstufe, wobei in 93 % dieser Werte die MHK in mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre höher war. Ein Isolat zeigte bei der Testung von Sulfamethoxazol/Trimethoprim nach aerober Bebrütung in CaMHB-2%FKS eine um zwei Stufen höhere MHK im Vergleich zu der nach mikroaerophiler Inkubation ermittelten MHK.

Tab. 4.7: Einfluss der atmosphärischen Inkubationsbedingungen auf die MHK bei gleichem Medium

	Beide MHK-Werte identisch	Beide MHK-Werte mit Titerstufen-Differenz = 1		Beide MHK-Werte mit Titerstufen-Differenz = 2		Beide MHK-Werte mit Titerstufen-Differenz > 2	
		Aerob<CO ₂	Aerob>CO ₂	Aerob<CO ₂	Aerob>CO ₂	Aerob<CO ₂	Aerob>CO ₂
Tulathromycin	8	4					
Gentamicin	11	1					
Enrofloxacin	9	3					
SxT	6	4	1		1		
Spiramycin	9	3					
Tetracyclin	7	5					
Neomycin	12						
Chloramphenicol	6	5	1				
Summe	68 (70,83 %)	27 (28,13 %)		1 (0,01 %)			

4.3.1.5 Einfluss von FKS auf die MHK von Tetracyclin

Um eine möglicherweise vorhandene Inhibition von Tetracyclin durch FKS auszuschließen, wurde mit dem *A. pyogenes*-Wildisolat 1257-03 und dem MHK-Referenzstamm *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922) eine Bouillonmikrodilution in Mikrotiterplatten durchgeführt, die mit einer selbst hergestellten Verdünnungsreihe von Tetracyclin bestückt wurden (s. Material und Methoden). Verglichen wurde die MHK bei verschiedenen Konzentrationen von FKS in CaMHB. Bei dem *E. coli*-Referenzstamm war in allen Konzentrationen dieselbe MHK ablesbar, der *A. pyogenes*-Stamm wies bei CaMHB mit 0,5 % FKS eine Abweichung von einer Titerstufe auf (s. Tab. 4.8), ohne Zusatz war kein Wachstum erkennbar.

Tab. 4.8: MHK-Werte Tetracyclin in Abhängigkeit von der FKS-Konzentration in CaMHB

	CaMHB supplementiert mit					
	8 % FKS	4 % FKS	2 % FKS	1 % FKS	0,5 % FKS	0 % FKS
<i>E. coli</i> , DSM 1103	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
<i>A. pyogenes</i> , 1257-03	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	kein Wachstum

4.3.1.6 Einfluss der Inokulumsdichte auf die MHK mehrerer Antibiotika

Durch verschiedene Suspensionsmengen (5, 10, 15, 25, 50, 100 und 200 µl), die in jeweils 10 ml CaMHB-2%FKS pipettiert wurden, wurde der Einfluss der Inokulumsmenge auf die MHK mehrerer Antibiotika untersucht. Der Versuch wurde mit den beiden Wildstämmen 1257-03 und 4939-03 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inokulumsmenge keinen Einfluss auf die MHK der untersuchten Wirkstoffe hatte (s. Tab. 4.9 und 4.10).

Tab. 4.9: MHK-Werte verschiedener Antibiotika von Isolat 1257-03 bei unterschiedlicher Suspensionsmenge bzw. Inokulumsdichte

Suspensionsmenge (µl) in 10 ml CaMHB-2%FKS	Inokulumsdichte (x 10 ⁵ KBE/ml)	MHK Neomycin (µg/ml)	MHK Nitrofurantoin (µg/ml)	MHK Amoxicillin/ Clavulansäure (µg/ml)
5	1,7	8	16	0,12
10	4,8	8	16	0,12
15	3,8	8	8	0,12
25	10,1	8	16	0,12
50	6,7	8	16	0,12
100	15,7	8	16	0,12
200	≥ 50	8	16	0,12

Tab. 4.10: MHK-Werte verschiedener Antibiotika von Isolat 4939-03 bei unterschiedlicher Suspensionsmenge bzw. Inokulumsdichte

Suspensionsmenge (µl) in 10 ml CaMHB-2%FKS	Inokulumsdichte (x 10 ⁵ KBE/ml)	MHK Gentamicin (µg/ml)	MHK Streptomycin (µg/ml)	MHK Ampicillin (µg/ml)
5	2,2	1	128	0,06
10	5	1	256	0,06
15	9,2	1	128	0,06
25	9,4	1	128	0,06
50	24,8	1	128	0,06
100	49,7	1	256	0,06
200	≥ 50	1	256	0,06

4.3.2 Untersuchungen zum allgemeinen Wachstumsverhalten von *A. pyogenes*

Der Einfluss von Inkubationsbedingungen und Nährmedium auf das Wachstumsverhalten von Arcanobakterien wurde mittels der Erstellung von Wachstumskurven untersucht. Von jedem der drei Stämme wurden je Inkubationsbedingung (aerobe und unter Zusatz von 3 Vol%CO₂ erfolgte Bebrütung) zwei Wachstumskurven über 48 Stunden angefertigt. Bei zweien der

Isolate wurde zusätzlich das Wachstum in von CaMHB-2%FKS mit CaMHB-2%Pb verglichen. In allen nachfolgenden Diagrammen wurden die durch die Nachtpausen fehlenden Werte interpoliert.

Der Mittelwert aller „0h-Werte“ (N = 8) lag bei $2,44 \times 10^4$ KBE/ml pro Ansatz, was einem Wert von $2,44 \times 10^8$ KBE/ml in der Ausgangssuspension entspricht. Bei den Untersuchungen hinsichtlich der verschiedenen Inkubationsbedingungen (aerob vs. angereichert mit 3 Vol% CO₂) zeigte sich analog zur Literatur (Schaal, 1986, Guérin-Faublée *et al.*, 1993 b) bei CO₂-angereicherter Atmosphäre ein deutlich beschleunigtes bakterielles Wachstum (s. Abb. 4.9 bis 4.11).

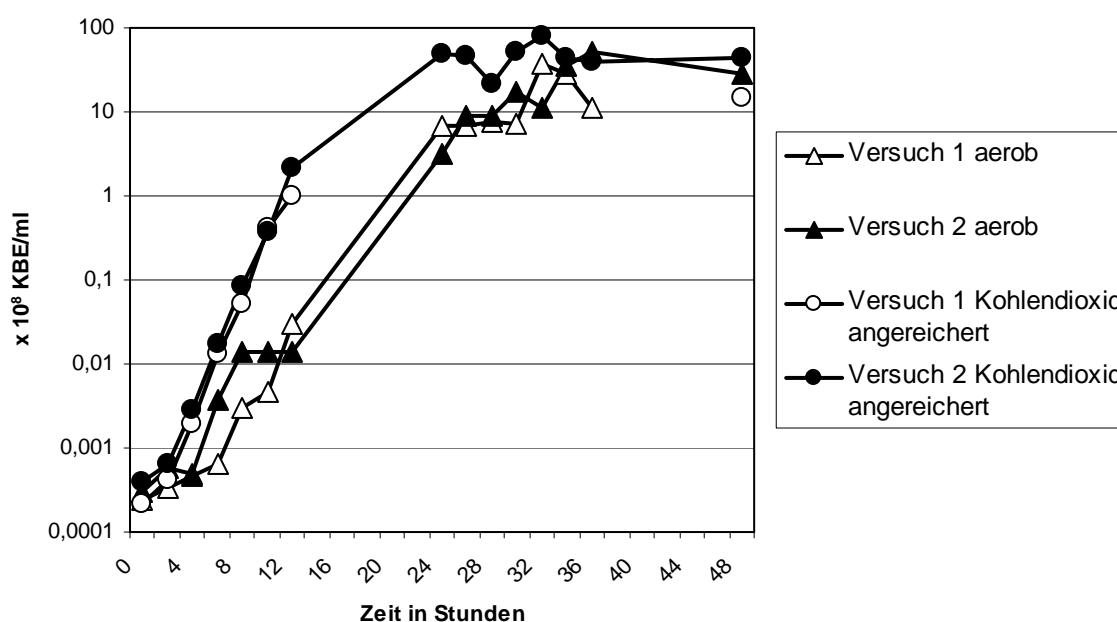


Abb. 4.9: Einfluss der atmosphärischen Bedingungen auf das Wachstumsverhalten des *A. pyogenes*-Wildstammes 1257-03. Auf Grund des nahezu identischen Kurvenverlaufs unter CO₂-angereicherten Inkubationsbedingungen wurde auf eine Wiederholung der 24 bis 36 Stunden-Werte von Versuch 1 (CO₂-Supplementierung) verzichtet; Medium: CaMHB-2%FKS

Ergebnisse

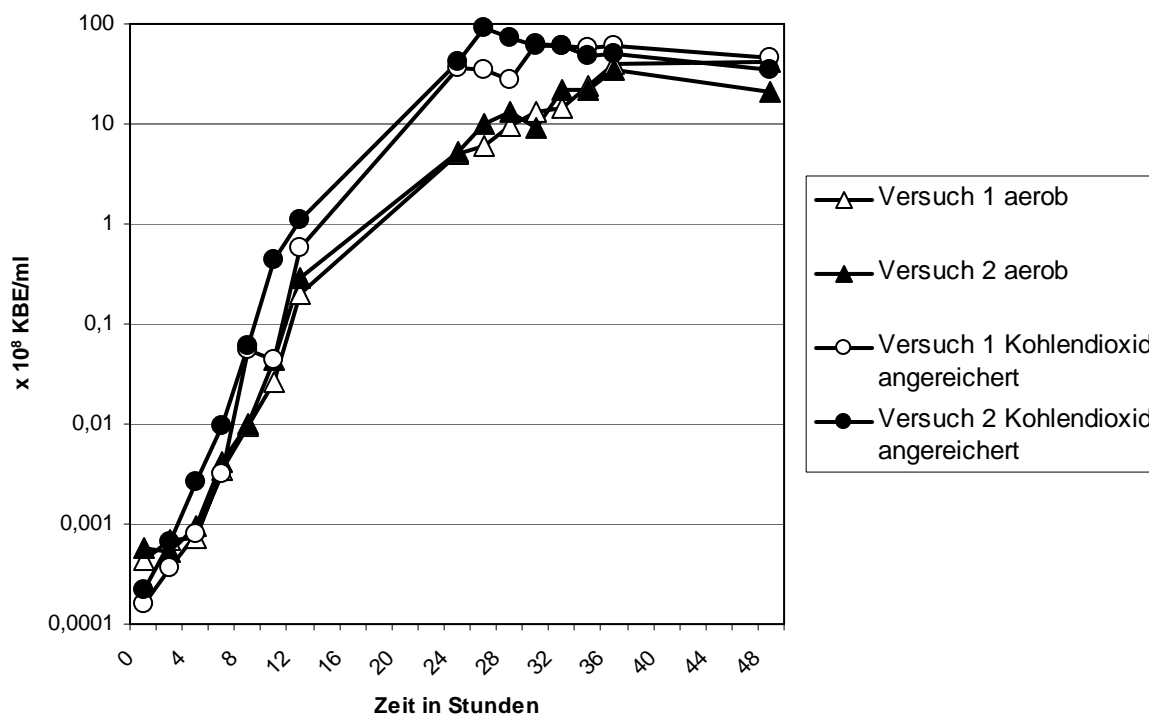


Abb. 4.10: Einfluss der atmosphärischen Bedingungen auf das Wachstumsverhalten des *A. pyogenes*-Wildstammes 4939-03; Medium: CaMHB-2%FKS.

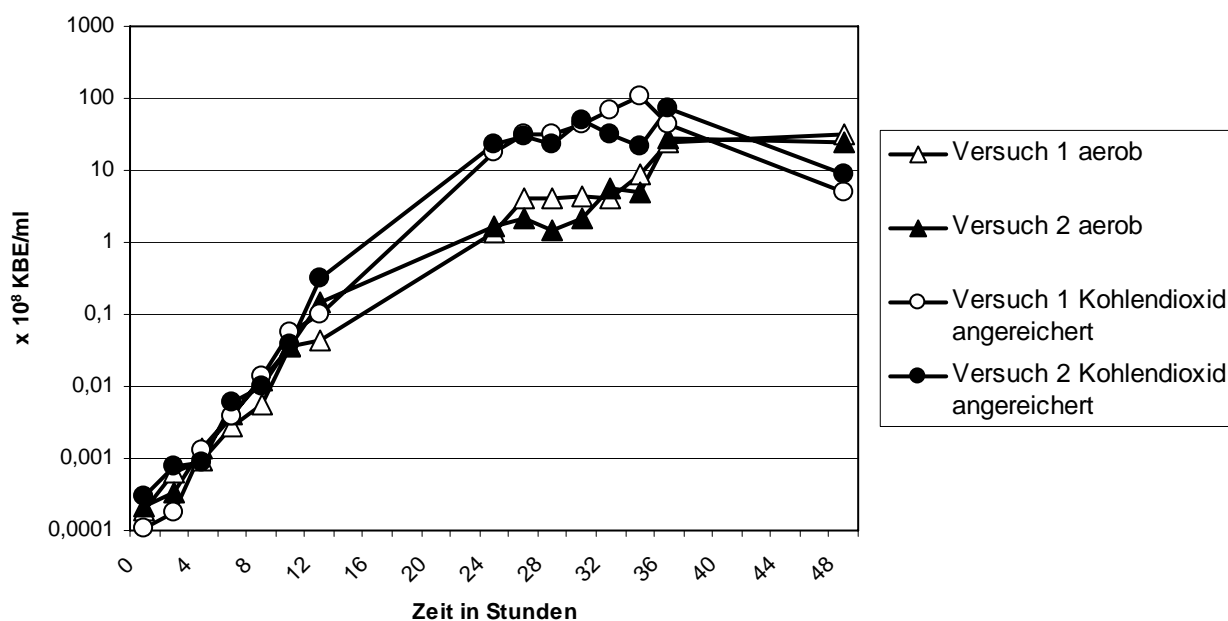


Abb. 4.11: Einfluss der atmosphärischen Bedingungen auf das Wachstumsverhalten des *A. pyogenes*-Typstammes DSM 20630; Medium: CaMHB-2%FKS.

In Abb. 4.12 sind die (sich aus Abb.4.9-11 ergebenden) Mittelwerte der drei getesteten Arcanobakterien-Isolate zusammengefasst. Arcanobakterien haben sich unter Einfluss von CO₂ nach zehn Stunden bereits um eine log₁₀-Stufe mehr vermehrt als unter aeroben

Bedingungen. Die Plateauphase erreichen sie hier zwischen 14 und 24 Stunden, im aeroben Milieu dagegen erst zwischen 36 und 48 Stunden.

Unter Zuhilfenahme der Bezugswerte 6 und 12 Stunden (s. Abb. 4.12) ergibt sich für Arcanobakterien bei aerober Bebrütung in CaMHB-2%FKS eine Generationszeit (d.h. die Zeit, die die Bakterien innerhalb der log-Phase zur Verdoppelung benötigen) von ca. 68 min (Berechnung nach Kayser, 1997), in mit 3 Vol% CO₂ angereicherter Atmosphäre liegt sie dagegen bei ca. 54 min.

Um einen Vergleich zu sog. „schnellwachsenden“ Bakterien zu erhalten, wurde bei dem MHK-Referenzstamm *E. coli* DSM 1103 (ATCC 25922 [CLSI, 2002]) der Wachstumsverlauf im selben Medium untersucht. Dieser erreicht die Plateauphase bereits nach acht Stunden und liegt nach dieser Zeit trotz des geringeren Ausgangswertes ($0,3 \times 10^4$ KBE/ml) bereits 1,5 log₁₀-Stufen über den bei CO₂ und zwei log₁₀-Stufen über den aerob bebrüteten Arcanobakterien. Die Generationszeit des *E. coli*-Referenzstammes lag in CaMHB-2%FKS bei ca. 23 min (Bezugswerte 2 und 6 Stunden).

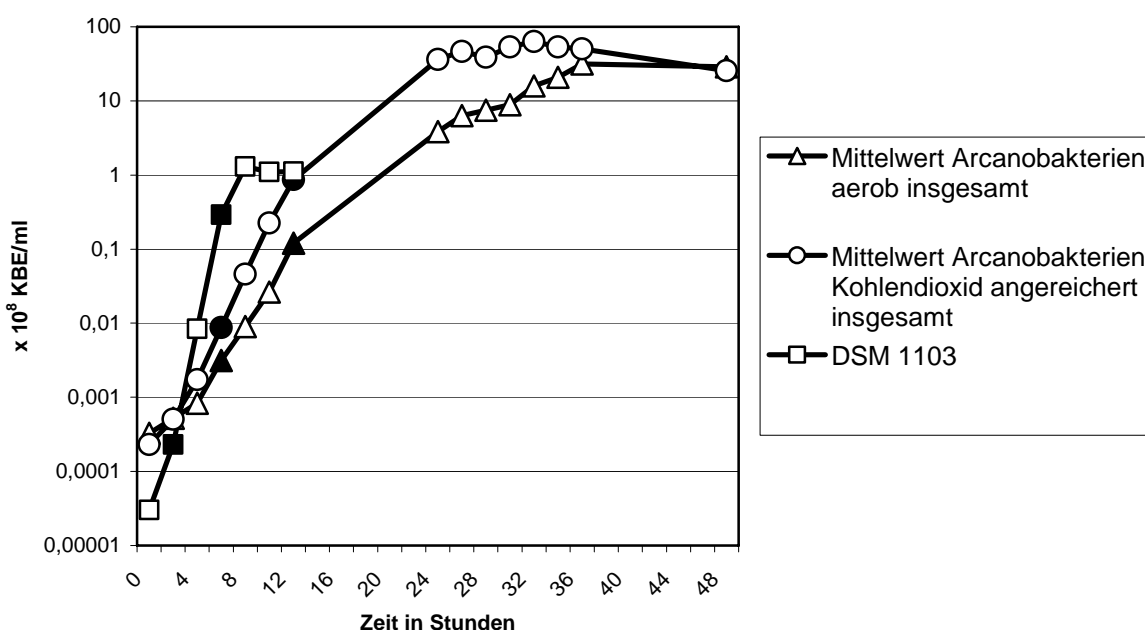


Abb. 4.12: Mittelwerte aller drei *A. pyogenes*-Isolate bei aerober und mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre im Vergleich zum *E. coli*-Referenzstamm DSM 1103. Die ausgefüllten Datenpunkte wurden zur Berechnung der jeweiligen Generationszeit herangezogen; Medium: CaMHB-2%FKS.

Auch das Wachstum in verschiedenen Medien wurde verglichen. In den Abbildungen 4.13 und 4.14 sind die Wachstumskurven des *A. pyogenes* Referenzstammes DSM 20630 (ATCC 19411) sowie des Wildstammes 1257-03 bei mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre in CaMHB-2%Pb und CaMHB-2%FKS vergleichend dargestellt. Bei den in FKS-haltigem

Ergebnisse

Medium ermittelten Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus zwei Versuchen, während es sich bei CaMHB-2%Pb um jeweils einmalig erhobene Ergebnisse handelt. Aus den Mittelwerten der beiden in CaMHB-2%Pb durchgeführten Wachstumskurven geht hervor, dass die Generationszeit unter Bezugnahme des 6 und 12 Stundenwertes bei ca. 70 min liegt. In beiden Medien sind die Erreger binnen ca. 24 Stunden in der Plateauphase angelangt, und die maximalen Zellzahlen liegen im Bereich von ca. 5×10^9 KBE/ml.

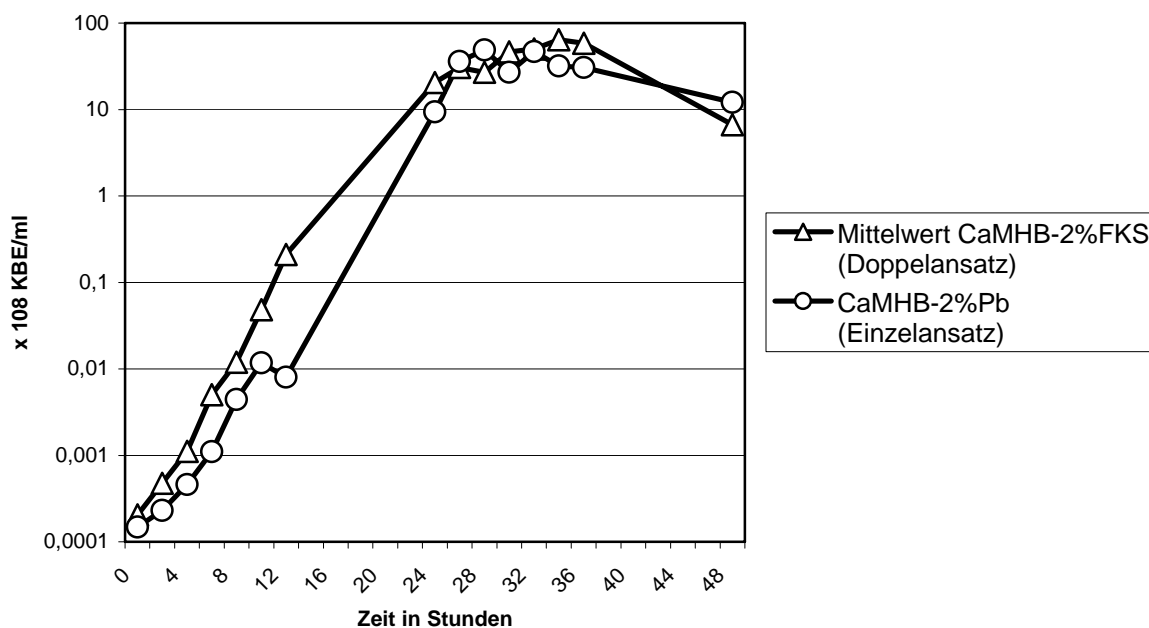


Abb. 4.13: Wachstum des *A. pyogenes*-Referenzstammes DSM 20630 in CaMHB-2%Pb und CaMHB-2%FKS unter Zugabe von 3 Vol% CO₂.

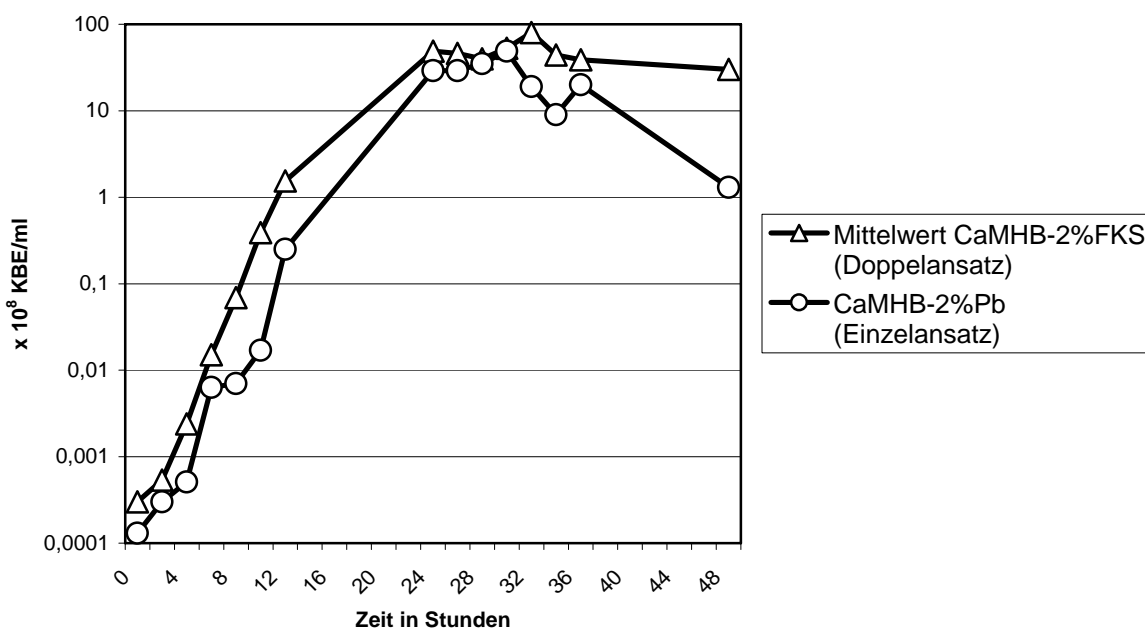


Abb. 4.14: Wachstum des *A. pyogenes*-Wildstammes 1257-03 in CaMHB-2%Pb und CaMHB-2%FKS unter Zugabe von 3 Vol% CO₂.

4.3.3 Vergleich der MHK-Werte mehrerer Antibiotika von 40 *A. pyogenes*-Stämmen in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb bei CO₂-supplementierter Inkubationsatmosphäre

Die Eignung der Medien CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb zur Durchführung der Bouillonmikrodilution wurde mit 40 *A. pyogenes*-Isolaten überprüft (Ergebnisse s. Tab. 4.11-4.14). Die Bakteriendichte aller Isolate lag zwischen $0,9-9,8 \times 10^5$ KBE/ml. Während die MHK-Ablesung mit CaMHB-2%Pb ohne Schwierigkeiten möglich war, gelang sie mit CaMHB-2%FKS bei der Ablesung von Sulfamethoxazol-Trimethoprim auf Grund der bereits in den vorhergehenden Untersuchungen beobachteten Pseudoknopfbildung nur unter Mühe (s. Abb. 4.15). Bei einem Isolat waren die Pseudoknöpfe derart ausgeprägt, dass eine MHK-Auswertung nicht möglich war.

In CaMHB-2%Pb zeigten die Arcanobakterien "schnellballartiges" Wachstum, in CaMHB-2%FKS dagegen ist die typische Knopfbildung, also eine Bakterienverdichtung am tiefsten Punkt der Kavität, zu erkennen, was die MHK-Ablesung generell erleichtert.

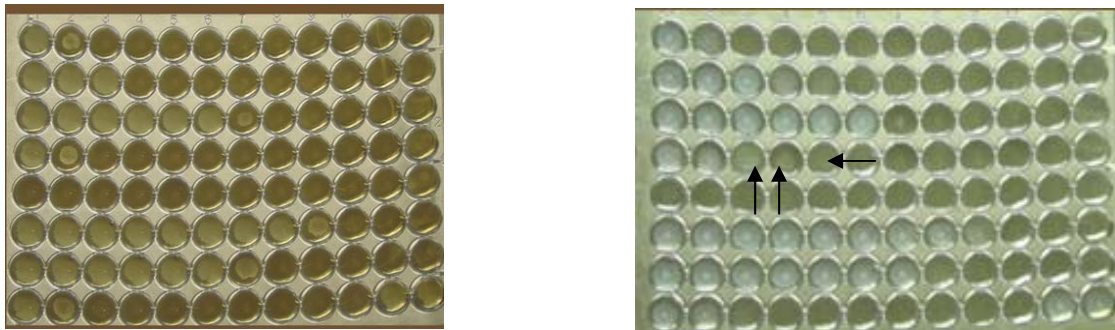


Abb. 4.15: Wachstum von Arcanobakterien in CaMHB-2%Pb (links) und CaMHB-2%FKS (rechts). Beachte: Deutliche Knopfbildung und Pseudoknopfbildung (Pfeile) in CaMHB-2%FKS; Isolat: 1094, NLV32

Ergebnisse

Tab. 4.11: Vergleich der in CaMHB-2%FKS (FKS) und CaMHB-2%Pb (Pb) ermittelten MHK-Werte der „BfT-Arcanobakterien“ (N = 40) gegenüber Makrolidantibiotika

Isolat	Dichte Pb (x 10 ⁵ KBE/ml)	Dichte FKS (x 10 ⁵ KBE/ml)	Tulathromycin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien *	Spiramycin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien *	
			MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)		MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)		
91	9,2	9,2	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
291	6,6	6,6	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
292	1,4	1,4	0,06	0,12	1	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
293	3,2	6,7	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
294	9,5	9,5	0,06	0,06	0	≤ 0,06	0,12	1	
478	4,3	4,3	0,06	0,06	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
479	2,9	6,6	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
480	2,3	2,3	0,06	0,06	0	≤ 0,06	0,12	1	
481	7	7	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1027	8	4,5	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1071	3,6	4,9	≥ 128	≥ 128	0	≥ 256	≥ 256	0	
1077	0,9	1	0,06	0,12	1	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1081	4,3	5,8	0,12	0,12	0	≤ 0,06	0,12	1	
1086	5,4	5,1	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1087	3,6	2,7	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1088	2,8	2,8	0,12	0,12	0	≤ 0,06	0,12	1	
1089	6,6	6,6	0,12	0,12	0	0,12	0,12	0	
1094	7,5	7,5	0,12	0,12	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1128	1,8	7,5	0,06	0,12	1	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1162	6,2	6,2	0,12	0,12	0	≤ 0,06	0,12	1	
1163	2,5	2,5	0,06	0,06	0	≤ 0,06	0,12	1	
1191	4,1	8,1	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1318	2,6	2,6	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1319	2,1	2,1	0,06	0,06	0	≤ 0,06	0,12	1	
1320	2,3	2,3	0,06	0,06	0	≤ 0,06	0,12	1	
1321	5,1	5,1	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1322	4,3	4,3	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1323	0,9	2,5	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1324	3,7	1,1	≥ 128	≥ 128	0	≥ 256	≥ 256	0	
1325	5,9	3,7	0,06	0,12	1	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1326	2,2	5,4	≥ 128	≥ 128	0	≥ 256	≥ 256	0	
1327	6,2	6,2	0,06	0,06	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1328	3,9	3,9	0,06	0,06	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1508	3,1	7,6	0,25	0,12	-1	≤ 0,06	0,12	1	
1545	4,4	4,4	0,06	0,06	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1546	2,1	1,8	0,06	0,12	1	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
1858	9,8	9,8	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1895	6,9	6,9	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
1941	7,6	7,6	0,06	0,12	1	≤ 0,06	0,12	1	
2035	5,1	6,4	0,12	0,12	0	≤ 0,06	≤ 0,06	0	
Mittelwert					0,5	Mittelwert			0,6
Standardabweichung					0,55	Standardabweichung			0,5
Maximalwert					1	Maximalwert			1
Minimalwert					-1	Minimalwert			0

* 0: kein Unterschied; 1: FKS eine Titerstufe höher; -1: FKS eine Titerstufe niedriger

Ergebnisse

Tab. 4.12: Vergleich der in CaMHB-2%FKS (FKS) und CaMHB-2%Pb (Pb) ermittelten MHK-Werte der „BfT-Arcanobakterien“ (N = 40) gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika (Inokulumsdichten s. Tab. 4.11)

Isolat	Gentamicin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien *	Neomycin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien *
	MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)		MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)	
91	1	2	1	4	8	1
291	0,5	2	2	4	8	1
292	0,5	2	2	4	8	1
293	0,5	1	1	4	8	1
294	1	2	1	4	8	1
478	0,5	1	1	4	8	1
479	0,5	1	1	4	16	2
480	0,5	1	1	4	8	1
481	0,5	2	2	4	8	1
1027	0,5	2	2	2	4	1
1071	1	2	1	4	8	1
1077	1	2	1	4	8	1
1081	0,5	2	2	4	8	1
1086	0,5	1	1	4	8	1
1087	0,5	2	2	4	8	1
1088	0,5	2	2	2	8	2
1089	1	1	0	4	4	0
1094	0,5	2	2	4	8	1
1128	0,5	2	2	4	8	1
1162	0,5	2	2	4	8	1
1163	0,5	2	2	4	8	1
1191	1	1	0	4	8	1
1318	0,5	2	2	4	8	1
1319	0,5	2	2	4	8	1
1320	0,5	2	2	4	8	1
1321	1	2	1	4	8	1
1322	1	2	1	4	8	1
1323	0,5	2	2	4	8	1
1324	2	2	0	4	8	1
1325	0,5	2	2	4	4	0
1326	1	2	1	2	8	2
1327	0,5	1	1	4	8	1
1328	0,5	1	1	4	8	1
1508	1	1	0	4	8	1
1545	0,5	1	1	4	8	1
1546	0,5	1	1	4	4	0
1858	2	2	0	4	8	1
1895	0,5	2	2	4	8	1
1941	0,5	2	2	4	8	1
2035	0,5	1	1	4	8	1
		Mittelwert	1,3		Mittelwert	1
		Standardabweichung	0,7		Standardabweichung	0,39
		Maximalwert	2		Maximalwert	2
		Minimalwert	1		Minimalwert	0

* 0: kein Unterschied; 1: CaMHB-2%FKS eine Titerstufe höher; 2: CaMHB-2%FKS zwei Titerstufe höher

Ergebnisse

Tab. 4.13: Vergleich der in CaMHB-2%FKS (FKS) und CaMHB-2%Pb (Pb) ermittelten MHK-Werte der „BfT-Arcanobakterien“ (N = 40) gegenüber Chloramphenicol und SxT (Inokulumdichte s. Tab. 4.11)

Isolat	Chloramphenicol		MHK- Abweichungen zwischen den Medien*	SxT		MHK- Abweichungen zwischen den Medien*
	MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)		MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in (in µg/ml)	
91	1	2	1	0,06	0,06	0
291	1	1	0	0,12	0,12	0
292	1	1	0	0,03	0,06	1
293	1	2	1	0,03	0,12	2
294	1	1	0	0,06	0,06	0
478	1	1	0	0,03	0,12	2
479	1	1	0	≤ 0,015	0,06	2
480	1	1	0	0,06	0,06	0
481	1	2	1	0,03	0,03	0
1027	2	1	-1	0,03	0,06	1
1071	2	4	1	0,12	0,25	1
1077	1	1	0	0,03	0,03	0
1081	1	1	0	0,12	0,12	0
1086	1	2	1	0,06	0,12	1
1087	1	2	1	0,06	0,06	0
1088	1	1	0	≤ 0,015	0,12	3
1089	2	2	0	0,03	0,25	3
1094	2	1	-1	0,06	0,06	0
1128	2	1	-1	0,12	0,12	0
1162	1	2	1	0,12	0,25	1
1163	1	1	0	0,12	0,12	0
1191	2	1	-1	0,03	0,03	0
1318	2	2	0	0,03	0,06	1
1319	1	1	0	0,03	0,06	1
1320	1	1	0	0,03	0,06	1
1321	1	2	1	0,06	0,06	0
1322	1	1	0	0,06	0,12	1
1323	1	2	1	0,12	0,12	0
1324	2	2	0	0,03	0,06	1
1325	1	1	0	0,03	0,06	1
1326	2	2	0	≤ 0,015	0,06	2
1327	1	1	0	0,03	0,12	2
1328	1	1	0	0,03	0,12	2
1508	1	1	0	0,03	n. a.	fehlt
1545	1	1	0	0,06	0,12	1
1546	2	1	-1	0,03	0,06	1
1858	1	1	0	0,06	0,06	0
1895	2	1	-1	0,12	4	5
1941	1	2	1	0,06	0,06	0
2035	1	1	0	0,03	0,06	1
	Mittelwert		0,1	Mittelwert		0,95
	Standardabweichung		0,62	Standardabweichung		1,08
	Maximalwert		1	Maximalwert		5
	Minimalwert		-1	Minimalwert		0

*0: kein Unterschied; 1: FKS eine Titerstufe höher; -1: FKS eine Titerstufe niedriger; 2: FKS zwei Titerstufe höher; 3: FKS drei Titerstufen höher; 5: FKS fünf Titerstufen höher

n. a.: nicht auswertbar

Ergebnisse

Tab. 4.14: Vergleich der in CaMHB-2%FKS (FKS) und CaMHB-2%Pb (Pb) ermittelten MHK-Werte der „BfT-Arcanobakterien“ (N = 40) gegenüber Tetracyclin und Enrofloxacin (Inokulumdichte s. Tab. 4.11)

Isolat	Tetracyclin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien*	Enrofloxacin		MHK- Abweichungen zwischen den Medien*
	MHK Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)		MHK in Pb (in µg/ml)	MHK in FKS (in µg/ml)	
91	0,5	0,5	0	1	1	0
291	32	32	0	1	1	0
292	64	32	-1	1	1	0
293	16	16	0	1	1	0
294	0,25	0,25	0	1	1	0
478	16	16	0	1	1	0
479	32	32	0	0,5	1	1
480	0,25	0,25	0	1	1	0
481	16	16	0	0,5	0,5	0
1027	0,12	0,25	1	1	1	0
1071	16	32	1	1	1	0
1077	64	64	0	1	1	0
1081	32	16	-1	1	1	0
1086	0,12	0,25	1	1	1	0
1087	0,25	0,5	1	1	1	0
1088	0,125	0,25	1	1	1	0
1089	16	16	0	1	1	0
1094	32	16	-1	1	1	0
1128	32	32	0	4	4	0
1162	8	32	2	1	1	0
1163	32	32	0	1	1	0
1191	8	8	0	0,5	0,5	0
1318	32	8	-2	1	1	0
1319	16	16	0	1	1	0
1320	32	32	0	1	1	0
1321	0,25	0,25	0	1	1	0
1322	0,25	0,25	0	1	1	0
1323	32	32	0	1	1	0
1324	16	16	0	1	1	0
1325	0,25	0,25	0	1	1	0
1326	64	64	0	0,5	1	1
1327	0,25	0,25	0	1	1	0
1328	0,25	0,25	0	1	1	0
1508	0,25	0,25	0	1	1	0
1545	16	32	1	1	1	0
1546	0,25	0,25	0	1	1	0
1858	8	8	0	1	1	0
1895	32	16	-1	1	1	0
1941	4	4	0	1	1	0
2035	0,25	0,25	0	2	1	-1
	Mittelwert		0,05	Mittelwert		0,025
	Standardabweichung		0,67	Standardabweichung		0,27
	Maximalwert		2	Maximalwert		1
	Minimalwert		-2	Minimalwert		-1

*0: kein Unterschied; 1: FKS eine Titerstufe höher; -1: FKS eine Titerstufe niedriger; 2: FKS zwei Titerstufe höher; -2: FKS zwei Titerstufen niedriger

Beim Vergleich der in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb ermittelten MHK-Werte der einzelnen Antibiotika zeigte sich, dass die Werte von Enrofloxacin, Tetracyclin und Chloramphenicol im Mittel keinen Unterschied zwischen den Medien aufwiesen. Bei Tulathromycin war die MHK in CaMHB-2%FKS im Mittel um den Faktor 1,41 höher als in CaMHB-2%Pb. Mit einer im Mittel um den Faktor 1,5 höheren MHK in CaMHB-2%FKS zeigte sich dieses Ergebnis auch bei Spiramycin. Wie erwartet konnte bei der Auswertung der MHK-Werte von Sulfamethoxazol/Trimethoprim eine deutlich höhere MHK in CaMHB-2%FKS im Vergleich zu CaMHB-2%Pb beobachtet werden (Faktor 1,93). Auffallend hoch waren auch die in CaMHB-2%FKS ermittelten MHK-Werte der Aminoglykoside. Die MHK-Werte von Gentamicin (Faktor 2,5) und Neomycin (Faktor 2,0) in CaMHB-2%FKS waren im Mittel mehr als doppelt so hoch als in CaMHB-2%Pb.

Die ermittelten MHK-Werte wurden binär logarithmisiert ($\log_2[\text{MHK in } \mu\text{g/ml}]$), das geometrische Mittel gebildet und die Medien zweiseitig auf signifikante Unterschiede hin verglichen (Signifikanzgrenze $p \leq 0,05$). Bei der Testung von Tulathromycin ($p = 0,4$), Spiramycin ($p = 0,4$), Tetracyclin ($p = 0,9$), Enrofloxacin ($p = 0,8$) und Chloramphenicol ($p = 0,4$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien. Bei der Testung von Sulfamethoxazol/Trimethoprim ($p = 3 \times 10^{-5}$), Neomycin ($p < 10^{-5}$) und Gentamicin ($p = 10^{-5}$) waren dagegen signifikante Unterschiede zwischen den in CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb ermittelten MHK-Werten feststellbar.

Da das CLSI (2004) für Arcanobakterien Grenzwerte für Gentamicin angibt, wurde verglichen, inwieweit die unterschiedlichen MHK-Werte Auswirkungen auf die nachfolgende Beurteilung der Isolate in „resistent“ bzw. „sensibel“ hätte (s. Abb. 4.16). Hierbei ergab sich, dass die Interpretation der MHK-Werte zu keinen Unterschieden zwischen den Medien hinsichtlich „falsch-resistent“ („major error“) oder „falsch-sensibel“ („very major error“) führen würde.

Ergebnisse

MHK-Werte (in µg/ml) in CaMHB-2%FKS	Intermediär-resistenter MHK-Bereich	64 32 16 8	"major error"										
	Sensibler MHK- Bereich	4 2 1 0,5 0,25 0,12 0,06	18 10	7 3	2	"very major error"							
			0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
			Sensibler MHK-Bereich						Intermediär-resistenter MHK- Bereich				

MHK-Werte (in µg/ml) in CaMHB-2%Pb

Abb. 4.16: Vergleich der in der Bouillonmikrodilution mit CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb ermittelten MHK-Werte von Gentamicin; Grenzwerteinteilung nach CLSI (2004).

4.3.4 Vergleich der durch Bouillonmikrodilution und Agardilution ermittelten MHK-Werte von 55 Arcanobakterien am Beispiel Tetracyclin

Von jedem Isolat wurden mindestens zwei MHK-Testungen von Tetracyclin mittels Bouillonmikrodilution in CaMHB-2%FKS durchgeführt. Alle Ergebnisse waren ohne Schwierigkeiten ablesbar. Die Inokulumdichte lag bei allen Stämmen zwischen 2,1 und 10×10^5 KBE/ml. Der MHK-Referenzstamm *Enterococcus faecalis* (DSM 2570, ATCC 29212) blieb auch in mit CO₂ angereicherter Inkubationsatmosphäre mit 16-32 µg/ml im von dem CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebenen MHK-Referenzbereich für Tetracyclin (s. Tab. 3.4). Die einzelnen Resultate der jeweiligen Stämme sind Tab. 8.4 zu entnehmen. Wie aus Abbildung 4.17 ersichtlich, ist die MHK-Verteilung innerhalb der Population deutlich bimodal mit 34,55 % sensiblen (N = 19; MHK ≤ 4 µg/ml [CLSI, 2004]) und 65,45 % intermediär bis resistenten Stämmen (N = 36; MHK ≥ 8 µg/ml [CLSI, 2004]). Bei 92,73 % (N = 51) der Isolate stimmte die im ersten Versuchsansatz erhobene MHK mit der des zweiten überein, lediglich vier Isolate wiesen im zweiten Versuch eine andere Hemmkonzentration auf. Die Werte variierten nur bei einem Isolat um zwei Titerstufen, die jedoch beide im sensiblen Bereich lagen, so dass hier keine Unterschiede bezüglich einer anschließenden Grenzwertinterpretation auftraten. Die Korrelation der MHK-Werte aller 55

Isolate war sehr gut. Die Berechnung der linearen Regression ergab ein R^2 von 0,99 bei einem X-Koeffizienten von 0,98.

Zur Bestätigung der in der Bouillonmikrodilution ermittelten MHK-Werte wurde mit jedem Isolat eine Agardilution durchgeführt. Der als Kontrolle mitgeführte MHK-Referenzstamm (*E. coli*, DSM 1103, ATCC 25922) blieb mit einer MHK von 1 $\mu\text{g/ml}$ im vom CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebenen Bereich (s. Tab. 3.4). Die einzelnen Ergebnisse der Agardilution sind ebenfalls Tab. 8.4 zu entnehmen.

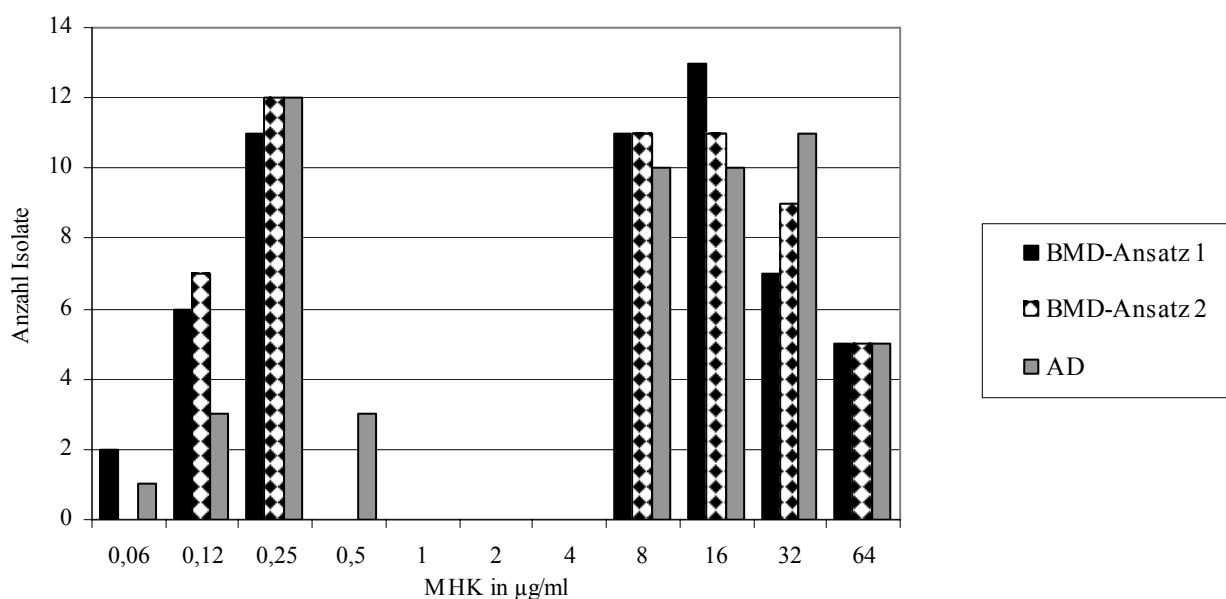


Abb. 4.17: MHK-Verteilung beider Ansätze von Tetracyclin der 55 in CaMHB-2%FKS mit Bouillonmikrodilution (BMD) getesteten Isolate im Vergleich zur Agardilution (AD).

Von allen Isolaten hatten 65,5 % ($N = 36$) sowohl in beiden Versuchsansätzen der Bouillonmikrodilution als auch in der Agardilution identische MHK-Werte. Die Ergebnisse der vier Bakterienstämme, die unterschiedliche MHK-Werte in der Bouillonmikrodilution aufwiesen, stimmten bei allen Isolaten in einem der beiden Werte mit der Agardilution, überein.

Bei 27,3 % ($N = 15$) divergierte die MHK der Agardilution von der der Bouillonmikrodilution. Bei 26,7 % dieser Isolate war die der Agardilution kleiner ($N = 4$), wobei die Varianz maximal eine Titerstufe betrug, bei 73,3 % war sie dagegen größer ($N = 11$). Ein Isolat zeigte in der Agardilution eine um zwei Titerstufen höhere MHK, bei allen anderen Stämmen betrug die Differenz dagegen eine Titerstufe. Auch hier korrelierten die in den beiden Methoden eruierten Ergebnisse sehr gut, die Berechnung der linearen Regression der MHK-Werte ergab ein R^2 von 0,97 bei einem X-Koeffizienten von 0,96.

Ergebnisse

Um eine mögliche Auswirkung der MHK-Unterschiede auf die Interpretation der MHK-Ergebnisse der Bouillonmikrodilution bezüglich „falsch resistenten“ („major error“) und „falsch sensiblen“ („very major error“) Ergebnissen ausschließen zu können, wurde jeweils ein Wert der Bouillonmikrodilution mit dem der Agardilution in Bezug gesetzt (s. Abb. 4.18). In keinem Fall hätte die Differenz der MHK-Werte von Bouillonmikrodilution und Agardilution zu hinsichtlich ihrer Resistenzlage falsch interpretierten Ergebnissen geführt.

MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der Bouillonmikrodilution	Intermediär-resistenter MHK-Bereich	64					1 4						
		32	"major error"				1 7 1						
16							8 3						
8					10 1								
Sensibler MHK-Bereich	4					"very major error"							
	2												
	1												
	0,5												
	0,25												
	0,12	2	8	2									
	0,06	1	1	4	1								
	0,06	0,12	0,25	0,5	1					2	4	8	16
Sensibler MHK-Bereich							Intermediär-resistenter MHK-Bereich						
MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der Agardilution													

Abb. 4.18: Vergleich der in der Agardilution ermittelten MHK-Werte von Tetracyclin mit dem jeweils höheren der beiden in der Bouillonmikrodilution evaluierten Werte; Grenzwerteinteilung nach CLSI (2004).

Ausgehend vom höheren der beiden in der Bouillonmikrodilution ermittelten Wert besaßen die „LMU-Arcanobakterien“ (N = 53) ein MHK-Spektrum von Tetracyclin von 0,12-64 µg/ml, die MHK₅₀ lag bei 8 µg/ml, die MHK₉₀ bei 32 µg/ml. Bei den porcinen Isolaten (N = 14) lag das MHK-Minimum bei 0,12 µg/ml, das Maximum bei 8 µg/ml. Die MHK₅₀ sowie die MHK₉₀ lagen hier bei 8 µg/ml, der Anteil der resistenzverdächtigen Isolate belief sich auf 64,3 % (N = 9). Die bovinen Isolate wiesen ein MHK-Spektrum von 0,12-64 µg/ml auf, die MHK₅₀ lag bei 16 µg/ml, die MHK₉₀ bei 64 µg/ml, als resistenzverdächtig galten 68,4 % (N = 26).

4.4 MHK-Ermittlung im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes

Im Rahmen des BfT-GermVet-Projektes wurden 62 *A. pyogenes*-Isolate („BfT-Arcanobakterien“) der Indikationen „Urogenitaltrakt Rind“, „Omphalitis/Septikämie Rind“ und „Bewegungsapparat/ZNS Schwein“ mittels Bouillonmikrodilution auf ihre MHK hin überprüft. Dazu wurde die in Abschnitt 4.3 etablierte Methode hinsichtlich Einstellung einer geeigneten Inokulumsdichte sowie Verwendung von geeignetem Medium (CaMHB-2%Pb) und geeigneter Bebrütungsatmosphäre (3 Vol% CO₂) verwendet. Mit allen Isolaten konnte dadurch eine eindeutige, die Kriterien des CLSI (2002) einhaltende MHK-Ermittlung durchgeführt werden (Einzelergebnisse s. Tab. 8.5-8.7).

Insgesamt wurden 25 Isolate der Indikation Urogenitaltrakt Rind, 29 der Indikation Omphalitis/Septikämie Rind und acht der Indikation Bewegungsapparat/ZNS Schwein untersucht. In den Tabellen 4.15-4.17 ist die MHK-Verteilung innerhalb der jeweiligen Indikation dargestellt, die einzelnen Werte werden daher hier nicht noch einmal aufgeführt. Bei statistischer Betrachtung der ermittelten Werte ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Indikationen (Urogenitaltrakt Rind und Nabel/Septikämie Rind: $\chi^2 = 0,783$, P = 38 %; Urogenitaltrakt Rind und Bewegungsapparat/ZNS Schwein: P = 100 % [Fisher's exact Test]; Nabel/Septikämie Rind und Bewegungsapparat/ZNS Schwein: P = 69,3 % [Fisher's exact Test]).

Für eine Beurteilung der ermittelten MHK-Werte ist zu beachten, dass für Arcanobakterien keine spezifischen Grenzwerte existieren. Einige im CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebene Werte können auch auf "andere Bakterien" übertragen werden, diese Werte werden im Folgenden zur Beurteilung herangezogen.

Gegenüber β -Lactam-Antibiotika wiesen alle Isolate sehr niedrige MHK-Werte auf, wobei die Werte für Penicilline (MHK₉₀ Penicillin G $\leq 0,015$ $\mu\text{g/ml}$, Ampicillin $\leq 0,03$ $\mu\text{g/ml}$) niedriger lagen als für Cephalosporine (MHK₉₀ Cephalothin G = 0,12 $\mu\text{g/ml}$, Ceftiofur = 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Übertragbare Grenzwerte liegen vor für Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalothin und Cephazolin, gegenüber diesen Wirkstoffen waren alle Isolate sensibel. Ebenfalls durchwegs empfindlich waren die untersuchten Isolate gegenüber Chloramphenicol (MHK₉₀ = 2 $\mu\text{g/ml}$) und Gentamicin (MHK₉₀ = 1 $\mu\text{g/ml}$). Eine Resistenz gegenüber Sulfonamiden scheint bei etwa einem Drittel der Isolate von Rindern vorzuliegen (MHK₅₀ = 16 $\mu\text{g/ml}$, MHK₉₀ = ≥ 2048 $\mu\text{g/ml}$), gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim waren jedoch alle Stämme empfindlich (MHK₉₀ = 0,12 $\mu\text{g/ml}$). Bei den Rinder-Isolaten wurden in wenigen Fällen (8,0 % der Isolate der Indikation „Urogenitaltrakt Rind“, 10,3 % der Indikation

Ergebnisse

„Omphalitis/Septikämie Rind“) auch hohe MHK-Werte für Makrolidantibiotika beobachtet. Bei denselben Isolaten wurden parallel hohe MHK-Werte für das Lincosamid Clindamycin gefunden. Hohe Resistenzraten wurden gegenüber Tetracyclin festgestellt. Bei den Isolaten vom Schwein waren 62,5 % der Isolate, bei denen der Indikation „Urogenitaltrakt-Rind“ 64 % zumindest resistenzverdächtig (MHK₉₀ = 8 µg/ml bzw. 32 µg/ml), bei der Indikation „Omphalitis/Septikämie-Rind“ waren es mit einem Anteil von 48,3 % etwas weniger unempfindliche Stämme. Ausschließlich bei dieser Indikation lag die MHK₅₀ mit 4 µg/ml im sensiblen Bereich.

Tab. 4.15: Resistenzmuster der „BfT-Arcanobakterien“ der Indikation Urogenitaltrakt-Rind (N = 25)

Wirkstoff	MHK-Bereich (µg/ml)	MHK ₅₀ (µg/ml)	MHK ₉₀ (µg/ml)	Grenzwert * (µg/ml) für sensibel	Anzahl sensible Isolate in Prozent	Anzahl intermediär-resistente Isolate in Prozent
Ampicillin	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	k. A.		
Amoxicillin/Clavulansäure	≤ 0,015/0,007 - 0,06/0,03	0,03/0,015	0,06/0,03	≤ 8/4	100 (N = 25)	0
Penicillin G	≤ 0,015	≤ 0,015	≤ 0,015	k. A.		
Ceftiofur	0,2 5- 0,5	0,5	0,5	k. A.		
Cequinom	0,03 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		
Cephalothin	0,03 - 0,25	0,12	0,25	≤ 8	100 (N = 25)	0
Cephazolin	0,06 - 0,5	0,25	0,5	≤ 8	100 (N = 25)	0
Cefoperazon	0,03 - 0,12	0,06	0,12	k. A.		
Tulathromycin	0,06 - ≥ 128	0,06	0,25	k. A.		
Gentamicin	0,5 - 2	0,5	1	≤ 4	100 (N = 25)	0
Enrofloxacin	0,25 - 4	1	1	k. A.		
SXT	≤ 0,015/0,3 - 0,12/2,38	0,06/1,19	0,12/2,38	≤ 2/38	100 (N = 25)	0
Spiramycin	≤ 0,06 - ≥ 256	≤ 0,06	≤ 0,06	k. A.		
Tetracyclin	0,12 - 64	8	32	≤ 4	36 (N = 9)	64 (N = 16)
Neomycin	2 - 4	4	4	k. A.		
Chloramphenicol	1 - 2	1	2	≤ 8	100	0
Erythromycin	≤ 0,015 - ≥ 64	≤ 0,015	≤ 0,015	k. A.		
Clindamycin	≤ 0,03 - ≥ 128	0,06	0,06	k. A.		
Tilmicosin	≤ 0,03 - ≥ 128	0,03	0,03	k. A.		
Spectinomycin	≤ 0,25 - 4	0,5	4	k. A.		
Florfenicol	0,5 - 1	1	1	k. A.		
Colistin	16 - ≥ 64	64	64	k. A.		
Sulfamethoxazol	≤ 0,5 - ≥ 2048	16	≥ 2048	≤ 256	68 (N = 17)	32 (N = 8)
Oxacillin/NaCl	≤ 0,03 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		

* Grenzwerte nach CLSI (2004)

k. A.: Keine Angabe

Ergebnisse

Tab. 4.16: Resistenzmuster „BfT-Arcanobakterien“ Indikation Omphalitis/Septikämie-Rind (N = 29)

Wirkstoff	MHK-Spektrum (µg/ml)	MHK ₅₀ (µg/ml)	MHK ₉₀ (µg/ml)	Grenzwert * (µg/ml) für sensibel	Anzahl sensible Isolate in Prozent	Anzahl intermediär-resistente Isolate in Prozent
Ampicillin	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	k. A.		
Amoxicillin/Clavulansäure	0,03/0,015 - 0,06/0,03	0,03/0,015	0,06/0,03	≤ 8/4	100 (N = 29)	0
Penicillin G	≤ 0,015-0,03	≤ 0,015	0,03	k. A.		
Ceftiofur	0,25 - 0,5	0,5	0,5	k. A.		
Cequinom	0,06 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		
Cephalothin	0,06 - 0,12	0,12	0,12	≤ 8	100 (N = 29)	0
Cephazolin	0,12 - 0,5	0,25	0,5	≤ 8	100 (N = 29)	0
Cefoperazon	≤ 0,03 - 0,12	0,06	0,12	k. A.		
Tulathromycin	0,06 - ≥ 128	0,06	≥ 128	k. A.		
Gentamicin	0,5 - 2	0,5	1	≤ 4	100 (N = 29)	0
Enrofloxacin	0,5 - 1	1	1	k. A.		
SXT	≤ 0,015/0,3 - 0,12/2,38	0,06/1,19	0,12/2,38	≤ 2/38	100 (N = 29)	0
Spiramycin	≤ 0,06 - ≥ 256	≤ 0,06	≥ 256	k. A.		
Tetracyclin	0,12 - 64	4	32	≤ 4	51,72 (N = 15)	48,28 (N = 14)
Neomycin	2 - 4	4	4	k. A.		
Chloramphenicol	1 - 2	1	2	≤ 8	100 (N = 29)	0
Erythromycin	≤ 0,015 - ≥ 64	≤ 0,015	≥ 64	k. A.		
Clindamycin	≤ 0,03 - ≥ 128	≤ 0,03	≥ 128	k. A.		
Tilmicosin	≤ 0,03 - ≥ 128	≤ 0,03	≥ 128	k. A.		
Spectinomycin	≤ 0,25 - 4	0,5	2	k. A.		
Florfenicol	0,5 - 1	1	1	k. A.		
Colistin	32 - ≥ 64	≥ 64	≥ 64	k. A.		
Sulfamethoxazol	2 - ≥ 2048	16	≥ 2048	≤ 256	75,86 (N = 22)	24,14 (N = 7)
Oxacillin/NaCl	≤ 0,03 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		

* Grenzwert nach CLSI (2004)

k. A.: Keine Angabe

Ergebnisse

Tab. 4.17: Resistenzmuster „BfT-Arcanobakterien“ Indikation Bewegungsapparat/ZNS-Schwein (N = 8)

Wirkstoff	MHK-Spektrum (µg/ml)	MHK ₅₀ (µg/ml)	MHK ₉₀ (µg/ml)	Grenzwert * (µg/ml) für sensibel	Anzahl sensible Isolate in Prozent	Anzahl intermediär-resistente Isolate in Prozent
Ampicillin	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	k. A.		
Amoxicillin/Clavulansäure	0,03/0,015	0,03/0,015	0,03/0,015	≤ 8/4	100 (N = 8)	0
Penicillin G	≤ 0,015	≤ 0,015	≤ 0,015	k. A.		
Ceftiofur	0,5	0,5	0,5	k. A.		
Cequinom	0,06 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		
Cephalothin	0,06 - 0,12	0,12	0,12	≤ 8	100 (N = 8)	0
Cephazolin	0,12 - 0,5	0,25	0,5	≤ 8	100 (N = 8)	0
Cefoperazon	0,06 - 0,12	0,06	0,12	k. A.		
Tulathromycin	0,06 - 0,12	0,06	0,12	k. A.		
Gentamicin	0,5	0,5	0,5	≤ 4	100 (N = 8)	0
Enrofloxacin	1	1	1	k. A.		
SXT	≤ 0,015/0,3-0,06/1,19	0,03/0,6	0,06/1,19	≤ 2/38	100 (N = 8)	0
Spiramycin	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	k. A.		
Tetracyclin	0,25 - 16	8	16	≤ 4	37,5 (N = 3)	62,5 (N = 5)
Neomycin	4 - 8	4	8	k. A.		
Chloramphenicol	0,5 - 2	1	2	≤ 8	100 (N = 8)	0
Erythromycin	≤ 0,015	≤ 0,015	≤ 0,015	k. A.		
Clindamycin	≤ 0,03 - 0,06	0,06	0,06	k. A.		
Tilmicosin	≤ 0,03 - 0,25	≤ 0,03	0,25	k. A.		
Spectinomycin	0,5 - 1	0,5	1	k. A.		
Florfenicol	0,5 - 1	1	1	k. A.		
Colistin	≥ 64	≥ 64	≥ 64	k. A.		
Sulfamethoxazol	≤ 0,5 - 64	4	64	≤ 256	100 (N = 8)	0
Oxacillin/Natrium	0,06 - 0,25	0,12	0,25	k. A.		

*Grenzwert nach CLSI (2004)

k. A.: Keine Angabe

4.5 Ergebnisse der genetischen Untersuchung zur Tetracyclinresistenz von *A. pyogenes*

4.5.1 Genotypische Grundlage der Tetracyclinresistenz von 36 *A. pyogenes*-Isolaten

Alle in der Bouillonmikrodilution (s. Kap. 4.3.4) als resistenzverdächtig gegenüber Tetracyclin ermittelten „LMU-Arcanobakterien“ (N = 36) wurden einer genotypischen Untersuchung auf das Vorkommen von *tet(W)*, *tet(33)* und *tet(Z)* mittels PCR unterzogen, was bei einigen Stämmen zu positiven Ergebnissen führte. Bei ausgesuchten Isolaten wurden additiv PCRs zur Detektion von *tet(K)*, (L), (M), (O) und (Q) durchgeführt, wobei es bei keinem der Bakterien einen Hinweis auf das Vorliegen einer dieser Determinanten gab. In Tab. 8.8 sind die Ergebnisse aller durchgeführten PCRs sowie die Herkunft der Isolate angegeben.

Bei 11 Stämmen (zwei Rinderstämme, alle Schweinestämme und einer unbekannter Herkunft) konnten keine Hinweise auf genetische Determinanten der Tetracyclinresistenz detektiert werden.

4.5.1.1 Untersuchungen zum Vorkommen des Gens *tet(W)*

Mittels der Screening-PCRs „*tet(W)*upfor-uprev“ (s. Abb. 4.20) und „*tet(W)*dofor-dorev“ wurden 66,7 % der Isolate (N = 24) als *tet(W)* positiv identifiziert. Das Oligonukleotid *tet(W)*upfor lag am 5'-Ende des Gens und umfasste das Startcodon, während der Primer *tet(W)*dorev am 3'-Ende des Gens die Amplifikation des Stopcodons beinhaltete. Ausnahmslos alle Stämme stammten vom Rind, bei keinem der von Schweinen isolierten Arcanobakterien konnte *tet(W)* detektiert werden. Das *tet(W)*-Gen des Isolats 3922-03 wurde stellvertretend für alle Amplifikate sequenziert. Um das gesamte Gen zu sequenzieren, wurden zusätzlich die PCRs „*tet(W)*upfor-upintrev“, „*tet(W)*upfor-uprev“, „*tet(W)*upfor-dointrev“, „*tet(W)*dofor-dorev“, und „*tet(W)*dointfor-dorev“ durchgeführt, die Produkte kloniert und sequenziert. Eine schematische Darstellung der für die Sequenzierung durchgeführten PCRs ist Abb. 4.19 zu entnehmen.

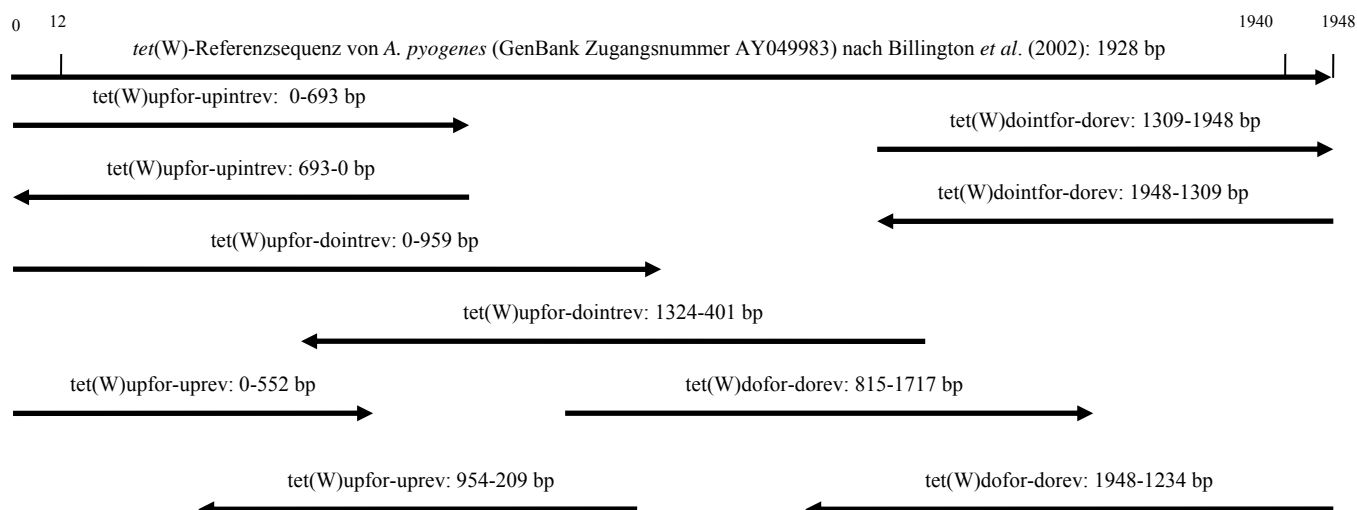


Abb. 4.19: Schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie von *tet(W)* des Isolates 3922-03. Die Pfeilrichtungen geben die Sequenzrichtung an, die angegebenen Basenpaare die Sequenzlänge. Mittels der hier dargestellten Strategie gelang es, das Gen in vollem Umfang incl. Gegenstrang darzustellen und mit der Referenzsequenz nach Billington *et al.* (2002 b) zu vergleichen.

Die aus den einzelnen ermittelten Sequenzen erstellte endgültige Sequenz des *tet(W)*-Bereiches von Isolat 3922-03 wurde mit der von Billington *et al.* (2002 b) publizierte Sequenz (GenBank-Zugangsnummer AY049983) verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Sequenz des *tet(W)*-Gens von 3922-03 in vollem Umfang der Sequenz der Erstbeschreibung von *tet(W)* bei *A. pyogenes* entspricht. In Abb. 4.21 ist die komplette Sequenz von 3922-03 dargestellt. Der Anteil des G+C-Gehalts lag bei 52,21 %.

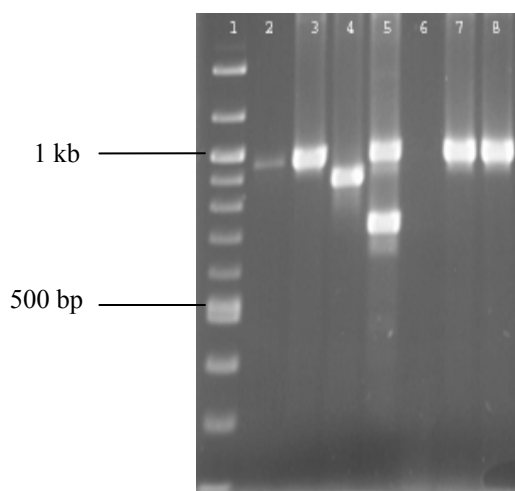


Abb. 4.20: Darstellung der Produkte der Screening-PCRs *tet(W)*upfor-uprev, *tetA(Z)*rev-*A(Z)*for und *tet(33)* einiger Isolate im Agarosegel. In Spur 1 ist der 100 bp Größensstandard aufgetragen. Die Isolate in den Spuren 2, 3, 7 und 8 sind positiv für *tet(W)*, das Isolat in Spur 4 ist positiv für *tet(Z)*, das Isolat in Spur 5 ist positiv für *tet(W)* und *tet(33)*. Das Isolat in Spur 6 ist ohne positives Ergebnis.

Ergebnisse

```

TTGGGCCTTG TATGGAGGAT AGACATGAAC ATTATCAATA TCGGGATTCT TGCCCATGTA 60 bp
GATGCGGGCA AGACGACACT GACAGAAAGC CTGCTGTATG CCAGCGGAAC CATTTTCAGAG 120 bp
CCGGGGAGCG TCGAAAAAGG GACAACGAGA ACGGACACTA TGTTTTTGGGA GCGGCAGCGT 180 bp
GGAATTACCA TTCAAACGGC AGTCACTTCT TTCCAGTGGC ACAGTTGTAA AGTCAACATT 240 bp
GTGGATACTC CCGGCCACAT GGATTTCTTG GCAGAGGTAT ACCGCTCTCT GGCCGTTTTG 300 bp
GACGGGGCCA TCTTGGTGCT CTCCGCTAGA GATGGCGTAC AGGCCCAGAC CCGAGTTCTG 360 bp
TTCCATGCCC TACGGAAATT GAACATCCCC ACCATTATCT TTATCAACAA GATCGACCAG 420 bp
GTTGACATTG ATTTGGAGGG CGTATATCAG TCTGTTTCGGG ATAAGCTCTC CGCCGATATT 480 bp
ATCATCAAGC AGACGGTATC GCTGTCCCCG GAAATAGTTC TGGAGGAAAA TACCGACATA 540 bp
GAAGCATGGG ATGCGGTCAT CGAAAATAAC GATGGATTAT TGGAAAAGTA TATCGCAGGA 600 bp
GAGCCAATCA GCCGGGAAGA ACTTGCGCGG GAGGAACAGC GCGGGTTCA AGCCGCTTCC 660 bp
CTGTTCCCAG TCTATCATGG TAGCGCCAAA AACGGCCTTG GCATTCAACG GTTGATGGAT 720 bp
GCGGTGATAG GGCTGTTCCA ACCGACCAAG GAACAGGGGC GCACCGCCCT GTGCGGCAGC 780 bp
GTTTTCAAGG TGGAGTATAC AGATTGCGGC CAGAGGCTTG TCTATCTGCG GCTATACAGC 840 bp
GGAACGCTGC GTCTGCGGGA TACGGTGGCC CTGGCCGGGA GAGAAAAGCT GAAAATCACA 900 bp
GAGATGCGTA TTCCATCCAA AGGGGAGATT GTTCGGACAG ATACCGCCA TAAGGGCGAA 960 bp
ATTGTCATCC TTCCCAGCGA CAGTTTGAGA TTAAACGATA TATTGGGGGA CAAAACCCAA 1020 bp
CTTCTCGTG AAATGTGGAG TGATGCTCCC TTCTCTATGC TGCGGACAAC GATTACGCCA 1080 bp
AAAACGGCAG AGCAAAGAGA TCGGTTGCTG GACGCTCTTA CGCAAATTGC GGATACTGAC 1140 bp
CCGCTTTTGT GCTACGAGGT GGATTCCATC ACCCAAGAGA TCATTCTTTC TTTTTTGGGC 1200 bp
CGGGTGCAGT TGGAGTTGT TTCCGCTTTG CTGGCGGAAA AGTATAAGAT TGAAACAGCG 1260 bp
GTGAAGGAAC CCACCGTCAT TTATTTAGAG CGGCCGCTCA AAGTGGCCAG CCACACCATC 1320 bp
CATATCGAGG TGCCGCCCAA CCCGTTTTGG GCATCCATCG GACTGTCTGT TACGCCGCTC 1380 bp
CCGCTTGGCT CCGGTGTACA ATACGAGAGC CGGGTTTCCC TGGGATACTT GAACCAGAGT 1440 bp
TTTCAAACG CTGTCATGGA TGGTATCCGT TACGGTCTGG AGCAAGGCTT GTGTGGCTGG 1500 bp
AACGTAACGG ACTGTAAGAT TTGCTTTGAA TACGGGCTTT ATTATAGCCC GGTCAGCACG 1560 bp
CCGGCGGACT TTCGCTCATT GGCCCCGATT GTATTGGAAC TGGCATTAAA GGAATCAGGG 1620 bp
ACACAGTTGC TGGAACCTTA TCTCTCCTTC ACCCTCTATG CGCCCAGGA ATACCTTTCC 1680 bp
AGGGCTTATC ATGATGCGCC GAAATATTGT GCCACCATCG AAACGGCCCA GATAAAAAAG 1740 bp
GATGAAGTTG TCTTTACTGG CGAGATTCCC GCCCGTTGCA TACAGGCATA CCGTACTGAT 1800 bp
TTGGCCTCTT ACACCAATGG GCGGAGCGTG TGCCTGACGG AACTGAAAGG GTATCAGGCC 1860 bp
GCTGTGCGCC AGCCGGTCAT CCAGCCCCGC CGTCCAAACA GCCGCCTGGA CAGGGTGCGC 1920 bp
CATATGTTTC AGAAGGTAAAT GTAACGTC 1948 bp

```

Abb.: 4.21: Sequenz des Gens *tet(W)* von 3922-03. Schwarz hinterlegt sind das Start- und das Stopcodon von *tet(W)*. Neben dem Gen sind außerdem noch einige Basenpaare der flankierenden Sequenzen dargestellt.

4.5.1.2 Untersuchungen zum Vorkommen des Gens *tet(33)*

Mittels interner Primer wurde *tetA(33)* bei 22,2 % (N = 8) der untersuchten Isolate nachgewiesen (s. Abb. 4.20). Dabei handelte es sich ausschließlich um Isolate, die auch über *tet(W)* verfügen. Als Vertreter für alle anderen positiven Isolate wurde das PCR-Amplifikat *tet(33)* von Isolat 1950-03 sequenziert. Dabei ergab sich eine absolute Identität mit der entsprechenden Region des *tetA(33)*-Gens aus *A. pyogenes*, das auf dem 9,3 kb großen Plasmid pAP2 lokalisiert ist (Jost *et al.*, 2003; GenBank-Zugangsnummer AY255627).

4.5.1.3 Untersuchungen zum Vorkommen des Gens *tet(Z)*

Einzig bei dem Isolat 4371-03 gab es in der Screening-PCR *tetA(Z)rev-A(Z)for* (s. Abb. 4.20) Hinweise auf das Vorhandensein eines internen Bereichs von dem bisher nur auf dem Plasmid pAG1 von *Corynebacterium glutamicum* beschriebene Gen *tet(Z)*. Mit Hilfe der PCRs *tetA(Z)endrev-A(Z)for*, *tetA(Z)rev-A(Z)for*, *tetA(Z)rev-R(Z)end*, *tetA(Z)intrev-R(Z)end*, *tetA(Z)extrev-R(Z)extfor* und *tetA(Z)intrev-R(Z)intfor* wurde versucht, einen kompletten Überblick über die Sequenz des Gens zu erhalten. In den PCRs *tetA(Z)endrev-A(Z)for* und *tetA(Z)extrev-R(Z)extfor* konnte keine Amplifizierung eines PCR-Produktes erreicht werden. Ein Versagen der PCRs auf Grund technischer Probleme wurde mittels der Positivkontrolle ausgeschlossen. Der amplifizierte Bereich umfasste daher das gesamte Gen für *tetR(Z)*, eine 98 bp lange Region zwischen *tetR(Z)* und *tetA(Z)* sowie 915 bp des Gens *tetA(Z)*. Die restlichen 240 bp des 5'-Endes von *tetA(Z)* konnten nicht amplifiziert werden, wodurch 80 Aminosäuren nicht darstellbar waren.

Im Gegensatz zu der von Tauch *et al.* (2000) veröffentlichten Sequenz (GenBank-Zugangsnummer AF121000) verfügt 4371-03 über keine Duplikationsstelle im Bereich zwischen Regulator- und Strukturgen. In Abbildung 4.22 ist das Ergebnis der Sequenzierung schematisch abgebildet.

Im Vergleich zu AF121000 wies die Sequenz von *tetA(Z)* in 4371-03 17 Basenaustausche auf, die acht Aminosäureaustausche zur Folge hatten. Die Basenabfolge von *tetR(Z)* dagegen war in beiden Bakterien identisch. In Abbildung 4.23 ist die ermittelte DNA- und Aminosäuresequenz des *tetA(Z)*-Fragments, sowie das komplette *tetR(Z)* von 4371-03 der bei *Corynebacterium glutamicum* veröffentlichten Sequenz gegenübergestellt.

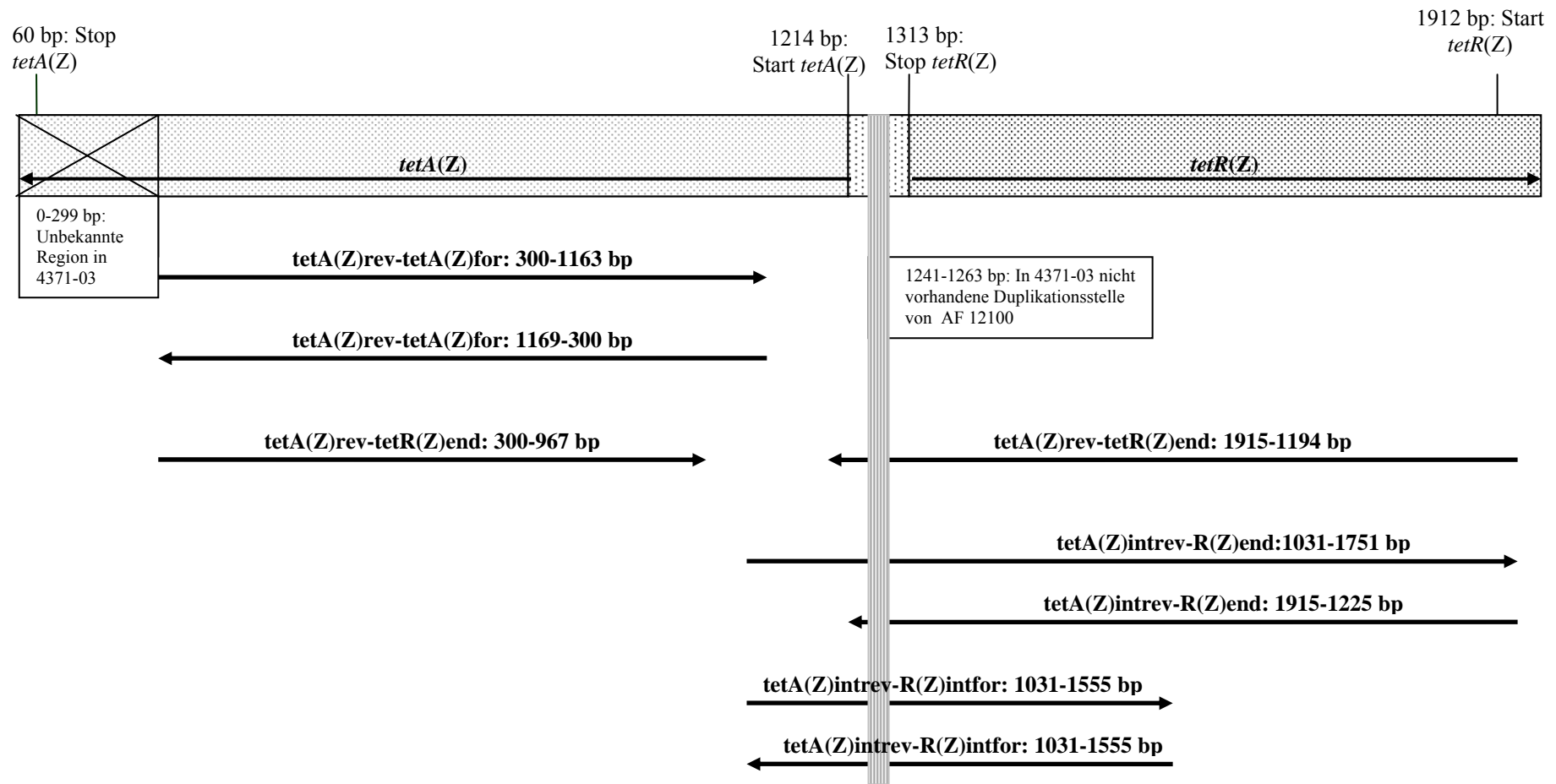


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der Sequenz von *tet(Z)* des Isolates 4371-03. Die Pfeilrichtungen geben die Sequenzierichtung an, die angegebenen Basenpaare das Sequenzintervall. Im Vergleich mit der von Tauch *et al.*(2000) veröffentlichten Sequenz von *te(Z)* bei *Corynebacterium glutamicum* (GenBank Zugangsnummer: AF121000) war es nicht möglich, das komplette Ende von *tetA(Z)* zu amplifizieren. Im Bereich zwischen Regulator- und Strukturgen fehlt bei 4371-03 eine von Tauch *et al.* (2000) angegebene Duplikationsstelle.

Ergebnisse

11821	<div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;">tetA(Z)extrev →</div> C G G G A G A C T T G A C T G G T G G C A G A G C G A T C C C G T C G C A T C G G G A T G G C A C C	AF121000 pAP1
11871	<div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;">tetA(Z)endrev →</div> T T A G C G C G G T T A T C G A G A T C G C C G T G A G G C G C A T G T C T C A C G G A T C A T C A <u>A A T A G C T C T A G C G G C A C T C C G C G T A C A G A G T G C C T A G T A G T</u> stop tetA(Z) * R S R R S A C T E R I M L	AF121000 pAP1
11921	G G A G G G C G C A G A G A A C G T A G A G C G C T G C G G C G C A G A T C C A G A G G T G C C G C C T C C C G C G T C T C T T G C A T C T C G C G A C G C C G C G T C T A G G T C T C C C A C G G C L A C L V Y L A A A C I W L T G	AF121000 pAP1
11971	T C T G C A T T C G T T C G G G T G A G T G C G A A A A T G C C G G T G A A G G T G A C C G G G C C A G A C G T A A G C A A G C C C A C T C A C G C T T T T A C G G C C A C T T C C A C T G G C C C G G D A N T R T L A F I G T F T V P G	AF121000 pAP1
12021	G A T G A T C G A G G T G A G G C T G T T C A G G C T T G C A A G T G T T C C C T G C A G G C G T C C T A C T A G C T C C A C T C C G A C A A G T C C G A A C G T T C A C A A G G A C G T C C G C A G I I S T L S N L S A L T G Q L R G	AF121000 pAP1
12071	C C T G C T G C T G C T C G G G C G C G C G T C T C G A G A G C A G C G T C T G C A G T G C G G G C G G A C G A C G A C G A G C C C G C G C G C A G A G C T C T C G T C G C A G A C G T C A C G C C C G Q Q Q E P A R R S L L T Q L A P	AF121000 pAP1
	<div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;">tetA(Z)rev →</div> A A C G T G A T G C T G C C G A G T C C G A G C G C T G C G A G G A T C G G T A G C A T C G C C C A T T G C A C T A C G A C G G C T C A G G C T C G C G A C C T C C T A G C C A T C G T A G C G G G T L T I S G L G L A A L I P L M A W 2 A A C G T G A T G C T G C C G A G T C C G A G C G C T G G A G G A T C G G T A G C A T C G C C C A	AF121000 pAP1
	<div style="text-align: center; margin-bottom: 5px;">tetA(Z)rev →</div> A A C G T G A T G C T G C C G A G T C C G A G C G C T G C G A G G A T C G G T A G C A T C G C C C A T T G C A C T A C G A C G G C T C A G G C T C G C G A C C T C C T A G C C A T C G T A G C G G G T L T I S G L G L A A L I P L M A W 2 A A C G T G A T G C T G C C G A G T C C G A G C G C T G G A G G A T C G G T A G C A T C G C C C A	4371-03

Abb. 4.23: Sequenzvergleich *tet(Z)* von AF121000 mit *tet(Z)*-Fragment von 4371. Nähere Angaben s. Abbildungsunterschrift, S. 125

Ergebnisse

12171	T G T G C T G G C G A T G A G G G C A A G G C C G A T G A G C C C	A	A T G G C G T C T G C G G C G A	AF121000 pAP1
	A C A C G A C C G C T A C T C C C G T T C C G G C T A C T C G G G	T	T A C C G C A G A C G C C G C T	
	T S A I L A L G I L G	I	I A D A A I	
52	T G T G C T G G C G A T G A G G G C A A G G C C G A T G A G C C C	G	A T G G C G T C T G C G G C G A	4371-03
		G		
12221	T A C C G A C G A G G A T C G C C C G G G T C T C G C C G A T C C G G G A C A C G A T G C G	H	C C G	AF121000 pAP1
	A T G G C T G C T C C T A G C G G G C C C A G A G C G G C T A G G C C C T G T G C T A C G C	A	G G C	
	G V L I A R T E G I R S V I R G	G		
102	T A C C G A C G A G G A T C G C C C G G G T C T C G C C G A T C C G G G A C A C G A T G C G	C	C C G	4371-03
		C		
12271	G T C A G T G C C G C C T G C A C G A A T A C	T	T G C A C C	AF121000 pAP1
	C A G T C A C G G C G G A C G T G C T T A T G	A	A A G G C T T C T A C C T A T C G C T	
	T L A A Q V F V Q V	M	G F I S L S	
152	G T C A G T G C C G C C T G C A C G A A T A C	G	T G C A C C	4371-03
		G	T T C C G A A G A T G G A T A G C G A	
		H		
12321	A A C G C C G A C T T C G A C G G G G T T C C A G T C G A G G C G C T G C T G C G T G A A G A G C A	H	A G C A	AF121000 pAP1
	T T G C G G C T G A A G C T G C C C C A A G G T C A G C T C C G C G A C G A C G C A C T T C T C G T	H	A G C A	
	V G V E V P N W D L R Q Q T F L V	H	A G C A	
202	A A C G C C G A C T T C G A C G G G G T T C C A G T C G A G G C G C T G C T G C G T G A A G A G C A	H	A G C A	4371-03
		H		
12371	C C C A G G T G G A G C C T G G T G C T T G G C C G A T G A A C T G C A C G A T G C C G A A	G	A C T	AF121000 pAP1
	G G G T C C A C C T C G G A C C A C G A A C C G G C T A C T T G A C G T G C T A C G G C T T	C	T G A	
	W T S G P A Q G I F Q V I G F V	H	A C	
252	C C C A G G T G G A G C C T G G T G C T T G G C C G A T G A A C T G C A C G A T G C C G A A	H	A C	4371-03
		H	A C	
		G		
12421	G C G A G A A G G A T A A G C A	H	C C C C G G C A C	AF121000 pAP1
	C G C T C T T C C T A T T C G T	A	G G G G C C G T G	
	A L L I L	M	G P V A T	
302	G C G A G A A G G A T A A G C A	C	C C C C G G C A C	4371-03
		C	G C G G T	
		G	G C T T C G C C G T A C C G G G	
		H	G C T T C G C C G T A C C G G G	
		H	G C T T C G C C G T A C C G G G	
		F	K A T G P	

Abb. 4.23: Sequenzvergleich *tet(Z)* von AF121000 mit *tet(Z)*-Fragment von 4371. Nähere Angaben s. Abbildungsunterschrift, S. 125

Ergebnisse

12471	T T G C	F	G T G C G T G C G A G C C G T T G C	F	G C C C G G T G G C C G C G T C T C A C G C A G A A	AF121000 pAP1
	A A C G	F	C A C G C A C G C T C G G C A A C G	F	C G G G C C A C C G G C G C A G A G T G C G T C T T	
	Q	F	A H S G N	Q	G P P R T E R L L	
352	T T G C	F	G T G C G T G C G A G C C G T T G C	G	G C C C G G T G G C C G C G T C T C A C G C A G A A	4371-03
		F		G		
12521	G A C T C	G	C G C T G A G T A C G A G G G T G A T T C C G G	C	G A G C G C G G C G G C G A C G A G G	AF121000 pAP1
	C T G A G	G	G C G A C T C A T G C T C C C A C T A A G G C C	G	C T C G C G C C G C C G C T G C T C C	
	S	G	S L V L T I G	A	L A A A V L	
402	G A C T C	A	C G C T G A G T A C G A G G G T G A T T C C G G	T	G A G C G C G G C G G C G A C G A G G	4371-03
		A		A		
		T		T		
12571	A A T G G C A G A T G C G G T G A G A C C C C G C C G A A A A G A C C G C C A A T G G C G G G A C C					AF121000 pAP1
	T T A C C G T C T A C G C C A C T C T G G G C G G C T T T T C T G G C G G T T A C C G C C C T G G					
	F P L H P S V G G F L G G I A P G					
452	A A T G G C A G A T G C G G T G A G A C C C C G C C G A A A A G A C C G C C A A T G G C G G G A C C					4371-03
12621	C G C G A T C A T G C C A C C G C C	G	T A G C A T G C G C C G A G C C A C C C G T A G C G T T T T G	C	A T C G T A C G C G G C T C G G T G G G C A T C G C A A A A C	AF121000 pAP1
	G C G C T A G T A C G G T G G C G G	C	Y C A G L W G Y R K A	A		
502	C G C G A T C A T G C C A C C G C C	A	T A G C A T G C G C C G A G C C A C C C G T A G C G T T T T G	T		4371-03
		T		T		
12671	C	G	C G C T G A T C C G G C G G A G T A A T G T C G G C G A T C A C C G T C G C G G T G A C G G C G	C	G A G C G G T G A C G G C G	AF121000 pAP1
	G	C	G C G A C T A G G C C G C C T C A T T A C A G C C G C T A G T G G C A G C G C C A C T G C C G C	G		
	R	C	Q D P P T I D A I V T A T V A	G		
552	C	A	C G C T G A T C C G G C G G A G T A A T G T C G G C G A T C A C C G T C G C G G T G A C G G C G	H	G A G C G G T G A C G G C G	4371-03
		H		H		
12721	T T C G T G G C G C C G G T A A T G C C T G C A A C C G C G C G G G C G A G G T A A A G A C C C A					AF121000 pAP1
	A A G C A C C G C G G C C A T T A C G G A C G T T G G C G C G C C C G C T C C A T T T T C T G G G T					
	N T A G T I G A V A R A L Y F V W					
602	T T C G T G G C G C C G G T A A T G C C T G C A A C C G C G C G G G C G A G G T A A A G A C C C A					4371-03

Abb. 4.23: Sequenzvergleich *tet(Z)* von AF121000 mit *tet(Z)*-Fragment von 4371. Nähere Angaben s. Abbildungsunterschrift, S. 125

Ergebnisse

12771	C A G C G T G T C C G T C A G T G C G A G C A C G A G G T A G T C G A T C G T C G C G C C T G C G A G T C G C A C A G G C A G T C A C G C T C G T G C T C C A T C A G C T A G C A G C G C G G A C G C T L T D T L A L V L Y D I T A G A L	AF121000 pAP1
652	C A G C G T G T C C G T C A G T G C G A G C A C G A G G T A G T C G A T C G T C G C G C C T G C G A	4371-03
tetA(Z)intrev →		
12821	G G G A G G C G A C A A G C A C G C G G C G G C G T C C G A A A C G G T C A G A G A G T C G G C C A C C C T C C G C T G T T C G T G C G C C G C C G C A G G C T T T G C C A G T C T C T C A G C C G G T S A V L V R R R G F R D S L R G	AF121000 pAP1
702	G G G A G G C G A C A A G C A C G C G G C G G C G T C C G A A A C G G T C A G A G A G T C G G C C A	4371-03
12871	A G G A T C G G G G C G C A A A G A A A C T G C A T G A T C G C A T A G A G C G C T G T C A G T A G T C C T A G C C C C G C G T T T C T T T G A C G T A C T A G C G T A T C T C G C G A C A G T C A T C L I P A C L F Q M I A Y L A T L L	AF121000 pAP1
752	A G G A T C G G G G C G C A A A G A A A C T G C A T G A T C G C A T A G A G C G C T G T C A G T A G	4371-03
12921	T C C G A C G T G C A G T G G G A T C A T G T C G T C G G G G G C A C C G A C C T G G T C G A G A A A G G C T G C A C G T C A C C C T A G T A C A G C A G C C C C G T G G C T G G A C C A G C T C T T G V H L P I M D D P A G V Q D L L	AF121000 pAP1
802	T C C G A C G T G C A G T G G G A T C A T G T C G T C G G G G G C A C C G A C C T G G T C G A G A A	4371-03
← tetA(Z)for		
12971	G G G T A G G C A A G A T C G G C A T C A C G A G G C C C A G C C C T G C A G C A T C G A G G G T C C C C A T C C G T T C T A G C C G T A G T G C T C C G G G T C G G G A C G T C G T A G C T C C C A G T P L I P M V L G L G A A D L T	AF121000 pAP1
852	G G G T A G G C A A G A T C G G C A T C A C G A G G C C C A G C C C T G C A G C A T C G A G G G T C	4371-03
13021	G C C G T G A T G A G C A C G G C T G T C A G G A T T C C A C G A T G A G A G T A G C G A G C A G T C G G C A C T A C T C G T G ← start tetA(Z) A T I L V	AF121000 pAP1
902	G C C G T G A T G A G C A C G G C T G T C A G G A T T C C A C - - - - -	4371-03
13071	C A G A T G A G A G T A G C G A G C A G T C A C T T T A T C T A A G A T A A A G T T A T C G A T G A 934 - - G A T G A G A G T A G C G A G C A G T C A C T T T A T C T A A G A T A A A G T T A T C G A T G A	AF121000 pAP1 4371-03
13121	T A A A G T G C A A C T A T G A C T C A C C A C C G G A A G C G T C T C G A C C G C A C G T C C G T 984 T A A A G T G C A A C T A T G A C T C A C C A C C G G A A G C G T C T C G A C C G C A C G T C C G T start tetR(Z) → M T H H R K R L D R T S V	AF121000 pAP1 4371-03

Abb. 4.23: Sequenzvergleich *tet(Z)* von AF121000 mit *tet(Z)*-Fragment von 4371. Nähere Angaben s. Abbildungsunterschrift, S. 125

Ergebnisse

13171 1034	G T T G C T C G G G G C C C G G C A G G T G C T C G A C G A G A C T G G G C T C G A T G G C T T C A G T T G C T C G G G G C C C G G C A G G T G C T C G A C G A G A C T G G G C T C G A T G G C T T C A L L G A R Q V L D E T G L D G F	AF121000 pAP1 4371-03
13221 1084	C C A C T C G C G C G C T G G C G G C T C A C T T A C A G G T A C A G C A G C C C G G C C T C T A C C C A C T C G C G C G C T G G C G G C T C A C T T A C A G G T A C A G C A G C C C G G C C T C T A C T T R A L A A H L Q V Q Q P G L Y	AF121000 pAP1 4371-03
13271 1134	T G G C A C T T C C G C A C G A A G G C C G A A C T C C T C G C A G C G C T G G C G A G C G A C G T T G G C A C T T C C G C A C G A A G G C C G A A C T C C T C G C A G C G C T G G C G A G C G A C G T W H F R T K A E L L A A L A S D V	AF121000 pAP1 4371-03
13321 1184	G C T T G A C C G A G A G C A T C A C G C T T C C T T C C C G A G T C C G A C G A G A A A T G G G G C T T G A C C G A G A G C A T C A C G C T T C C T T C C C G A G T C C G A C G A G A A A T G G G L D R E H H A S F P E S D E K W	AF121000 pAP1 4371-03
	← tetR(Z) intfor/tet	
13371 1234	A C G C A T T T C T C T T G C G A A A C G C A A G A A G T T T C C G C C A C G C A C T A C A C G C G A C G C A T T T C T C T T G C G A A A C G C A G G A A G T T T C C G C C A C G C A C T A C A C G C G D A F L L R N A R S F R H A L H A	AF121000 pAP1 4371-03
	R(Z)rev →	
13421 1284	G T C C G T G A C G G T G C G C G T C T C C A C G C T G A G C A C C A C C G C A G A C C A T C C G G G T C C G T G A C G G T G C G C G T C T C C A C G C T G A G C A C C A C C G C A G A C C A T C C G G V R D G A R L H A E H H R R P S G	AF121000 pAP1 4371-03
13471 1334	C G A C G A C A C C G A C G A A G G A G C T G A G G C T T C C G G T C A G C A A G T C G G G C T T C C G A C G A C A C C G A C G A A G G A G C T G A G G C T T C C G G T C A G C A A G T C G G G C T T C D D T D E G A E A S G Q Q V G L	AF121000 pAP1 4371-033
13521 1384	T C G T G T C T C A G G G A T T C G A T G A A C A G A C A G C C A T C A G C A T G C T C A T C G C G T C G T G T C T C A G G G A T T C G A T G A A C A G A C A G C C A T C A G C A T G C T C A T C G C G L V S Q G F D E Q T A I S M L I A	AF121000 pAP1 4371-03
13571 1434	G T C A G C C G A T A C A C C G T C G G T G T C G T A C T G G A G G A G C A A A C C G C A G A G G T G T C A G C C G A T A C A C C G T C G G T G T C G T A C T G G A G G A G C A A A C C G C A G A G G T V S R Y T V G V V L E E Q T A E V	AF121000 pAP1 4371-03

Abb. 4.23: Sequenzvergleich *tet(Z)* von AF121000 mit *tet(Z)*-Fragment von 4371. Nähere Angaben s. Abbildungsunterschrift, S. 125

Ergebnisse

```

13621 C G G C A A T G C G A G C G T T C C T G A A C G C G A C C G G G A A T T C G A T T T C G G C C T G A AF121000 pAP1
1484 C G G C A A T G C G A G C G T T C C T G A A C G C G A C C G G G A A T T C G A T T T C G G C C T G A 4371-03
      G N A S V P E R D R E F D F G L

13671 C A G C A C T G A T C G A C G G A T T C T C T C A C T C C C G C A C A G C G T C A T T G A C C T C G AF121000 pAP1
1534 C A G C A C T G A T C G A C G G A T T C T C T C A G T C C C G C A C A G C G T C A T T G A C C T C G 4371-03
      T A L I D G F S H S R T A S L T S

      ← tetR(Z)endfor
13721 A G C G A A T C G T G A C C T C A T T C G A C G C T C A G C G G G T T C G C G C G A G A C G G G A A AF121000 pAP1
1538 A G C G A A T C G T G A C C T
      stop tetR(Z)
      S E S *

13771 A A G A T C C C G T C C A C C A T A A G C G C C A G A C C G AF121000 pAP1

```

Abb. 4.23: Vergleich der Sequenzen im Bereich des *tet(Z)*-Gens des *A. pyogenes*-Wildstamms 4371-03 zur Referenzsequenz aus *C. glutamicum* (GenBank-Zugangsnummer AF121000). Dargestellt ist die Sequenz in Richtung der Ablesung von *tetR(Z)* entsprechend der Angabe in AF121000, für das in Gegenrichtung abgelesene *tetA(Z)* ist zusätzlich der Gegenstrang angegeben. Die Aminosäuresequenz der Gene ist im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben, kodierende Bereiche sind fett dargestellt. Austausche von Basenpaaren und Aminosäuren sind mit Rahmen markiert. Zusätzlich angegeben sind die verwendeten PCR- bzw. Sequenzier-Primer.

4.5.2 Plasmiddetektion

Einschließlich der sensiblen Isolate wurden alle „LMU-Arcanobakterien“ auf das Vorhandensein von Plasmiden untersucht. Lediglich bei dem Isolat 4371-03 konnte ein Plasmid identifiziert werden. Dabei handelte es sich um ein ca. 2,5 kbp großes Plasmid mit einer *EcoR* I-, jedoch ohne *HindIII*-Schnittstelle und *EcoRV*-Schnittstelle. Da es auf Grund der im Vergleich zu pAP1 geringen Größe (Billington *et al.*, 1998) und der im Unterschied zu pAP2 (Jost *et al.*, 2003) nicht vorhandenen *HindIII*- und *EcoRV*- Restriktionsstellen nicht mit den bisher bei Arcanobakterien beschriebenen Plasmiden identisch war, erhielt es den Namen pCWEA4371.

4.6 Zusammenhang der ermittelte MHK mit dem zugrunde liegenden Genotyp

Der mittels Bouillonmikrodilution ermittelte MHK-Wert der tetracyclinresistenten „LMU-Arcanobakterien“ wurde mit den detektierten *tet*-Genen verglichen (s. Tab. 4.18) Wie bereits in Kap. 4.4 geschildert, konnte bei keinem Arcanobakterium, das vom Schwein stammte, ein *tet*-Gen nachgewiesen werden, alle positiven Ergebnisse der jeweiligen PCR waren bovinen Ursprungs. Bei elf Isolaten konnte keine *tet*-Determinante detektiert werden. Dazu gehörten zwei Rinder-Stämme, deren MHK bei 16 µg/ml lag, sowie acht porcine Isolate und ein Isolat unbekannter Herkunft, deren MHK bei 8 µg/ml lag.

Die Mehrheit (N = 9) der ausschließlich *tet*(W)-positiven Isolate (N = 16) wies eine MHK von 16 µg/ml auf, zwei Isolate hatten eine MHK von 32 µg/ml, bei einem Stamm betrug die MHK 8 µg/ml und vier der ausschließlich *tet*(W)-positiven Stämme hatte eine MHK von 64 µg/ml. Sieben der *tet*(W) und gleichzeitig *tet*(33) positiven Stämme (N = 8) hatten eine MHK von 32 µg/ml, bei einem dieser Genotypen lag die MHK bei 64 µg/ml. Das einzige Isolat mit nachgewiesenem *tet*(Z)-Fragment hatte eine MHK von 8 µg/ml.

Tab. 4.18: Vergleich gefundener *tet*-Gene mit ermittelter MHK

	8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml	Summe
ausschließlich <i>tet</i> (W)	1	9	2	4	16
<i>tet</i> (W)+ <i>tet</i> (33)			7	1	8
<i>tet</i> (Z)	1				1
ohne <i>tet</i> -Determinante	9	2			11
Summe	11	11	9	5	36

5. Diskussion

Zunehmende Berichte über antibiotikaresistente Mikroorganismen (Aarestrup, 1999; Mateu und Martin, 2000; Witte, 2000) führten in den letzten Jahren zu verschiedenen Maßnahmen, die die Weiterverbreitung von Resistenzen eindämmen sollen. Hierzu gehören ein kontrollierter Einsatz der Wirkstoffe in der Praxis („Antibiotika-Leitlinien“; siehe <http://www.bundestieraerztekammer.de>), die Etablierung fundierter Methoden zur Bestimmung und Beurteilung von Resistenzen im Labor (Schwarz *et al.*, 2003) sowie die Etablierung von Monitoring-Studien zur Ermittlung der momentanen Resistenzsituation und zur Beobachtung der zukünftigen Entwicklung (Wallmann *et al.*, 2003 a, b). Für eine Reihe von tierpathogenen Bakterien (zum Beispiel *Enterobacteriaceae*, Staphylokokken, Streptokokken) sind geeignete Verfahren zur Untersuchung von Resistenzen schon seit längerem etabliert (CLSI, 2002), für andere Erreger hingegen gibt es (zumeist aufgrund einer hohen Empfindlichkeit gegenüber den wichtigsten Wirkstoffen) nur wenige Untersuchungen. Zu diesen wenig untersuchten Bakterien gehört, sowohl was die Methodik der Empfindlichkeitsbestimmung als auch was bekannte Daten zu Resistenzraten und zugrunde liegenden Genen betrifft, *A. pyogenes*.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung von *A. pyogenes* erarbeitet und für insgesamt 115 Bakterienisolate angewandt. Zusätzlich wurde bei 36 Isolaten die Resistenz gegenüber Tetracyclinen genotypisch untersucht.

5.1 Etablierung der Bouillonmikrodilution zur Empfindlichkeitsprüfung von *A. pyogenes*

Zur *In-vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien können verschiedene Methoden eingesetzt werden (Diffusions-, Agardilutions- und Bouillondilutionsmethoden; Schwarz *et al.*, 2003). Unter Berücksichtigung von Verlässlichkeit und Praktikabilität wird momentan die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillonmikrodilution als Methode der Wahl angesehen (Schwarz *et al.*, 2003). Um eine Vergleichbarkeit der ermittelten Daten und der daraus abgeleiteten Bewertung ("sensibel" - "resistent") zu gewährleisten, ist es notwendig, die Durchführung soweit wie möglich zu standardisieren. Zu diesem Zweck existieren verschiedene Vorschriften, von denen für die Tiermedizin die wichtigste das Dokument M31-A2 des US-amerikanischen „Clinical Laboratory Standards Institute“ (CLSI) ist.

Im CLSI-Dokument M31-A2 (2002) werden für schnellwachsende, aerobe Bakterien genaue Durchführungsvorschriften angegeben und für einige Bakterien, die unter den üblichen

Bedingungen nicht zu testen sind, spezielle Empfehlungen formuliert. Hinsichtlich der Empfindlichkeitstestung von *A. pyogenes* wird jedoch nur erläutert, dass die Agardiffusion auf Grund des langsamen Wachstums der Bakterien zu nicht eindeutigen Ergebnissen führt und aus diesem Grund die Mikrodilution vorzuziehen ist (CLSI, 2002). Über die Nichtanwendbarkeit der Agardiffusion berichteten auch Arvidson *et al.* (1981) sowie Guérin-Faublée (1993 b). Weitere Angaben macht das CLSI-Dokument nicht. In anderen Untersuchungen zur Empfindlichkeit von *A. pyogenes* wurde die Bouillonmikrodilution selten und mit unterschiedlichem Versuchsablauf verwendet (Narayanan *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2001; Billington *et al.*, 2002 b; Trinh *et al.*, 2002). Daher mussten verschiedene Parameter der CLSI-Testmethode untersucht und für *A. pyogenes* adaptiert werden. Diese Parameter waren die Menge der zu untersuchenden Bakterien (Inokulumdichte), die zu verwendende Nährbouillon sowie die Inkubationsatmosphäre.

Zur Standardisierung der eingesetzten Bakterienmenge wird nach CLSI-Dokument M31-A2 (2002) der McFarland-Standard (McF) 0,5 herangezogen, der etwa 10^8 KBE/ml entspricht. Als Inokulum sollen $2-8 \times 10^5$ KBE/ml eingesetzt werden. Bei *A. pyogenes* konnte festgestellt werden, dass eine der optischen Dichte eines McF 0,5 äquivalente Bakteriensuspension ca. 3×10^8 KBE/ml enthält und damit dreimal so hoch ist wie der vom CLSI-Dokument angegebene Wert. Als Grund für diese Abweichung kann die geringe Größe des Bakteriums vermutet werden.

In Versuchen mit zwei *A. pyogenes*-Wildstämmen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die MHK von sechs untersuchten Antibiotika nach 24 Stunden selbst bei einer Erhöhung der Inokulumdichte um den Faktor 10 gleich bleibt. Der Grund hierfür ist möglicherweise in der im Vergleich zu *E. coli* mehr als doppelt so langen Generationszeit der Arcanobakterien zu sehen. Obwohl also das Inokulum in einem gewissen Umfang variabel sein kann, ohne dass der MHK-Wert verändert wird, ist es gerade im Rahmen von Monitoringprogrammen wichtig, die Resistenztestung so valide wie möglich durchzuführen. Da Modifizierungen der vom CLSI empfohlenen Vorgehensweise zur Inokulumseinstellung auch für andere Bakterien beschrieben sind (EUCAST, 2003) wurde die Suspensionsmenge, die in 10 ml Medium verdünnt wird, von der im CLSI-Dokument M31-A2 empfohlenen Menge von 50 μ l auf 15 μ l gesenkt (entsprechend einer Dilution von 1:667). Mit dieser Modifizierung war es möglich, bei 129 von 167 Versuchen im Rahmen des vom CLSI empfohlenen Soll-Wertes von $2-8 \times 10^5$ KBE/ml zu bleiben. Auf Grund der Tatsache, dass in einem begrenzten Umfang veränderte Inokulumdichten von Arcanobakterien nur einen geringen bis gar keinen Einfluss

auf den MHK-Wert haben, wurde ein Dichtebereich von $0,5-10 \times 10^5$ KBE/ml Inokulum für eine valide MHK-Ermittlung als ausreichend bewertet.

Im CLSI-Dokument M31-A2 wird kationen-adjustierte Müller-Hinton-Bouillon (CaMHB) als Medium der Wahl für Resistenztestungen mittels Bouillonmikrodilution angegeben. In Übereinstimmung mit der Literatur, in der das Wachstum von *A. pyogenes* im Nährmedium als abhängig von der Zugabe von Häm und HCO_3 beschrieben ist (Reddy *et al.*, 1983; Schaal, 1986; Guérin-Faubleé *et al.*, 1993 b), ist CaMHB für die Empfindlichkeitstestung von Arcanobakterien ungeeignet. Bei Inkubation unter CO_2 -Zuführung war zwar im Röhrchen eine verminderte Transparenz des CaMHB-Mediums feststellbar, in der Mikrotiterplatte reichte das Wachstum jedoch nicht aus, um eine sichtbare Knopfbildung zu verursachen und damit eine MHK-Ablesung zu ermöglichen.

Aus diesem Grund wurden verschiedene, in der Literatur zur Durchführung der Bouillonmikrodilution bei *A. pyogenes* beschriebene Medien auf ihre Eignung hin untersucht. Dabei handelte es sich um CaMHB, supplementiert mit 2 % fetalem Kälberserum (FKS; Olson *et al.*, 2002) und 2 % (Billington *et al.*, 2001) bzw. 5 % (Krabisch, TGD Bayern, persönliche Mitteilung, 2004) lysiertem Pferdeblut (IPb). Als Medium der Wahl für hochanspruchsvolle Mikroorganismen empfiehlt das CLSI (2002) das "veterinary fastidious medium" (VFM). Da jedoch keine Angaben darüber gemacht werden, welche Bakterien als hochanspruchsvoll zu gelten haben und Arcanobakterien auf Grund ihrer Kultivierungsansprüche in diese Gruppe gerechnet werden könnten, wurde auch VFM getestet.

Bei der Testung von drei Isolaten mit acht Wirkstoffen führte VFM zu MHK-Abweichungen von bis zu vier Titerstufen im Vergleich zu allen anderen Medien. Dass die Verwendung von VFM beinahe immer mit einer höheren MHK assoziiert war, kann zum einen am hohen Nährstoffgehalt und damit am deutlich besseren bakteriellen Wachstum liegen, zum anderen ist die Ablesung der MHK mit diesem Medium durch nicht bakterielle Plaquebildung erschwert und es kann somit auch aus diesem Grund zu falsch hohen Ergebnissen kommen. Letzteres gilt in geringerem Maße auch für CaMHB-5%Pb. Durch die dunkle Farbe dieses Mediums ist die Ablesung der MHK außerdem zusätzlich erschwert. Aus diesen Gründen können beide Medien nicht zur Verwendung in der Bouillonmikrodilution empfohlen werden. Die MHK-Ablesung unter Verwendung von CaMHB-2%FKS war durch die deutlich ausgeprägte „Knopfbildung“ der Bakterien im Medium am einfachsten. Einzig bei der Testung von sulfonamidhaltigen Antibiotika war die Auswertung in diesem Medium nicht eindeutig möglich. Ursache hierfür ist eine bei der Testung dieser Wirkstoffgruppe

auftretende bakterienhaltige Plaquebildung, die auch von anderen Bakterien, die in CaMHB ohne weitere Zusätze getestet werden, bekannt ist (CLSI, 2002). Sulfonamide inhibieren die Folsäuresynthese und damit den Purinstoffwechsel. Einige Bakterien sind jedoch in der Lage, exogenes Thymidin aufzunehmen und ihrem eigenen Metabolismus zuzuführen (Jones *et al.*, 1987). Die Fähigkeit dazu ist abhängig von der Bakterienspezies, *Streptococcus pneumoniae* ist zum Beispiel nicht in der Lage, exogenes Thymidin zu mobilisieren, während *E. coli*, *Streptococcus agalactiae* und Enterokokken unterschiedliche Mengen nutzen können (Jones *et al.*, 1987). CaMHB ist zwar arm an Thymidin (CLSI, 2002), zum Verlust der Wirkung von Sulfonamiden genügen jedoch schon geringste Mengen an Thymidin, wie Jones *et al.* (1987) am Beispiel von *Staphylococcus epidermidis* zeigen konnten. Die MHK-Ablesung von in CaMHB getesteten, zur Thymidinaufnahme befähigten Bakterien erfolgt daher an der Konzentrationsstufe, an der das bakterielle Wachstum zwar sichtbar, im Vergleich zur Wachstumskontrolle jedoch deutlich gehemmt ist. Laut Literatur lässt sich der Einfluss des exogenen Thymidins auf sulfonamidhaltige Antibiotika umgehen, indem man der Nährbouillon Thymidin-Phosphorylase zuführt. Dadurch wird das im Medium vorhandene Thymidin zu Thymin abgebaut und kann vom Bakterium (Ausnahme *Enterococcus faecalis*) nicht mehr verstoffwechselt werden (Jones *et al.*, 1987). Reich an Thymidin-Phosphorylase ist lysiertes Pferdeblut, bei dem es mit Erythrozyten assoziiert vorliegt. Lysiertes Blut anderer Tiere incl. des Rindes weist dagegen keine Enzymaktivität auf (Ferone *et al.*, 1975). Arcanobakterien scheinen in der Lage zu sein, exogenes Thymidin in großen Mengen zu nutzen, da Unterschiede im Wachstum in CaMHB-2%FKS in Anwesenheit von Sulfonamiden im Vergleich zur Wachstumskontrolle nur schwer auszumachen waren. Daher ist CaMHB-2%FKS zur Testung von sulfonamidhaltigen Antibiotika ungeeignet.

Neben CaMHB-2%FKS war auch CaMHB-2%Pb gut auswertbar, wenn auch mit weniger deutlichen Knöpfen. Auch Sulfonamide und potenzierte Sulfonamide ließen sich, wie erwartet, gut ablesen. Beim Vergleich der in beiden Medien ermittelten MHK-Werte für sieben verschiedene Wirkstoffe (Enrofloxacin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Tulathromycin, Spiramycin, Gentamicin und Neomycin) waren Unterschiede von mehr als einer Titerstufe bei weniger als 10 % der ermittelten Werte (N = 280) feststellbar. Laut CLSI (2002) ist eine MHK-Abweichung von einer Stufe als nicht deviant zu bewerten. Auf Grund der Annahme, dass eine Titerstufenabweichung um jeweils eine Stufe nach oben oder unten ausgehend vom häufigsten MHK-Wert eines Stammes auch bei korrekter Versuchsdurchführung möglich ist, setzten Wallmann *et al.* (2005) in dem 2003 durchgeführten, deutschlandweiten Ringversuch einen als akzeptabel zu bewertenden MHK-Bereich fest, der sich über drei Titerstufen

erstreckte. Analog werden sich über mehrere (in der Regel drei) Titerstufen erstreckende "richtige" MHK-Werte auch für die Referenz- bzw. Kontrollstämmen für die Bouillondilution angegeben (CLSI, 2002).

Bei Enrofloxacin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Tulathromycin und Spiramycin war bei der Untersuchung von 40 Isolaten hinsichtlich der MHK kein signifikanter Unterschied zwischen den Medien CaMHB-2%FKS und CaMHB-2%Pb auszumachen (s. Tab. 4.11-4.14, S.103 ff.). Für die Aminoglykoside Gentamicin und Neomycin hingegen ergaben sich beim Vergleich der beiden untersuchten Medien signifikante Unterschiede in den MHK-Werten (s. Tab. 4.12, S. 104). Insbesondere bei Gentamicin, bei dem mehr als 40 % der MHK-Werte um zwei Titerstufen auseinander lagen, scheint eine Interferenz mit einem Medienbestandteil vorzuliegen. Als Ursache hierfür sind zwei Mechanismen vorstellbar: Zum einen eine Interferenz des jeweiligen Zusatzes mit der Aktivität des Antibiotikums und zum anderen eine Einflussnahme des jeweiligen Supplements auf das Wachstum der Bakterien. Interaktionen von Medienzusätzen mit antibiotischen Wirkstoffen sind beispielsweise von humanem Serum in Bezug auf eine Aktivitätsminderung von Ceftriaxon und Cefoperazon bekannt (Perl *et al.*, 1990). Ein derartiger Einfluss von FKS konnte in einem zusätzlichen Versuch zumindest für Tetracyclin ausgeschlossen werden, wurde für die Aminoglykoside aber nicht näher untersucht. Bezüglich einer durch die Zusätze bedingten Beeinflussung des bakteriellen Wachstums und somit der MHK konnte mit Hilfe von Wachstumskurven gezeigt werden, dass Arcanobakterien in CaMHB-2%FKS zwar eine kürzere Generationszeit besitzen als in CaMHB-2%Pb, die Plateauphase jedoch in beiden Medien nach 24-stündiger Inkubation erreicht wird (s. Abb. 4.13 und 4.14, S. 101). In Anwesenheit eines antibakteriellen Agens und damit einer möglichen Beeinflussung des Wachstumsverhaltens ist es vorstellbar, dass Bakterien, deren wahre MHK zwischen zwei Titerstufen liegt, in CaMHB-2%FKS auf Grund des schnelleren Wachstums nach 24 Stunden um eine Titerstufe höher liegen, als sie es in CaMHB-2%Pb tun. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass die in den beiden Medien ermittelten MHK-Werte von Gentamicin und Neomycin eine Abweichung von maximal zwei Titerstufen aufwiesen. Da aufgrund der MHK-Verteilung (und dem für Gentamicin im CLSI-Dokument angegebenen Grenzwert) angenommen werden kann, dass es sich bei den untersuchten Bakterien um die sensible Normalpopulation handelt, ist es vorstellbar, dass die kürzere Generationszeit von Arcanobakterien in CaMHB-2%FKS bei der Untersuchung von Gentamicin und Neomycin zu einer Titerstufenerhöhung führt. Eine ähnliche Beobachtung konnte in geringerem Umfang auch für Tetracyclin gemacht werden, bei dessen Untersuchung Isolate, die unterschiedliche MHK-Werte in beiden Medien aufwiesen, im sensiblen Bereich

(MHK unter 4 µg/ml) die höhere MHK-Stufe immer in CaMHB-2%FKS aufwiesen, während bei höheren MHK-Werten die höhere Titerstufe in beiden Medien vorliegen konnte. Für Gentamicin wurden Probleme mit Abweichungen in der MHK bei der Testung der gleichen Isolate auch schon früher im Rahmen eines Ringversuches zur Etablierung der Bouillonmikrodilution beobachtet (Wallmann *et al.*, 2003). Genaue Ursachen hierfür sind nicht bekannt. In Hinsicht auf eine qualitative Beurteilung als „resistent“ oder „sensibel“ im Rahmen einer klinischen Untersuchung ist anzumerken, dass sich aus dem beobachteten Unterschied von zwei MHK-Stufen (MHK = 0,5 µg/ml bei CaMHB-2%Pb gegenüber 2 µg/ml bei CaMHB-2%FKS) keine Unterschiede bezüglich der Interpretation „sensibel“ ergeben hätten.

Als dritter Parameter neben Inokulumsmenge und zu verwendendem Medium war zu beurteilen, ob eine Inkubation unter aeroben Bedingungen möglich ist oder ob Änderungen der Inkubationsatmosphäre notwendig sind. In früheren Studien wurde die Bouillonmikrodilution sowohl unter aeroben Bedingungen (Trinh *et al.*, 2002) als auch unter CO₂-Supplementierung (Billington *et al.*, 2002 b) durchgeführt.

In mit CO₂ angereicherter Atmosphäre wuchsen Arcanobakterien in der vorliegenden Arbeit wie zu erwarten deutlich schneller als im aeroben Milieu (s. Abb. 4.12, S. 100). Nach 24 Stunden konnte jedoch in beiden Fällen eine deutliche Verlangsamung des Wachstums (auf unterschiedlichem Niveau) beobachtet werden, die Plateauphase wurde in mit CO₂-angereicherter Atmosphäre nach ca. 24 Stunden erreicht, bei aerober Inkubation dagegen erst nach ca. 36 Stunden. Bei einem Vergleich der MHK-Stufen von drei Isolaten für acht Wirkstoffe zeigte sich, dass 70 % aller Werte (N = 96) nach aerober und nach Inkubation unter Zugabe von CO₂ nach 24 Stunden identisch waren, eine MHK-Abweichung von mehr als zwei Stufen war in keinem Fall feststellbar. Die unter Zusatz von CO₂ inkubierten Mikrotiterplatten waren jedoch wesentlich besser ablesbar, was darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund des besseren Wachstums der Bakterien im CO₂-reichen Milieu nach 24 Stunden mehr Bakterien in der Kavität vorhanden sind, ohne dass die Höhe der MHK beeinflusst würde. Daher konnte der CO₂-Bebrütung der Vorzug gegeben werden, wobei zu beachten ist, dass das CLSI-Dokument generell empfiehlt, eine Inkubation in mit CO₂-angereicherter Atmosphäre nur durchzuführen, wenn es als wirklich notwendig erachtet wird. In diesem Falle ist darauf zu achten, zum einen 3-5 Vol% CO₂ zu verwenden und zum anderen regelmäßig Referenzstämme unter diesen Bedingungen mitzuführen. Für Tetracyclin, das als besonders empfindlich für pH-Wert-Änderungen bedingt durch die Diffusion von CO₂ in das Medium gilt (CLSI, 2002), konnte anhand von zusätzlich durchgeführten Versuchen

mit MHK-Referenzstämmen ein Aktivitätsverlust ausgeschlossen werden. Bei der weiteren Testung von Arcanobakterien unter Zusatz von 3 Vol% CO₂ wurden regelmäßig Referenzstämme mitgeführt, die im erwarteten Rahmen blieben. Aus diesen Gründen ist sowohl eine aerobe als auch eine mit CO₂ angereicherte Inkubationsatmosphäre zur Durchführung der Bouillonmikrodilution von *A. pyogenes* geeignet. Eine Ablesung der Platten ist in beiden Fällen nach 24 Stunden möglich, bei aerober Bebrütung jedoch schwierig, weshalb der Zusatz von CO₂ unter Mitführen von Kontrollstämmen erwogen werden sollte.

Aufgrund der dargelegten Versuche wurde entschieden, für Empfindlichkeitsbestimmungen von *A. pyogenes* als Medium CaMHB-2%Pb zu verwenden, wenn verschiedene Wirkstoffe zu untersuchen sind. Insbesondere ist CaMHB-2%Pb zu verwenden, wenn dabei auch Sulfonamide oder potenzierte Sulfonamide getestet werden. Die Testung von 65 Isolaten mit diesem Medium führte allgemein zu gut ablesbaren MHK-Werten. Für CaMHB-2%Pb spricht auch, dass das Medium bereits für die Empfindlichkeitstestung von Streptokokken und Listerien etabliert ist (CLSI, 2002), wohingegen für CaMHB-2%FKS bisher erst wenige Erfahrungswerte vorliegen.

Für die Untersuchung einzelner Wirkstoffe kann aufgrund der leichteren Ablesbarkeit auch CaMHB-2%FKS eingesetzt werden, wenn dargelegt wird, dass sich keine Unterschiede in der MHK ergeben. Dies konnte besonders für Tetracyclin, aber auch für Enrofloxacin, Chloramphenicol, Spiramycin und Tulathromycin, nicht aber für die Aminoglykoside Gentamicin und Neomycin, gezeigt werden. Für Tetracyclin wurde als zusätzliche Kontrolle eine Agardilution mit 55 *A. pyogenes*-Isolaten angefertigt, die als Referenzmethode angesehen wird (CLSI, 2002). Die ermittelten Werte wiesen keine signifikanten Unterschiede zu denen in der Bouillonmikrodilution mit CaMHB-2%FKS eruierten MHK-Stufen auf. Auch eine Wiederholbarkeit der mit diesem Medium ermittelten Werte war gegeben, so dass CaMHB-2%FKS geeignet ist, die tatsächliche Resistenzlage von Arcanobakterien gegenüber Tetracyclin zu reflektieren.

Durch die Reduktion der Suspensionsmenge (adjustiert auf McF 0,5) von 50 µl nach CLSI M31-A2 (2002) auf 15 µl, die zu 10 ml des Testmediums gegeben wird, konnte eine Inokulumdichte von 0,8-10 x 10⁵ KBE/ml eingehalten werden. Da MHK-Verschiebungen bei etwas abweichenden Inokula nicht beobachtet wurden, könnten auch 0,5-10 x 10⁵ KBE/ml als akzeptabel gelten. Eine Supplementierung der Inkubationsatmosphäre mit 3 Vol% CO₂ veränderte in den durchgeführten Untersuchungen die MHK-Werte nicht, ermöglichte aber

eine zweifelsfreie MHK-Ablesung und wird daher (unter Kontrolle durch das Mitführen von Referenzstämmen) empfohlen.

5.2 Minimale Hemmkonzentrations-Werte und Beurteilung der Resistenzlage der untersuchten *A. pyogenes*-Isolate

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 115 *A. pyogenes*-Isolate auf ihre Empfindlichkeit hinsichtlich antimikrobieller Wirkstoffe untersucht. Ein Teil dieser Isolate (N = 53) umfasste Stämme von Rindern und Schweinen aus dem süddeutschen Raum mit unterschiedlichster Herkunft (s. Tab. 3.1, S. 55) und vorheriger Behandlung der Tiere mit Antibiotika. Diese Isolate wurden bezüglich ihrer Resistenz gegenüber Penicillin G, Erythromycin und Tetracyclin klassifiziert und im Rahmen der detaillierten Untersuchungen zur Tetracyclinresistenz (siehe Abschnitt 5.3) verwendet. Der andere Teil der Isolate (N = 62) wurde im Rahmen des "BfT-GermVet"-Programms untersucht und beinhaltete Isolate aus ganz Deutschland, aber nur von drei definierten Indikationen (s. Tab. 3.2, S. 56 f.). Von diesen Isolaten wurden MHK-Werte für 24 verschiedene Antibiotika ermittelt.

Generell ist zu bedenken, dass eine Beurteilung der ermittelten Daten (1) in Bezug auf eine Resistenzentwicklung und (2) beim Vergleich verschiedener tierartlicher oder regionaler Bakterienpopulationen grundsätzlich schwierig ist und unter dem Vorbehalt gesehen werden muss, dass in der Vergangenheit verschiedene Methoden für die Bestimmung der Resistenzraten bei Arcanobakterien eingesetzt wurden (s. Tab. 2.6, S. 30 ff.). Zu beachten ist beispielsweise, dass in keiner der veröffentlichten Studien Angaben zur ermittelten Inokulumdichte gemacht wurden. Die angegebenen Methoden zur Dichteeinstellung führen nach eigenen Untersuchungen zu einer im Bezug auf die Vorgaben des CLSI deutlich erhöhten Inokulumdichte. Die Bouillonmikrodilution mit CaMHB-2%Pb wurde bisher nur von Trinh *et al.* (2002) - jedoch unter aeroben Bedingungen - und Billington *et al.* (2002 b) durchgeführt, in den meisten anderen Untersuchungen wurde die Agardilutionsmethode unter Verwendung unterschiedlicher Zusätze bevorzugt (Endres, 1983; von Buchholz, 1985; Prescott und Yielding, 1989; Guérin-Faublée *et al.*, 1993 a; Jousimies-Somer *et al.*, 1996; Yoshimura *et al.*, 2000; Sheldon *et al.*, 2004).

Für die Behandlung von Infektionen mit Arcanobakterien werden als Mittel der Wahl **β -Lactam-Antibiotika** angegeben (Lämmler und Hartwigk, 1995). Schaal (1986) gibt in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* an, dass *A. pyogenes* sich *in-vitro* durch eine prinzipielle Penicillin-Empfindlichkeit auszeichnet. Auch in verschiedenen anderen Studien

wies die Spezies eine generelle Empfindlichkeit gegenüber β -Lactam-Antibiotika auf (Endres, 1983; von Buchholz, 1985; Jousimies-Somer, 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diese Tatsache bestätigt werden. Alle Isolate wiesen gegenüber Penicillin G einen MHK-Wert von unter $0,125 \mu\text{g/ml}$ auf. Die Isolate, die gegenüber weiteren β -Lactam-Antibiotika überprüft wurden, erwiesen sich als hochempfindlich für Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure und als empfindlich für vier verschiedene Cephalosporine (s. Tab. 8.3, S. 179 f. und 8.5, S. 183 f.). Grenzwerte für eine Beurteilung der ermittelten MHK als "sensibel", "intermediär empfindlich" oder "resistent" liegen spezifisch für Arcanobakterien weder im CLSI-Dokument, noch an anderer Stelle vor. Ersatzweise kann versucht werden, die im CLSI-Dokument für "andere Bakterien" ohne Angabe einer Spezies angegebenen Werte zu verwenden. Für einige Antibiotika (beispielsweise Penicilline) bieten sich aufgrund der Ähnlichkeit bezüglich genereller Empfindlichkeit, Lokalisation und Krankheitsbild auch die Werte für Streptokokken an. Da auch Streptokokken als hoch empfindlich gegenüber Penicillin gelten (Ruoff *et al.*, 1999), ist deren Grenzwert für Resistenz (sensibel $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$) sehr niedrig angesetzt, so dass das Risiko, Arcanobakterien als falsch sensibel einzustufen, relativ gering ist. Aussagen dieser Art dürfen jedoch in jedem Fall nur als Vorschlag angesehen und müssen vorsichtig bewertet werden, insbesondere, da es sich meist um aus der Humanmedizin übernommene Werte handelt. In Frage kommen für eine qualitative Beurteilung der Empfindlichkeit von *A. pyogenes*-Isolaten nach CLSI M31-S1 (2004) prinzipiell Werte für Amoxicillin/Clavulansäure (sensibel $\leq 8/4 \mu\text{g/ml}$; für andere Bakterien als Staphylokokken, Humanwert), Cephalothin (sensibel $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, Humanwert), Cephazolin (sensibel $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, Humanwert) und, bei Anwendung von für Streptokokken etablierten Grenzwerten, Ampicillin (sensibel $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$, Humanwert) und Penicillin G (sensibel $\leq 0,12 \mu\text{g/ml}$, Humanwert). Bei Anwendung dieser Werte würden alle Isolate als "sensibel" beurteilt werden. Für die Cephalosporine Ceftiofur, Cefquinom und Cefaperazon existieren momentan keine geeigneten Grenzwerte. Hier kann lediglich angegeben werden, dass die untersuchten Arcanobakterium-Populationen MHK-Werte zwischen $\leq 0,03 \mu\text{g/ml}$ und $0,5 \mu\text{g/ml}$ aufwiesen, die Verteilung sich in der Regel als "Normalverteilung" darstellte und es sich daher wahrscheinlich um die "sensible Normalpopulation" mit entsprechend höheren MHK-Werten als bei Penicillinen handelt.

Als Alternative zu β -Lactam-Antibiotika werden, zum Beispiel für einen Einsatz im Rahmen der häufig anzutreffenden Mischinfektionen oder bei Arzneimittelunverträglichkeit, **Makrolidantibiotika** (CLSI, 2002) oder Tetracycline (Quinn, 1994, siehe unten; CLSI, 2002)

empfohlen. Gegenüber Makrolidantibiotika resistente Stämme können, je nach zugrunde liegendem Resistenzmechanismus bzw. -gen, bei einigen Bakterien Kreuzresistenzen gegenüber **Lincosamiden** aufweisen (Kroker *et al.*, 1996; Werckenthin *et al.*, 2005). Von makrolidresistenten Arcanobakterien wird in der Literatur schon seit längerem berichtet, die angegebenen Resistenzraten und MHK-Werte weichen jedoch oft deutlich voneinander ab (Guérin-Faublée, 1993 a; Yoshimura *et al.*, 2000; Trinh *et al.*, 2002; Martel *et al.*, 2003).

Von den in der vorliegenden Arbeit mittels Einpunktbestimmung (Wachstum in Gegenwart von 0,5 µg/ml Erythromycin) untersuchten 55 Isolaten waren sechs Stämme als positiv im Sinne einer Resistenz zu bewerten, davon vier von 14 Stämmen porcinen Ursprungs. Von den 62 Isolaten, von denen MHK-Werte gegenüber Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin, Tulathromycin und Clindamycin ermittelt wurden, wiesen fünf Isolate vom Rind (N = 54, entsprechend 9,3 %), jedoch keiner der Stämme vom Schwein, erhöhte MHK-Werte von ≥ 64 bis ≥ 256 µg/ml sowohl gegenüber den Makroliden als auch gegenüber dem Lincosamid Clindamycin auf. Das unterschiedliche Vorkommen von erythromycinresistenten Stämmen bei Isolaten von Schweinen in den beiden untersuchten Kollektiven könnte auf eine nicht bekannte vorhergehende Makrolid-Antibiose zurückzuführen sein, kann aber auch durch die niedrigen Isolatzahlen bedingt sein. Anwendbare Grenzwerte für die Beurteilung von MHK-Werten gegenüber Makroliden und Lincosamiden liegen für Arcanobakterien nicht vor. Nach den ermittelten Daten liegen die MHK-Werte der sensiblen Population bei maximal 0,25 µg/ml.

Endres berichtete in ihrer Dissertationsschrift von 1983 über MHK_{50} -Werte für Erythromycin von 64 µg/ml (Isolate vom Rind aus Süddeutschland). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten bovinen Stämme lagen dagegen mit ihrer MHK_{50} (Erythromycin) bei $\leq 0,015$ und damit weit im sensiblen Bereich. Neben nicht vergleichbaren Isolatzahlen (N = 10 bei Endres, 1983) könnte für diesen Unterschied auch eine tatsächliche Änderung im Vorkommen makrolidresistenter Isolate ursächlich sein. Ein Rückgang der Makrolidresistenz von Arcanobakterien könnte beispielsweise auf das Verbot des als Wachstumsförderer eingesetzten Makrolidantibiotikums Tylosin in den 1990er Jahren (Perreten, 2003) zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang ist die Studie von Nagaraja *et al.* (1999) von Interesse, die die Makrolidresistenz von *A. pyogenes*-Isolaten von Kühen, die tylosinhaltiges Futter bekamen, mit Stämmen verglichen, die von Kühen ohne Tylosinfütterung stammten. Die Autoren konnten in dieser Arbeit keinerlei Unterschiede hinsichtlich des Resistenzmusters der beiden Populationen feststellen, was einen langfristigen Einfluss auf Arcanobakterien-Populationen aber nicht ausschließt. In den USA wird Tylosin zur

Prophylaxe und Therapie von Leberabszessen bei Mastrindern und nach wie vor auch als Leistungsförderer in hohem Maße eingesetzt (Jost *et al.*, 2003). Jost *et al.* (2003) berichteten in diesem Zusammenhang von einer hohen Tylosinresistenzrate bei *A. pyogenes*, der durch sein häufiges Vorkommen bei Leberabszessen (Nagaraja *et al.*, 1999) einem starken Selektionsdruck ausgesetzt ist. In der ebenfalls in den USA verfassten Studie von Trinh *et al.* (2002) wird von einem Anteil von 22,2 % resistenter Isolate beim Rind und 35,3 % resistenter Stämme vom Schwein berichtet. Um aussagekräftige Daten zu deutschen *A. pyogenes*-Populationen zu erhalten, wäre die Untersuchung größerer Isolatzahlen wünschenswert. Aufgrund des geringeren Einsatzes von Makroliden und Lincosamiden erscheinen die ermittelten Raten von unter 10 % Isolaten mit deutlich erhöhten MHK-Werten (und damit vermutlich mit Resistenzdeterminanten) aber durchaus realistisch.

Bei Endometritiden beim Rind ausgelöst durch *A. pyogenes* wird auch die Anwendung des **Aminoglykosids** Gentamicin empfohlen (Lämmler und Hartwigk, 1995). Das CLSI (2004) gibt von den untersuchten Aminoglykosiden/Aminocyclitolen lediglich für Gentamicin Grenzwerte an (sensibel $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, Humanwert). Alle in der vorliegenden Studie untersuchten Isolate sind nach diesem Wert als empfindlich einzustufen (MHK zwischen 0,5 und $2 \mu\text{g/ml}$). Für Neomycin und Spectinomycin wurden in dieser Studie MHK-Werte von 0,25 bis $4 \mu\text{g/ml}$ festgestellt, eine qualitative Beurteilung wurde auf Grund der fehlenden Grenzwerte nicht vorgenommen. In der Literatur gelten Arcanobakterien als weitgehend sensibel gegenüber Aminoglykosiden bzw. Aminocyclitolen (Guérin-Faublée, 1993 a; Fernández *et al.*, 2001), lediglich von Buchholz (1985) und Yoshimura (2000) berichteten vereinzelt von resistenten Isolaten.

Bei *A. pyogenes*-Infektionen nur selten eingesetzt und daher von geringerer Bedeutung sind Wirkstoffe aus den Gruppen **Fluorchinolone** und **Phenicol**. Alle in der vorliegenden Arbeit gegenüber diesen Wirkstoffen untersuchten Isolate (N = 62) wiesen niedrige MHK-Werte auf, die sich entsprechend einer Normalverteilung darstellten und als sensible Populationen angesehen werden können (s. Tab. 4.15 bis 4.17, S. 112 ff.).

Das Fluorchinolon Enrofloxacin wurde als erster Wirkstoff der Gruppe Anfang der 1990er Jahre in der Kleintiermedizin in Deutschland zugelassen und findet beim Geflügel und bei der *E. coli*-Mastitis des Rindes Anwendung. Ein für Arcanobakterien geeigneter Grenzwert existiert bislang nicht. Der im CLSI-Dokument M31-S1 (2004) angegebene Wert für "sonstige Bakterien" ist auf die Tierart Hund ausgerichtet. Der ermittelte MHK-Bereich bei den untersuchten Isolaten erstreckt sich bei allen Indikationen über nur wenige Titerstufen, die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte lagen in jedem Fall bei $1 \mu\text{g/ml}$. Verglichen mit früheren

Studien war ein Anstieg der MHK nicht zu beobachten. Bereits 1990 wurde eine analoge MHK-Verteilung in einer Studie in Kanada gemessen (Prescott und Yielding, 1990). Auch in Japan lag der höchste ermittelte MHK-Wert bei 0,78 µg/ml (Yoshimura *et al.*, 2000). Sheldon *et al.* (2004) untersuchten die MHK von 22 bovinen Stämmen, wobei ebenfalls alle Isolate eine MHK von 1 µg/ml aufwiesen. Die gleich bleibende Höhe der MHK-Werte unterstützt die Vermutung, dass es sich bei 1 µg/ml trotz des im Gegensatz zu anderen Bakterien hohen Wertes um den "Normalwert" sensibler Arcanobakterien handelt.

Die MHK von Chloramphenicol lag bei allen Isolaten zwischen 0,5 und 2 µg/ml und damit im sensiblen Bereich (sensibel \leq 8 µg/ml, Humanwert für alle Bakterien außer Streptokokken). Für Florfenicol macht das CLSI keine für *A. pyogenes* anzuwendenden Grenzwertangaben. Alle untersuchten Isolate wiesen eine MHK zwischen 0,5 und 1 µg/ml auf. Im selben Bereich bewegen sich auch alle in der Literatur angegebenen Werte (Endres, 1983; Guérin-Faublée, 1993 a; Yoshimura *et al.*, 2000). Leicht höhere Werte mit einer bei allen untersuchten Stämmen gemessenen MHK von 4 µg/ml finden sich in der Studie von Fernández *et al.* (2001), in der jedoch nur fünf Isolate untersucht wurden und als Nährmedium in der Bouillonmikrodilution CaMHB supplementiert mit 1%igem Tween 80 verwendet wurde.

Für die Untersuchung der Empfindlichkeit von *A. pyogenes* gegenüber **Sulfonamiden** und **potenzierten Sulfonamiden** wurde schon darauf eingegangen, dass nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Verwendung von Nährmedien, die entweder keinerlei Thymidin oder ausreichend Thymidin-Phosphorylase (natürlicherweise vorkommend in lysiertem Pferdeblut) enthalten, notwendig ist. Aufgrund der so ermittelten MHK-Werte konnten nach den CLSI-Grenzwerten für "andere Bakterien als Streptokokken" alle Isolate als empfindlich gegenüber der Sulfonamid-Trimethoprim-Kombination beurteilt werden. Endres (1983) berichtete dagegen von einer kompletten Resistenz aller untersuchten Isolate gegenüber diesen Wirkstoffen. Da in ihrer Dissertationsschrift jedoch keine Angaben über Supplementierungen des Nährbodens gemacht werden, könnte der Wirkungsmechanismus der Wirkstoffe durch im Agar befindliches Thymidin umgangen worden sein, was zu falsch-hohen MHK-Werten führen würde. Von Buchholz (1985) beschreibt ebenfalls eine 100%ige Sulfonamidresistenz der von ihm untersuchten Stämme. Auch hier ist der Einfluss der angewandten Methodik auf die Resistenzraten nicht sicher zu beurteilen. In der vorliegenden Arbeit konnte bei Isolaten vom Schwein keinerlei Empfindlichkeitsverlust ausgemacht werden. Bovine Stämme aus dem Urogenitaltrakt waren zu 32 %, aus Fällen von Omphalitiden oder Septikämie zu 24 % resistent gegenüber Sulfamethoxazol, wenn die Grenzwerte der CLSI-Norm (sensibel \leq 256 µg/ml, Humanwert) zugrunde gelegt werden. Unabhängig vom *in-vitro* ermittelten MHK-

Wert ist ein therapeutischer Einsatz von sulfonamidhaltigen Antibiotika jedoch bei Erregern purulenter Entzündungen, die zur Aufnahme von Thymidin in der Lage sind, von fraglicher Relevanz, weil Eiter generell viel Thymidin enthält (Ferone *et al.*, 1975), und somit ein Eingriff in den Folsäurestoffwechsel nicht zu Beeinträchtigungen der Erreger führt.

Wie oben erwähnt, werden auch **Tetracycline** als Alternativen zur Bekämpfung von *A. pyogenes*-Infektionen angegeben (Quinn *et al.*, 1994; Morck *et al.*, 1998; CLSI, 2002). Tetracycline waren darüber hinaus in den vorliegenden Untersuchungen die einzigen Wirkstoffe, bei denen eine resistente und eine sensible Population unterschieden werden konnte, und zugleich die resistente Population größere Isolatanzahlen umfasste. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der MHK-Verteilung zumindest tendenzielle Unterschiede zwischen den Populationen unterschiedlicher Wirtstiere gibt. Aus diesen Gründen wurden die süddeutschen Isolate bezüglich Tetracyclinresistenz-Phänotyp und -Genotyp detaillierter untersucht.

Bewertet man alle Isolate unabhängig von ihrer Herkunft, liegen die MHK-Werte im Bereich von 0,12 bis 64 µg/ml, wobei MHK-Werte von 1 und 2 µg/ml nicht vorkamen (s. Abb. 4.17, S. 109 und Tab. 8.6., S. 185 f.). Bei den deutschlandweit gesammelten Isolaten lag der MHK₅₀-Wert der Stämme der Indikation Nabel/Septikämie beim Rind bei 4 µg/ml, der der Stämme der Indikation Urogenitaltrakt/Rind bei 8 µg/ml und der Wert der Indikation Bewegungsapparat/ZNS/Schwein ebenfalls bei 8 µg/ml. Die entsprechenden MHK₉₀-Werte lagen bei den beiden das Rind betreffenden Indikationen bei 32 µg/ml und bei 16 µg/ml beim Schwein. Die MHK₅₀ der süddeutschen bovinen Stämme ergab 16 µg/ml, die der porcinen 8 µg/ml, die MHK₉₀ der Isolate vom Rind lag bei 64 µg/ml und die der vom Schwein bei 8 µg/ml. Eine qualitative Bewertung dieser Daten anhand der CLSI-Grenzwerte (für andere als Streptokokken, Humanwert, sensibel ≤ 4 µg/ml, intermediär = 8 µg/ml) ist nicht sinnvoll, da die Grenzen hier innerhalb der als resistent anzunehmenden Population verlaufen. Legt man einen mikrobiologischen Grenzwert von ≤ 2 µg/ml der Beurteilung zugrunde, liegt die Resistenzrate aller in dieser Arbeit untersuchten Wildstämme mit Ausnahme der Stämme aus Omphalitis/Septikämie-Fällen vom Rind über 60 %. Interessanterweise wurde ein nahezu identischer Wert für die Unterscheidung von sensiblen und resistenten *A. pyogenes*-Isolaten (resistente Isolate alles ab > 4 µg/ml) auch schon von Trinh *et al.* (2002) angegeben. In dieser Studie wurden mittels dieses Wertes 41,7 % resistente Isolate (N = 48) beobachtet.

Eine Ursache für die abweichende MHK-Verteilung bei den beiden Wirtsspezies könnte die unterschiedlich weite Verbreitung von bei *A. pyogenes* vorkommenden Resistenzgenen aufgrund eines differierenden Selektionsdruckes sein. Eine andere Möglichkeit wäre das

Vorkommen unterschiedlicher Resistenzgene (mit entsprechend unterschiedlichen vermittelten MHK-Werten) in den verschiedenen, an die Wirtstierarten Rind bzw. Schwein adaptierten Erregerpopulationen. Da der Anteil als resistent bewerteter Isolate sich bei den verschiedenen Indikationen mit einer Ausnahme nicht unterscheidet, sondern lediglich die Höhe der ausgeprägten Resistenz variierte, scheint der Selektionsdruck auf Arcanobakterien von Rindern und Schweinen ähnlich zu sein. Die niedrigere Resistenzrate von unter 50 % bei Arcanobakterien der Indikation Omphalitis/Septikämie des Rindes könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den erkrankten Tieren um Kälber handelt, deren Schleimhautflora bislang weniger mit antibiotischen Wirkstoffen in Kontakt gekommen ist, als dies bei adulten Kühen, die beispielsweise aufgrund von Endometritiden schon früher behandelt wurden, der Fall ist.

Tierartliche Unterschiede wurden auch in anderen Studien beobachtet. Chirino-Trejo *et al.* (2003) untersuchten die Resistenzrate von Arcanobakterien vom Weißwedelhirsch gegenüber Tetracyclin im E-Test und erhielten ein MHK-Spektrum von 0,06-0,19 µg/ml. Für diese sehr niedrigen MHK-Werte kann neben der Methodik ebenfalls der fehlende Selektionsdruck durch Antibiotikagabe beim Wildtier verantwortlich sein. Im Vergleich der eigenen Untersuchung zu den international ermittelten Resistenzraten von Tetracyclin bzw. Doxy-Oxytetra-, und Chlortetracyclin zeigt sich ein sehr unterschiedliches Bild. Während Guérin-Faubleé (1993 b) von Isolaten von Wiederkäuern sowie zwei deutsche Studien von Arcanobakterien des Rindes (Endres, 1983; von Buchholz, 1985) über ähnliche Werte berichten, liegen sie bei untersuchten Isolaten aus Finnland (Jousimies-Somer *et al.*, 1996) mit einem MHK-Spektrum von 0,125-1 µg/ml weit darunter. In allen drei Studien wurde die MHK-Ermittlung mittels Agardilution durchgeführt, wobei Jousimies-Somer *et al.* (1996) als Testmedium einen Agar mit 7 % lysiertem Schafblut verwendeten und Guérin-Faubleé (1993 b) den Agar mit 5 % IPb supplementierte, wohingegen Endres (1983) und von Buchholz (1985) keine Angaben über eventuell benutzte Zusätze machten. Unterschiede in den MHK-Werten können daher durch eine generell niedrigere Resistenzrate der Bakterienpopulation in Finnland bedingt sein, ein Einfluss der unterschiedlichen Methodik ist jedoch nicht ganz auszuschließen.

Yoshimura *et al.* (2000) ermittelten die MHK von Arcanobakterien über Agardilution und supplementierten den Nährboden mit 5 % IPb, wobei sie Isolate von Schwein und Rind getrennt voneinander untersuchten. Eine im Vergleich zu bovinen Stämmen niedrigere MHK-Verteilung der porcinen Stämme findet sich bei dieser Untersuchung nicht. Isolate vom Schwein hatten einen höheren Anteil resistenter Isolate gegenüber Oxytetracyclin. Yoshimura

et al. (2000) wählten jedoch eine unübliche antibiotische Verdünnungsreihe, so dass ein Vergleich mit diesen Werten allgemein schwer fällt. Gleiches gilt für die Studie von Narayanan *et al.* (1998). Trinh *et al.* (2002) untersuchten die MHK-Werte von Arcanobakterien mehrerer Tierarten, die Ergebnisse ihrer Untersuchungen lagen mit einer MHK_{90} von 16 µg/ml unterhalb der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate von Rindern, aber im Bereich der deutschlandweit gesammelten Schweineisolate. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen waren bei Trinh *et al.* (2002) resistente Isolate beim Schwein häufiger vorzufinden als beim Rind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, soweit aufgrund der unterschiedlichen Methodik zu bewerten, im Vergleich der vorliegenden Arbeit zu den deutschen Studien von 1983 und 1985 keine Resistenzzunahme von Arcanobakterien gegenüber Tetracyclin erfolgte, regionale Unterschiede im Vergleich zu Finnland (Jousimies-Somer *et al.*, 1996), Japan (Yoshimura *et al.*, 2000) und den USA (Trinh *et al.*, 2002) jedoch vorhanden zu sein scheinen.

Auf alle untersuchten Wirkstoffe bezogen konnte bei den mittels MHK-Bestimmung untersuchten, deutschlandweit isolierten Arcanobakterien (N = 63) hinsichtlich der MHK-Verteilung kein Unterschied zwischen den einzelnen Indikationen (Rind Urogenitaltrakt, Rind Omphalitis/Septikämie, Schwein Bewegungsapparat/ZNS) festgestellt werden. Obwohl die in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Schaal, 1986) festgestellte prinzipielle Penicillin-Empfindlichkeit von Arcanobakterien *in-vitro* bestätigt werden konnte, sind bei einem Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen zur Therapie von *A. pyogenes*-Infektionen weitere, mit der Pathogenese zusammenhängende Faktoren zu beachten. Schon seit langem ist bekannt, dass bei bereits vorhandenen degenerativen Gewebsveränderungen im Rahmen einer *A. pyogenes*-Infektion eine antibiotische Therapie ohne Erfolg ist (Lämmler und Hartwig, 1995). Wie Olson *et al.* (2002) berichteten, sind Arcanobakterien darüber hinaus zur Biofilmbildung befähigt und in dieser Formation hoch resistent gegenüber allen von der Forschungsgruppe getesteten Vertretern der Wirkstoffgruppen der Makrolide, Tetracycline, Aminoglykoside, Fluorchinolone, Sulfonamide und β -Lactam-Antibiotika. Mittels der in der vorliegenden Arbeit angewandten Bouillonmikrodilution werden jedoch nur als Einzelzellen vorliegende "planktonartig wachsende" Organismen getestet, deren Ergebnisse im Fall einer Biofilmbildung am Infektionsort nach Olson *et al.* (2002) selbst für Penicilline nicht auf die *In-vivo*-Situation übertragen werden können. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die *In-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung aller Erreger stets nur Hinweise für den Ausschluss bestimmter Wirkstoffe geben kann. Die tatsächliche Wirksamkeit eines *in-vitro* als wirksam ermittelten Wirkstoffes hängt hingegen von diversen weiteren, tier- und

infektionsspezifischen Faktoren ab und kann im Labor nicht ermittelt werden. Trotz dieser Einschränkungen ist eine Empfindlichkeitsbestimmung von *A. pyogenes* nach den vorliegenden Ergebnissen immer zu empfehlen, wenn der Einsatz von Makroliden und Tetracyclinen sowie gegebenenfalls auch anderen Wirkstoffen außer Penicillinen im Rahmen von *A. pyogenes*-Mischinfektionen oder bei Penicillinunverträglichkeit erwogen wird, da jeder fehlgeschlagene antibiotische Therapieversuch das Risiko einer erneuten Selektion resistenter Bakterien mit sich bringt.

5.3 Genetischer Hintergrund der Tetracyclinresistenz von *A. pyogenes*

Da sich bei den phänotypischen Untersuchungen Hinweise auf das Vorhandensein von genetisch unterschiedlichen *A. pyogenes*-Populationen bei den Tierarten Rind und Schwein ergaben und darüber hinaus keine Untersuchungen zu Tetracyclinresistenzgenen bei europäischen Arcanobakterien vorliegen, wurde das Vorkommen entsprechender Gene in 36 süddeutschen Isolaten untersucht. Nach Trinh *et al.* (2002) korreliert ein MHK-Wert von über 4 µg/ml generell mit der Anwesenheit einer *tet*-Determinanten. Da sich dieser Wert wie oben beschrieben auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolaten als "Grenze" zwischen sensibler und vermutlich resistenter Population darstellte, wurden alle Isolate mit einer $MHK \geq 8 \mu\text{g/ml}$ auf das Vorhandensein von Tetracyclinresistenz (*tet*)-Genen untersucht. Von den 35 bisher beschriebenen Genen (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>) wurden für eine Untersuchung diejenigen ausgewählt, die schon früher bei *A. pyogenes* selbst, bei verwandten Bakterien oder bei im gleichen Milieu vorkommenden Genera beschrieben wurden.

Billington *et al.* (2002 b) stellten fest, dass das Gen *tet(W)*, das für ein ribosomales Schutzprotein kodiert, bei Arcanobakterien, die in den USA isoliert wurden, weit verbreitet ist. In dieser Studie konnte es in allen der 20 untersuchten tetracyclinresistenten Isolate von Rindern nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde *tet(W)* als das am häufigsten vorkommende *tet*-Gen identifiziert. Es konnte bei 66,7 % der Isolate (N = 24) mittels verschiedener PCR-Assays detektiert werden. Alle Isolate, bei denen *tet(W)* nachgewiesen wurde, waren bovinen Ursprungs. Der Genbereich eines der Isolate wurde sequenziert und wies eine identische Basenfolge zu dem von Billington *et al.* (2002 b) veröffentlichten Gen auf. Auf Grund des fehlenden Nachweises von Plasmiden für die Isolate, bei denen *tet(W)* nachgewiesen wurde, wird eine chromosomale Lokalisation des Gens angenommen. Auch Billington *et al.* (2002 b) war es nicht möglich, Plasmide zu

identifizieren, die mit *tet(W)* in *A. pyogenes* hätten assoziiert werden können. Inwieweit das Gen sich bei *A. pyogenes* auf einem Transposon befindet, wie dies für *tet(W)*-Gene anderer Bakterien kürzlich beschrieben wurde (Melville *et al.*, 2004), ist nicht bekannt. Entsprechende Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Der MHK-Wert der *tet(W)*-positiven Isolate lag zwischen 8 und 64 µg/ml, die Mehrheit dieser Stämme hatte eine MHK von 16 µg/ml. Daher ist davon auszugehen, dass *tet(W)* in *A. pyogenes* im Allgemeinen eine Tetracyclinresistenz von 16 µg/ml ± 1 Titerstufe zur Folge hat. Billington *et al.* (2002 b) bezifferten diesen Wert als 8 µg/ml, untersuchten jedoch nur die MHK eines einzigen *A. pyogenes*-Stammes. Mit *tet(W)* rekombinante *E. coli*-Stämme wiesen dagegen eine MHK von 16 bzw. 32 µg/ml auf (Billington *et al.*, 2002 b).

Neben *tet(W)* wurde in einer früheren Studie bei *A. pyogenes* das für ein Effluxprotein bzw. dessen regulatorisches Protein kodierende Gen *tet(33)*, bestehend aus *tetA(33)* (Strukturprotein) und *tetR(33)* (Regulatorprotein), nachgewiesen (Jost *et al.*, 2003). Über die Verbreitung dieses Genes in *A. pyogenes*-Populationen ist nichts bekannt (Aarestrup, 2006).

TetA(33) konnte auch in der vorliegenden Arbeit, und zwar bei 22,2 % (N = 8) der resistenten Isolate, identifiziert werden. Es wurde dabei immer in Kombination mit *tet(W)* nachgewiesen. Ein internes, einen Großteil des Gens umfassendes Fragment eines der Isolate wurde sequenziert und wies Sequenzidentität mit der von Jost *et al.* (2003) veröffentlichten Sequenz auf. Das Vorkommen der regulatorischen Einheit *tetR(33)* wurde nicht untersucht.

Tauch *et al.* (2001) beschrieben *tet(33)* erstmals bei *Corynebacterium glutamicum*, wo es auf einem Plasmid von 27,8 kb (pTET3) lokalisiert ist. Auch Jost *et al.* (2003) entdeckten *tet(33)* bei *A. pyogenes* auf einem Plasmid. Dieses 9,3 kb große Plasmid, pAP2, beherbergte neben *tet(33)* auch ein Makrolidresistenzgen. In der vorliegenden Arbeit konnte in keinem Fall der *tetA(33)*-positiven Isolate ein Plasmid identifiziert werden, auch lag bei keinem dieser Isolate eine gleichzeitige Makrolidresistenz vor. Das Gen scheint demnach ebenfalls chromosomal lokalisiert zu sein. Auf Grund dieser unterschiedlichen Lokalisationen ist es vorstellbar, dass *tet(33)* Teil eines mobilen genetischen Elementes ist.

Da *tetA(33)* nur in Anwesenheit von *tet(W)* isoliert wurde, konnte die MHK, die *tet(33)* alleine vermittelt, nicht bestimmt werden. Der MHK-Wert, der in Anwesenheit beider Gene gemessen wurde, lag bei sieben der acht Isolate bei 32 µg/ml, ein Stamm hatte eine MHK von 64 µg/ml. Jost *et al.* (2003) geben die MHK, die durch *tet(33)* verursacht wird, mit 1 µg/ml an, in Kombination mit *tet(W)* soll ein Wert von 16 µg/ml erreicht werden. Die Verfasser machen jedoch keine Angaben darüber, mit wie vielen Isolaten die MHK-Ermittlung erfolgte.

Da zudem die Inkubation im aeroben Milieu durchgeführt wurde, ist nicht auszuschließen, dass sich die Angaben bei Jost *et al.* (2003) und in der vorliegenden Arbeit entsprechen.

Tet(W) und *tetA(33)* konnten ausschließlich bei Isolaten vom Rind identifiziert werden. Alle Stämme porciner Herkunft sowie drei bovine Stämme besaßen keines dieser beiden Gene. Diese Tatsache untermauert die Hypothese, dass genetisch unterschiedliche *A. pyogenes*-Populationen bei den Wirtstierarten vorliegen könnten. Alle Isolate ohne nachgewiesenes Gen sowie alle Stämme, deren MHK so hoch lag, dass die Anwesenheit eines weiteren Gens zu vermuten war - also alle Isolate, die zwar *tet(W)* besaßen, deren MHK jedoch bei 32 µg/ml oder höher lag und bei denen *tetA(33)* nicht identifiziert werden konnte - wurden auf das Vorhandensein weiterer Gene untersucht. Dabei handelte es sich um 21 Isolate, bei denen das Vorkommen der für ribosomalen Schutz kodierenden Gene *tet(M)*, (O) und (Q), sowie der für Effluxproteine kodierenden Gene *tet(K)*, (L) und (Z) untersucht wurde. *Tet(M)*, (O) und (Q) sind, wie auch *tet(W)* (Melville *et al.*, 2004) mit konjugativen Transposons assoziiert und häufig chromosomal lokalisiert (Martin *et al.*, 1986; Michalova *et al.*, 2004). Dies spielte bei der Auswahl wahrscheinlicher *tet*-Gene insofern eine Rolle, als in der eigenen Studie nur bei einem Isolat ein kleines Plasmid identifiziert werden konnte. Ribosomale Schutzproteine kommen häufig in grampositiven Bakterien vor, am weitesten verbreitet ist *tet(M)* (Chopra und Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004). Unter anderem konnte *tet(M)* auch bei *Fusobacterium necrophorum* isoliert werden (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>), das häufig in Koinfektion mit *A. pyogenes* gefunden wird (Roberts, 1967; Kasari *et al.*, 1988; Roeder *et al.*, 1989; Jost *et al.*, 2004) und daher Resistenzdeterminanten an dieses weitergegeben haben könnte. Zudem ist *tet(M)* auch bei *Mitsuokella multiacidus* beschrieben worden, einem Darmkommensalen beim Schwein, bei dem auch *tet(W)* isoliert werden konnte (Barbosa *et al.*, 1999) und von dem *A. pyogenes* auf Grund seines fakultativ-anaeroben Stoffwechsels (Reddy *et al.*, 1983) mittels horizontalen Gentransfers eine *tet*-Determinante erhalten haben könnte. Gleiches gilt für *tet(Q)*, das ebenfalls bei *M. multiacidus* gefunden wurde (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>). Das Gen *tet(O)* wurde bei *Megasphaera elsdenii*-Stämmen isoliert, die gleichzeitig über *tet(W)* verfügten, z. T. als Mosaik-Gen-Kombination (Stanton und Humphrey, 2003). Das Vorhandensein von *tet(O)* erschien somit ebenfalls wahrscheinlich. In den durchgeführten PCR-Analysen der insgesamt 21 Isolate konnte jedoch keines dieser Gene detektiert werden.

Die für Effluxproteine kodierenden Gene *tet(K)* und (L) sind die am häufigsten bei grampositiven Bakterien vorkommenden Efflux-Gene (Michalova *et al.*, 2004), weshalb sie in die Untersuchungen einbezogen wurden. Das Gen *tet(Z)* wurde wie *tet(33)* auf einem Plasmid

von *Corynebacterium glutamicum* (pAG1) erstmals detektiert (Tauch *et al.*, 2000). Dabei handelte es sich für grampositive Bakterien um die erste Beschreibung eines durch ein Regulatorprotein regulierten Effluxproteins. Bei keinem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate gab es Anhaltspunkte für die Existenz von *tet(K)* oder *tet(L)*.

Ein bovines Isolat (4371-03) erwies sich in der PCR als *tet(Z)*-verdächtig. Bei genauerer Untersuchung des Genbereichs konnte, erstmals für Arcanobakterien, die gesamte regulatorische Einheit der Determinante, *tetR(Z)*, identifiziert werden. Sie wies eine identische Nukleotidsequenz zu dem von Tauch *et al.* (2000) veröffentlichten Gen auf. Das Strukturgen *tetA(Z)* dagegen konnte mittels PCR nur partiell identifiziert werden. Ein Bereich von 240 bp am Ende des [gegenläufig zu *tetR(Z)* abgelesenen] Gens ließ sich mit unterschiedlichen PCR-Versuchen nicht nachweisen. Bei der Sequenzierung ergab sich außerdem, dass eine zwischen den Genen *tetA(Z)* und *tetR(Z)* gelegene Duplikation von 22 bp, die in der Sequenz des Plasmides pAG1 angegeben ist, im sequenzierten Bereich von *A. pyogenes* 4371-03 fehlt. Weiterhin wies das sequenzierte *tetA(Z)*-Fragment im Vergleich zu der bei *Corynebacterium glutamicum* veröffentlichten Sequenz 17 bp Unterschied in der Nukleotidsequenz auf, die zum Austausch von acht Aminosäuren führen würden, wenn das Gen abgelesen werden würde. Die Funktionsfähigkeit des Gens im Bakterium kann aufgrund des fehlenden terminalen Bereiches nicht bewiesen werden, obwohl das Isolat eine MHK von 8 µg/ml aufwies. Zurückzuführen sein könnte das fehlende Ende von *tetA(Z)* zum einen auf Punktmutationen oder Rekombinationen im Bereich der PCR-Primer, die ein „Annealing“ und damit eine Amplifikation des entsprechenden Bereiches verhindern. Zum anderen könnte es sich auch um eine Rekombination beispielsweise mit einem anderen *tet*-Gen handeln, was, wie bei *tet(O)/tet(W)* bereits beschrieben (Stanton und Humphrey, 2003), zur Bildung eines Mosaikgens führen würde. Ebenfalls vorstellbar ist, dass im Zuge des horizontalen Gentransfers von *Corynebacterium glutamicum* auf *A. pyogenes* und des Einbaus des Gens in das Genom eine Rekombination mit anderen Genen stattgefunden hat und das Ende von *tetA(Z)* dabei verloren ging. Ähnliche, wenn auch kürzere Sequenzverluste unter Funktionserhalts des Gens sind bereits von *tet(H)* und *tet(A)* bekannt (Kehrenberg und Schwarz, 2000; Ojo *et al.*, 2003), weshalb es in diesem Fall nicht ausgeschlossen wäre, dass der ermittelte MHK-Wert von 4371-03 auf das Genfragment von *tet(Z)* zurückzuführen sein könnte. Das in demselben Bakterienisolat gefundene Plasmid pCWEA4371 ist mit ca. 2,5 kb von zu geringer Größe, als dass es neben den Replikationsgenen weitere Gene beherbergen könnte. Die Annahme, dass es sich bei pCWEA4371 um ein kryptisches (funktionsloses) Plasmid (Frost *et al.*, 2005) handelt, erscheint wahrscheinlich.

Wie bereits erläutert, ergaben sich bei der MHK-Ermittlung für Tetracyclin tierartspezifische Unterschiede, die in der Verteilung der *tet*-Determinanten reflektiert wurden. Bei keinem der porcinen Isolate konnte eine die vorhandene Tetracyclinresistenz erklärende Determinante entdeckt werden, dagegen verfügten alle Rinder-Stämme mit Ausnahme von drei Isolaten über *tet(W)*. Arcanobakterien vom Schwein scheinen daher entweder (nicht untersuchte) Resistenzgene von weiter entfernt verwandten bzw. in anderen Milieus vorkommenden Bakterien zu erhalten als bovine Stämme, oder sie tragen Gene, die bisher nicht bekannt sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit einige genetische Hintergründe der Tetracyclinresistenz bei *A. pyogenes* geklärt werden konnten. Die erstmals für *A. pyogenes*-Isolate nachgewiesene *tet(Z)*-Determinante konnte teilweise isoliert werden, die Funktionsfähigkeit des *tet(Z)*-Fragments ist jedoch aufgrund des fehlenden terminalen Bereiches und der beschriebenen Sequenzunterschiede fraglich. Bei einigen Isolaten, darunter allen Isolaten vom Schwein, konnte keine *tet*-Determinante identifiziert werden. Zudem lässt die Höhe der MHK von einigen *tet(W)* bzw. *tetA(33)* positiven Stämmen das Vorhandensein weiterer Gene vermuten. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind aus mehreren Gründen von Interesse. Zum einen sind tierartliche Unterschiede hinsichtlich für Resistenzgene empfänglicher Populationen auch bei anderen Genera, beispielsweise Staphylokokken, beschrieben, wobei die Erkennung der Ursachen dieser Unterschiede für eine Einschätzung der Resistenzentwicklung einer Bakterienpopulation hilfreich sein könnte. Zum anderen kann *A. pyogenes* auf Grund seiner physiologischen Eigenschaften sowohl mit aeroben als auch mit anaeroben Bakterien in Kontakt treten, als Teil der endogenen Bakterienflora ein Reservoir für Resistenzgene darstellen oder als Vektor eine Brückenfunktion für den Transfer von Resistenzgenen zwischen verschiedenen Bakterienmilieus ausüben und somit eine wichtige Funktion bei der Ausbreitung resistenter Bakterien inne haben.

6. Zusammenfassung

Stämme der Spezies *Arcanobacterium (A.) pyogenes* gelten allgemein als empfindlich gegenüber Penicillinen. Hauptsächlich aus diesem Grund gibt es bisher keine etablierte Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung von *A. pyogenes*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für *A. pyogenes* eine Methode zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Bouillonmikrodilution erarbeitet, die sich an der Vorgehensweise des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA)-Dokumentes M31-A2 orientiert. Mit Hilfe der erarbeiteten Methode wurden die MHK-Werte zweier Bakterienkollektive mit insgesamt 115 Bakterienstämmen [53 süddeutsche Isolate sowie 62 deutschlandweit im Rahmen eines Monitoringprogramms (Bft-GermVet) gesammelte Stämme] bestimmt. Zusätzlich wurde die genetische Grundlage der dabei häufig zu beobachtenden Tetracyclinresistenz untersucht.

Bei Anwendung der vom CLSI-Dokument empfohlenen Verdünnung der Bakteriensuspension im Medium im Verhältnis 1:200 wurde die Inokulumsdichte von *A. pyogenes* im Vergleich zum vorgeschriebenen Dichtebereich etwa um das Dreifache überschritten. Daher wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:667 vorgenommen, wodurch valide Inokulumsdichten erreicht wurden. In der vom CLSI-Dokument empfohlenen kationenadjustierten Müller-Hinton-Bouillon (CaMHB) konnte ohne weitere Zusätze kein ausreichendes Bakterienwachstum erreicht werden, unter Zusatz von 2 % fetalem Kälberserum (FKS; aufgrund des Vorhandenseins von Thymidin nur für die Testung nicht-sulfonamidhaltiger Antibiotika verwendbar) oder 2 % lysiertem Pferdeblut konnte die MHK nach 24 Stunden gut abgelesen werden. Aerob (von der CLSI-Norm empfohlen) und unter Zusatz von 3 Vol% CO₂ bebrütete Mikrotiterplatten wiesen nach 24 Stunden keine relevanten Unterschiede in der MHK der untersuchten Wirkstoffe auf. Aufgrund der besseren Ablesbarkeit wurde der Inkubation unter Zusatz von CO₂ der Vorzug gegeben.

Die aus dem süddeutschen Raum stammenden *A. pyogenes*-Stämme wurden hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber Tetracyclin, Penicillin G und Erythromycin untersucht. Im Rahmen des Bft-GermVet-Projekts wurden die Isolate auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 24 verschiedenen Wirkstoffen geprüft. Eine qualitative Bewertung als „resistent“ oder „sensibel“ konnte anhand der im Dokument M31-A2 vorhandenen Grenzwerte nur für wenige Wirkstoffe (Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalothin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Sulfamethoxazol; Ampicillin und Penicillin unter Vorbehalt) vorgenommen werden. Gegenüber den getesteten β -Lactam-Antibiotika, Aminoglykosiden, Fluorchinolonen und Phenicolen wurden generell niedrige MHK-Werte beobachtet, die - so-

weit Grenzwerte vorhanden waren - im sensiblen Bereich lagen. Bei der Testung von Sulfonamiden und potenzierten Sulfonamiden kam es zu großen Unterschieden zu früheren Studien, was jedoch eher auf methodische Unterschiede zurückzuführen ist als auf Änderungen der Resistenzraten. Gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim waren alle Stämme empfindlich, gegenüber Sulfamethoxazol waren die porcinen Isolate ebenfalls empfindlich, die bovinen Stämme wiesen je nach Indikation eine Resistenzrate von 24 bis 32 % auf. Insgesamt waren 9,5 % der untersuchten Isolate resistenzverdächtig gegenüber Makrolid-Antibiotika. Diese im Vergleich zur Literatur niedrige Zahl ist entweder durch die unterschiedlichen Isolatzahlen bedingt oder tatsächlicher Ausdruck eines Resistenzrückgangs, der mit dem Verbot von Tylosin als Futtermittelzusatzstoff in den 1990er Jahren assoziiert sein könnte. Bei der Untersuchung von Tetracyclin erwiesen sich unabhängig von der Tierart über 60 % der Isolate als resistenzverdächtig, wobei die MHK_{90} beim Schwein bei 8 $\mu\text{g/ml}$ und beim Rind bei 64 $\mu\text{g/ml}$ lag.

Bei der genetischen Untersuchung von 36 tetracyclinresistenten Isolaten aus Süddeutschland auf das Vorkommen von acht verschiedenen tetracyclinresistenzvermittelnden Genen konnte bei 66,7 % der Isolate das für ein ribosomales Schutzprotein kodierende Resistenzgen *tet(W)* detektiert werden, das in der Literatur als hauptverantwortlich für die Tetracyclinresistenz bei *A. pyogenes* gilt. Neben diesem konnte auch die strukturelle Einheit eines für ein Effluxprotein kodierenden Gens, *tet(33)*, bei 22,2 % der Isolate nachgewiesen werden. Bei keinem Stamm konnte *tet(33)* ohne gleichzeitig vorhandenes *tet(W)* isoliert werden. Die in der Literatur beschriebene Lokalisation von *tet(33)* auf einem Plasmid konnte für die untersuchten Stämme nicht bestätigt werden. Bei allen *tet(W)*- und *tet(33)*-positiven Isolaten handelte es sich um Stämme boviner Herkunft. Der MHK-Wert der *tet(W)*-positiven Isolate lag zwischen 8 und 64 $\mu\text{g/ml}$, die Mehrheit der Stämme hatte eine MHK von 16 $\mu\text{g/ml}$. In Anwesenheit von *tet(33)* lag die MHK bei sieben von acht Isolaten bei 32 $\mu\text{g/ml}$, ein Isolat wies eine MHK von 64 $\mu\text{g/ml}$ auf.

Bei einem Isolat boviner Herkunft (4371-03), bei dem weder *tet(W)* noch *tet(33)* detektiert werden konnte, konnte erstmals für Arcanobakterien die regulatorische Einheit des Gens *tet(Z)*, das bisher nur bei *Corynebacterium glutamicum* beschrieben wurde, identifiziert werden. Das Strukturgen *tetA(Z)*, das ebenfalls für ein Effluxprotein kodiert, konnte nur partiell nachgewiesen werden. Es ist daher nicht bekannt, ob die bei 4371-03 beobachtete MHK von 8 $\mu\text{g/ml}$ auf das identifizierte *tet(Z)* zurückzuführen ist.

Insgesamt blieben elf Isolate einschließlich aller Stämme porciner Herkunft (N = 8) ohne zugeordnete *tet*-Determinante.

Summary

Eva Alešík

Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes*: Evaluation and application of a broth micro-dilution method for susceptibility testing and genotypic characterization of tetracycline resistant strains

Isolates of *Arcanobacterium (A.) pyogenes* are thought to be generally susceptible for penicillin antibiotics. Due to this assumption an established method for susceptibility testing and specific criteria for the classification of isolates as "susceptible" or "resistant" are not available. In this study, the broth micro-dilution method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, U.S.A.) document M31-A2 was adapted for *A. pyogenes*. The adapted method was applied to two different *A. pyogenes* collections, including diagnostic isolates from Southern Germany (N = 53) and isolates collected during a nation-wide German monitoring study ("BfT-GermVet"; N = 62). Minimal inhibitory concentrations (MIC values) were determined and classified according to CLSI document M31-A2, if possible. In addition, the genetic basis of tetracycline resistance was determined for the isolates from Southern Germany, with resistance to this antibiotic being the resistance most often observed.

The CLSI document recommends for broth micro-dilution of fast-growing, non-fastidious organisms cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB). If necessary, supplements may be added. The number of bacteria in the inoculum for microtiter plates is proposed to be $2 - 8 \times 10^5$ CFU/ml, the plates should be incubated under aerobic conditions for 16 – 20 hours.

For *A. pyogenes*, the recommended dilution of 1:200 of the proposed suspension with defined turbidity did yield three times the expected number of bacteria. Therefore, the dilution was changed to 1:667. Concerning the medium for susceptibility testing, CAMHB is not suitable for *A. pyogenes*. Supplements had to be added, and it was shown that 2 % fetal calf serum (FCS) as well as 2 % lysed horse blood (LHB) may be used, with the exception, that CAMHB-2%FCS is not suitable for testing of sulfonamide and sulfonamide/trimethoprim combinations. With both media MIC values could be determined after 24 hours of incubation. As CAMHB-2%LHB is also used for the testing of streptococci, this medium was chosen for the monitoring study. The growth of *A. pyogenes* under aerobic conditions was sufficient for the determination of MIC values, but was much better when adding 3 Vol% CO₂. As different MIC values did not differ substantially, this incubation atmosphere was chosen.

Making use of this method, isolates from Southern Germany were examined for their MIC values for tetracycline and were also checked for penicillin and macrolide resistance. The

monitoring programme isolates were tested for their susceptibility against 24 antimicrobial agents. For a classification as „resistant“ or „susceptible“, breakpoints from CLSI document M31-S1 were used, but were available only for a limited number of agents. In the case of penicillin and ampicillin, streptococcal breakpoints were applied.

MIC values were generally low (and all isolates classified as „susceptible“, if breakpoints were available) for β -lactam-antibiotics, aminoglycosides, fluoroquinolones and phenicols. However, results for sulfonamides and potentiated sulfonamides differed from former studies (resistance rates varied from no resistance for porcine isolates to 24 – 32 % for bovine isolates). It is thought, that the problem of thymidine presence in CAMHB may not have been recognized in some previous studies. Concerning macrolide/lincosamide resistance, 9,5 % of the isolates are thought to be resistant according to their MIC value, although breakpoints are not available. This is lower than previously reported, and may be indebted to the method or to a real decrease in resistance after the ban of tylosin as growth promoter during the 1990s. For tetracycline, resistance rates are thought to be more than 60 % on the basis of MIC values and human breakpoints. There were no differences in resistance rates, but differences in MIC values between porcine and bovine isolates, with MIC₉₀ values of 8 μ g/ml and 64 μ g/ml, respectively.

In addition to phenotypic characterization, 36 tetracycline resistant isolates from Southern Germany were screened for eight tetracycline resistance (*tet*) genes. In 67 %, the gene *tet(W)* coding for a ribosomal protection protein was identified, which is well known from *A. pyogenes*. In 22 % of the *tet(W)*-positive isolates, a second gene, the *tet(33)* structural gene, coding for an efflux protein, was detected. In contrast to the literature, *tetA(33)* was not found to be located on a plasmid, as plasmids were not detected in any of all isolates but one. All strains with *tet(W)* either alone or in combination with *tet(33)* were of bovine origin. None of the eight porcine isolates gave any result with one of the PCR assays. MIC values of *tet(W)*-positive isolates were between 8 and 64 μ g/ml, with the majority at 16 μ g/ml. In the presence of *tet(W)* and *tet(33)*, MIC values were 32 μ g/ml in seven of eight isolates, one strain had a MIC of 64 μ g/ml.

One isolate of bovine origin (4371-03) with a MIC of 8 μ g/ml was tested positive for the regulatory gene *tetR(Z)* and a part of the respective structural gene *tetA(Z)*. The mechanism of this resistance determinant from *Corynebacterium glutamicum* is, as in the case of *tet(33)*, a transmembranal efflux pump. This is the first description of *tet(Z)* in *A. pyogenes*. However, as the structural gene could not be completely amplified and sequenced, it is not known, if the gene is transcribed and the gene product active.

7. Literatur

- Aarestrup, F. M., Bager, F., Jensen, N. E., Madsen, M., Meyling, A. und Wegener, H. C., 1998: Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). APIMS, 106, S.745-770
- Aarestrup, F. M., 1999: Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. Int.J.Antimicrob.Agents, 12, 279-285
- Aarestrup, F. M., 2004: Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: Principles and Limitations. J.Vet.Med.B, 51, 380-388
- Aarestrup, F. M., 2005: Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Bas.Clin.Pharmacol.Toxicol., 96, 271-281
- Aarestrup, F. M., 2006: Other Pathogens. In: Aarestrup, F. M.: Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 249-250, ASM Press, Washington D.C.
- Agersø, Y. und Sandvang, D., 2005: Class 1 Integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. Appl.Environ.Microbiol., 71, 7941-7947
- Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N. und Mackie, R. I., 2001: Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Appl.Environ.Microbiol., 67, 22-32
- Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, 1999: Entschließung der Rates vom 8. Juni 1999 zur Antibiotikaresistenz "Eine Strategie gegen die mikrobiologische Bedrohung". 1999/C 195/01
- Anonymus, 2004: Italian Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (ITAVARAM)-2003. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Rome, Italy
- Arvidson, S., Dornbusch, K., und Ericsson, H., 1981: Interpretation of the agar diffusion method for bacterial susceptibility testing. J.Antimicrob.Chemother., 7, 5-14

- Bager, F., 2000: DANMAP: Monitoring antimicrobial resistance in Denmark. *Int.J.Antimicrob. Agents*, 14, 271-274
- Barbosa, T. M., Scott, K. P. und Flint, H. J., 1999: Evidence for recent intergeneric transfer of a new tetracycline resistance gene, *tet(W)*, isolated from *Butyrivibrio fibrisolvens*, and the occurrence of *tet(O)* in ruminal bacteria. *Environ.Microbiol.*, 1, 53-64
- Barnham, M., 1988: *Actinomyces pyogenes* bacteraemia in a patient with carcinoma of the colon. *J.Infect.*, 17, 231-234
- Baumann, C. D., Davidson, W. R., Roscoe, D. E. und Beheler-Amass, K., 2001: Intracranial abscessation in White-Tailed Deer of North America. *J.Wildl.Dis.*, 37, 661-670
- Billington, S. J., Jost, B. H. und Songer, J. G., 1998: The *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* plasmid pAP1 is a member of the pIJ101/pJV1 family of rolling circle replication plasmids. *J.Bacteriol.*, 180, 3233-3236
- Billington, S. J., Post, K. W. und Jost, B. H., 2002 a: Isolation of *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* from cases of feline otitis externa and canine cystitis. *J.Vet.Diagn.Invest*, 14, 159-162
- Billington, S. J., Songer, J. G. und Jost, B. H., 2002 b: Widespread distribution of a *tetW* determinant among tetracycline-resistant isolates of the animal pathogen *Arcanobacterium pyogenes*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 46, 1281-1287
- Bogaard van den, A. E. und Stobberingh, E. E., 2000: Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 14, 327-335
- Braude, R., 1978: Antibiotics in animal feed in Great Britain. *J.Anim.Sci.*, 46, 1425-1436
- Buchholz von, A., 1985: Minimale Hemmkonzentrationen von Ampicillin, Cefoperazon, Chlortetracyclin, Gentamicin, Polymyxin B, Trimethoprim, Sulfaäthoxyridazine, Sulfadimidin/Sulfathiazol, Trimethoprim/Sulfathiazol/Sulfadimidin und Trimethoprim/Sulfadoxin für *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* und *Corynebacterium pyogenes* boviner Herkunft. Dissertationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

- Burdett, V., 1986: Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein synthesis. *J.Bacteriol.*, 165, 564-569
- Butaye, P., Cloeckaert, A. und Schwarz, S., 2003: Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 22, 205-210
- Bywater, R., Deluyker, H., Deroover, E., de Jong, A., Marion, H., McConville, M., Rowan, T., Shyrock, T., Shuster, D., Thomas, V., Valle, M. und Walters, J., 2004: A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J.Antimicrob.Chemother.*, 54, 744-754
- Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N. und Mackie, R. I., 2001: Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl.Environ.Microbiol.*, 67, 1494-1502
- Chirino-Trejo, M., Woodbury, M. R. und Huang, F., 2003: Antibiotic sensitivity and biochemical characterization of *Fusobacterium* spp. and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from farmed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with necrobacillosis. *J.Zoo.Wildl.Med.*, 34, 262-268
- Chopra, I., 1994: Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 38, 637-640
- Chopra, I. und Roberts, M., 2001: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 65, 232-260
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2002: CLSI Document M31-A2: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. Ed.2, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2004: CLSI-Dokument M31-S1: Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; informational supplement. Wayne, PA, USA
- Cohen, R. O., Colodner, R., Ziv, G. und Keness, J., 1996: Isolation and antimicrobial susceptibility of obligate anaerobic bacteria recovered from the uteri of dairy cows with retained fetal membranes and postparturient endometritis. *J.Vet.Med.B*, 43, 193-199

- Collins, M. D., Jones, D., Kroppenstedt, R. M. und Schleifer, K. H., 1980: Chemical studies as a guide to the classification of *Corynebacterium pyogenes* and "*Corynebacterium haemolyticum*". J.Gen.Microbiol., 128, 335-341
- Collins, M. D. und Jones, D., 1982: Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb. nov. J.Gen.Microbiol., 128, 901-903
- Collins, M. D., Jones, D. und Schofield, G. M., 1982: Reclassification of "*Corynebacterium haemolyticum*" (MacLean, Leibow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov. J.Gen.Microbiol., 128, 1279-1281
- Coyle, M. B. und Lipsky, B., 1990: Coryneform bacteria in infectious diseases: Clinical and laboratory aspects. Clin.Microbiol.Rev., 3, 227-246
- Davison, H. C., Low, J. C., und Woolhouse, M. E. J., 2000: What is antibiotic resistance and how can we measure it. Trends Microbiol., 8, 554-559
- Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN), 2000: Medizinische Mikrobiologie und Immunologie: Diagnostische Verfahren. Ed.3, Beuth Verlag
- Diaz-Torres, M. L., McNab, R., Spratt, D. A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M. und Mullany, P., 2003: Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. Antimicrob.Agents Chemother., 47, 1430-1432
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. und Hacker, J., 2004: Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat.Rev., 2, 414-424
- Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R. C., Gao, F., Bales, K. R., Triarhou, L. C., Chernet, E., Perry, K. W., Nelson, D. L., Luecke, S., Phebus, L. A., Bymaster, F. P. und Paul, S. M., 2001: Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 98, 14669-14674
- Endres, A., 1983: Minimale Hemmkonzentration von Oxytetracyclin, Penicillin G, Chloramphenicol, Erythromycin, Sulfmethazin und Sulfadoxin-Trimethoprim für *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* und *Corynebacterium pyogenes* boviner Herkunft. Dissertationsschrift. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

- Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y. und Takahashi, T., 2004: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J.Antimicrob.Chemother.*, 53, 266-270
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Eucast Discussion Document E.Dis 5.1, 2003: Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin.Microbiol.Infect.*, 9, 1-7
- Fernández, E. P., Vela, A. I., Las, Heras A., Dominguez, L., Fernández-Garayzabal, J. F., und Moreno, M. A., 2001: Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewe's mastitis. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 18, 571-574
- Ferone, R., Bushby, S. R. M., Burchall, J. J., Moore, W. D. und Smith, D., 1975: Identification of Harper-Cawston factor as thymidine phosphorylase and removal from media of substances interfering with susceptibility testing to sulfonamides and diaminopyrimidines. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 7, 91-98
- Forloni, G., Colombo, L., Girola, L., Tagliavini, F. und Salmona, M., 2001: Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.*, 487, 404-407
- Forloni, G., Iussich, S., Awan, T., Colombo, L., Angeretti, N., Girola, L., Bertani, I., Poli, G., Caramelli, M., Grazia, Bruzzone M., Farina, L., Limido, L., Rossi, G., Giaccone, G., Ironside, J. W., Bugiani, O., Salmona, M., und Tagliavini, F., 2002: Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 10849-10854
- Franklin, T. J. und Snow, G., 1971: *Biochemistry of antimicrobial action*. Acad. Press, New York
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. und Toussaint, A., 2005: Mobile genetic element: The agents of open source evolution. *Nat.Rev.*, 3, 722-732
- Funke, G., Ramos, C. P., Fernandez-Garayzabal, J. F., Weiss, N. und Collins, M. D., 1995: Description of human-derived Centers for Disease Control coryneform group 2 bacteria as *Actinomyces bernardiae* sp. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 45, 57-60
- Funke, G., von Graevenitz, A., Clarridge, J. E. und Bernard, K. A., 1997: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin.Microbiol.Rev.*, 10, 125-159

- Gahrn-Hansen, B. and Frederiksen, W., 1992: Human infections with *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*). *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 15, 349-354
- Gründer, H.-D., 2002: Herzinnenhautentzündung und Herzklappenfehler. In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., and Stöber, M.: *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes: Als "Krankheiten des Rindes" begründet von Gustav Rosenberger*, 170-173, Ed.4, Parey Verlag, Berlin
- Guardabassi, L., Schwarz, S. und Lloyd, D. H., 2004: Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J.Antimicrob.Chemother.*, 54, 321-332
- Guérin-Faublée, V., Flandrois, J. P., Broye, E., Tupin, F. und Richard, Y., 1993 a: *Actinomyces pyogenes*: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Vet.Res.*, 24, 251-259
- Guérin-Faublée, V., Flandrois, J. P. und Richard, Y. G., 1993 b: Antimicrobial susceptibility testing of *Actinomyces pyogenes*: comparison of disk diffusion test and Api ATB Strep system with the agar dilution method. *Zentralbl.Bakteriol.*, 279, 377-386
- Gulbahar, M. Y. und Gurturk, K., 2002: Pyothorax associated with a *Mycoplasma* sp and *Arcanobacterium pyogenes* in a kitten. *Aust.Vet.J.*, 80, 344-345
- Hall, R. M., Recchia, G. D., Collis, C. M., Brown, H. J. und Stokes, H. W., 1996: Gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. In: Amábile-Cuevas, C. F.: *Antibiotic resistance: From molecular basic to therapeutic options*, 19-33, R.G. Landes Company
- Hirvonen, J., Pyörälä, S., Heinäsuo, A. und Jousimies-Somer, H., 1994: Penicillin G and Penicillin G-tinidazole treatment of experimentally induced summer mastitis-effect on elimination rates of bacteria and outcome of the disease. *Vet.Microbiol.*, 42, 307-315
- Holth, H., 1908: Untersuchungen über den *Bacillus pyogenes* und die durch ihn hervorgerufenen Gewebsveränderungen. *Zentralbl.Infektionskr.*, 3, 155-217
- Hoyles, L., Falsen, E., Foster, G., Rogerson, F. und Collins, M. D., 2002: *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 52, 617-619
- Hughes, V. M. und Datta, N., 1983: Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, 302, 725-726

- Jadon, R. S., Dhaliwal, G. S. und Jand, S. K., 2005: Prevalence of aerobic and anaerobic uterine bacteria during peripartum period in normal and dystocia-affected buffaloes. *Anim.Reprod.Sci.*, 88, 215-224
- Jones, C., Stevens, D. L. und Ojo, O., 1987: Effect of minimal amounts of thymidine on activity of Thrimethoprim-Sulfamethoxazole against *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 31, 144-147
- Jost, B. H., Songer, J. G. und Billington, S. J., 1999: An *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes* mutant deficient in production of the pore-forming cytolyisin pyolysin has reduced virulence. *Inf.Immun.*, 67, 1723-1728
- Jost, B. H., Songer, J. G. und Billington, S. J., 2001: Cloning, expression, and characterization of a neuraminidase gene from *Arcanobacterium pyogenes*. *Inf. Immun.*, 69, 4430-4437
- Jost, B. H., Post, K. W., Songer, J. G. und Billington, S. J., 2002: Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. *Vet.Res.Commun.*, 26, 419-425
- Jost, B. H., Field, A. C., Trinh, H. T., Songer, J. G. und Billington, S. J., 2003: Tylosin resistance in *Arcanobacterium pyogenes* is encoded by an *ermX* determinant. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 47, 3519-3524
- Jost, B. H., Trinh, H. T., Songer, J. G. und Billington, S. J., 2004: A second tylosin resistance determinant, *Erm B*, in *Arcanobacterium pyogenes*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 48, 721-727
- Jost, B. H. und Billington, S. J., 2005: *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek*, 88, 87-102
- Jousimies-Somer, H., Pyorala, S., und Kanervo, A., 1996: Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 40, 157-160
- Kahlmeter, G., Brown, D. F., Goldstein, F. W., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P. und Vatopoulos, A., 2003: European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J.Antimicrob.Chemother.*, 52, 145-148
- Kasari, T. R., Marquis, H. und Scanlan, C. M., 1988: Septic arthritis and osteomyelitis in a bovine digit: a mixed infection of *Actinomyces pyogenes* and *Fusobacterium necrophorum*. *Cornell Vet.*, 78, 215-219

- Kaszanytzky, E. J., Tarpai, A., Janosi, S., Papp, M. und Skare, J., 2002: Development of an antibiotic resistance monitoring system in Hungary. *Acta Vet.Hung.*, 50, 189-197
- Kayser, F. H., 1997: Allgemeine Bakteriologie. In: Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. und Zinkernagel, R. M.: *Medizinische Mikrobiologie*, 138-220, Ed.9, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York
- Kehrenberg, C. und Schwarz, S., 2000: Identification of a truncated, but functionally active *tet(H)* tetracycline resistance gene in *Pasteurella aerogenes* and *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 188, 191-195
- Kirk, R. K., Svensmark, B., Ellegaard, L. P. und Jensen, H. E., 2005: Locomotive Disorders associated with sow mortality in Danish pig herds. *J.Vet.Med.A.*, 52, 423-428
- Kotrajaras, R., Buddhavudhikrai, P., Sukroongreung, S. und Chanthravimol P., 1982: Endemic leg ulcers caused by *Corynebacterium pyogenes* in Thailand. *Int.J.Dermatol.*, 21, 407-409
- Kotrajaras, R. und Tagami, H., 1987: *Corynebacterium pyogenes*: Its pathogenic mechanism in epidemic leg ulcers in Thailand. *Int.J.Dermatol.*, 26, 45-50
- Kroker, R., Löscher, W., Simunek, J., Trolldenier, H. und Ungemach, F. R., 1996: Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: Frey, H.-H. und Löscher, W.: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 454-508, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Kühne, M. und Mitzscherling, A. T., 2004: Zum Eintrag von gebundenen Tetracyclin-Rückständen in die Nahrungskette - Ein Beitrag zur Gefahrenidentifikation. *Berl.Münch.Tierärztl.Wsch.*, 117, 201-206
- Lavin, S., Marco, I., Franch, J. und Abarca, L., 1998: Report of a case of pyogenic arthritis associated with *Actinomyces pyogenes* in a chamois (*Rupicapra pyrenaica*). *J.Vet.Med.B.*, 45, 251-253
- Lawson, P. A., Falsen, E., Foster, G., Eriksson, E., Weiss, N. und Collins, M. D., 2001: *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 51, 55-59
- Lämmle, Ch., 1990: Untersuchungen zu möglichen Pathogenitätsfaktoren von *Actinomyces pyogenes*; Übersichtsreferat. *Berl.Münch.Tierärztl.Wsch.*, 103, 121-125

- Lämmler, Ch. und Hartwigk, H., 1995: Infektionen durch *Actinomyces pyogenes*. In: Blobel, H. und Schließer, T.: Handbuch der bakteriellen Infektion bei Tieren, 203-219, Ed.2, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart
- Lehnen, A., Busse, H.-J., Frölich, K., Kasinska, M., Kämpfer, P. und Speck, S., 2006: *Arcanobacterium bialowiezense* sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov. isolated from the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis and emended description of the genus *Arcanobacterium*, Collins *et al.*, 1983.
<http://www.sgm.ac.uk/IJSEM/PiP/ijsem63923.pdf>
- Lepine, G., Lacroix, J. M., Walker, C. B. und Progulske-Fox, A., 1993: Sequencing of a *tet(Q)* gene isolated from *Bacteroides fragilis* 1126. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 37, 2037-2041
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C. und Taylor, D. E., 1989: Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 33, 1373-1374
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I. und Taylor, D. E., 1999: Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, 1523-1524
- Lucet, A., 1893: Recherches bactériologiques sur la suppuration chez les animaux de l'espèce bovine. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*, 2893, 325-330
- Luhofner, G., Böttner, A., Hafez, H. M., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Richter, A., Sigge, C., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Wallmann, J., Werckenthin C. und Schwarz, S., 2004: Vorschläge der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik - Mastitis-und Großtierlayouts. *Berl.Münch.Tierärztl.Wsch.*, 117, 245-251
- Lynch, M., O'Leary, J., Murnaghan, D. und Cryan, B., 1998: *Actinomyces pyogenes* septic arthritis in a diabetic farmer. *J.Infect.*, 37, 71-73
- Martel, J. L., Tardy, F., Brisabois, A., Lailier, R., Coudert, M. und Chaslus-Dancla, E., 2000: The French antibiotic resistance monitoring programs. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 14, 275-283
- Martin, P., Trieu-Cuot, P. und Courvalin, P., 1986: Nucleotide sequence of the *tet(M)* tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon *Tn1545*. *Nucl.Acids Res.*, 14, 7047-7058

- Mascaretti, O. A., 2003: Bacteria versus Antibacterial Agents-an integrated approach. ASM Press, Washington DC
- Mateu, E. und Martin, M., 2000: Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J.Vet.Med.B, 48, 569-581
- McEwen, S. A., Aarestrup, F. M. und Jordan, D., 2006: Monitoring of antimicrobial resistance in animals: Principles and practices. In: Aarestrup, F. M.: Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 397-413, ASM Press, Washington, D.C.
- Melville, C. M., Brunel, R., Flint, H. J. und Scott, K. P., 2004: The *Butyrivibrio fibrisolvens tet(W)* gene is carried on the novel conjugative transposon TnB1230, which contains duplicated nitroreductase coding sequences. J.Bacteriol., 186, 3656-3659
- Meunier, D., Acar, J. F., Martel, J. L., Kroemer, S. und Valle, M., 2004: A seven-year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic strains isolated from pets. Int.J.Antimicrob.Agents, 24, 592-598
- Mevius, D. J. und van Pelt, W., 2002: Monitoring of antimicrobial resistance and antimicrobial usage in animals in the Netherlands in 2002. <http://www.cidcleystad.nl/docs/MARAN-2002-web.pdf>
- Michalova, E., Novotna, P. und Schlegelova, J., 2005: Tetracycline in veterinary medicine and bacterial resistance to them. Vet.Med.-Czech, 49, 79-100
- Monnet, D. L., 2000: Toward multinational antimicrobial resistance surveillance systems in Europe. Int.J.Antimicrob.Agents, 15, 91-101
- Morck, D. W., Olson, M. E., Louie, T. J., Koppe, A. und Quinn, B., 1998: Comparison of ceftiofur sodium and oxytetracycline for treatment of acute interdigital phlegmon (foot rot) in feedlot cattle. JAVMA, 212, 254-257
- Moreno, Miguel A., Dominguez, Lucas, Teshager, Tirushet, Herrero, Inmaculada A. und Porrero, M. Concepcion, 2000: Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. Int.J.Antimicrob.Agents, 14, 285-290
- Nagaraja, T. G., Beharka, A. B., Chengappa, M. M., Carroll, L. H., Raun, A. P., Laudert, S. B. und Parrott, J. C., 1999: Bacterial flora of liver abscesses in feedlot cattle fed tylosin or no tylosin. J.Anim.Sci., 77, 973-978

- Narayanan, S., Nagaraja, T. G., Staats, J., Chengappa, M. M. und Oberst, R. D., 1998: Biochemical and biological characterizations and ribotyping of *Actinomyces pyogenes* and *Actinomyces pyogenes*-like organisms from liver abscesses in cattle. *Vet.Microbiol.*, 61, 289-303
- Nattermann H. und Horsch, F., 1977: Die *Corynebacterium-pyogenes*-Infektion des Rindes; 1. Mitteilung: Verbreitung des Erregers. *Arch.Exp.Veterinarmed.*, 31, 405-413
- Norm und Norm-Vet, 2002: Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. Norm, Tromsø, Norwegen; Norm-Vet, Oslo, Norwegen
- Ojo, K. K., Kehrenberg, C., Odelola, H. A., Schwarz, S., 2003: Structural analysis of the tetracycline resistance gene region of a small multiresistance plasmid from uropathogenic *Escherichia coli* isolated in Nigeria. *J.Antimicrob.Chemother.*, 52, 1043-1044
- Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G. und Read, R. R., 2002: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can.J.Vet.Res.*, 66, 86-92
- Pang, Y., Bosch, T. und Roberts, M. C., 1994: Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. *Mol.Cell Probes*, 8, 417-422
- Perl, T. M., Pfaller, M. A., Houston, A. und Wenzel, R. P., 1990: Effect of serum on the in vitro activities of 11 broad-spectrum antibiotics. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 34, 2234-2239
- Perreten, V., 2003: Use of antimicrobials in foodproducing animals in Switzerland and the European Union (EU). *Mitt.Lebensm.Hyg.*, 94, 155-163
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, Ch., Jones, R., Nightingale, Ch., Preston, R. und Waddell, J., 2004: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J.Antimicrob.Chemother.*, 53, 28-52
- Pospiech, A. und Neumann, B., 1995: A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet.*, 11, 217-218
- Prescott, J. F. und Yielding, K. M., 1990: In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Can.J. Vet.Res.*, 54, 195-197

- Quinn, A. K., Vermunt, J. J. und Twiss, D. P., 2002: *Arcanobacterium pyogenes* mastitis in a 18-month-old heifer. N.Z.Vet.J., 50, 167-168
- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., and Carter G.R., 1994: Clinical Veterinary Microbiology. Mosby Verlag, London
- Ramos, C. P., Foster, G. und Collins, M. D., 1997: Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. Int.J.Syst.Bacteriol., 47, 46-53
- Reddy, C. A., Cornell, C. P. und Fraga, A. M., 1982: Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the Genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. Int.J.Syst.Microbiol., 32 (4), 419-429
- Ribeiro, M. L., Gerrits, M. M., Benvengo, Y. H., Berning, M., Godoy, A. P., Kuipers, E. J., Mendonca, S., van Vliet, A. H., Pedrazzoli, J., Jr. und Kusters, J. G., 2004: Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. FEMS Immunol.Med.Microbiol., 40, 57-61
- Richter, A., Böttner, A., Goossens, L., Hafez, H. M., Hartmann, K., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Schulz, B., Schwarz, S., Sigge, C., Waldmann, K.-H., Wallmann, J., und Werckenthin C., 2006: Mögliche Gründe für das Versagen einer antibakteriellen Therapie in der tierärztlichen Praxis. Berl.Münch.Tierärztl.Wsch., zur Publikation eingereicht
- Roberts, D. C., 1967: The pathogenic synergy of *Fusiformis necrophorus* and *Corynebacterium pyogenes*: II. The response of *F. necrophorus* to a filterable product of *C. pyogenes*. J.Exp.Path., 48, 674-679
- Roberts, M. C., Moncla, B. J. und Hillier, S. L., 1991: Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positiv bacteria. Antimicrob.Agents Chemother., 35, 2655-2657
- Roberts, M. C., Pang, Y., Riley, D. E., Hillier, S. L., Berger, R. C. und Krieger, J. N., 1993: Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. Mol.Cell Probes, 7, 387-393
- Roberts, M. C., 1996: Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol.Rev., 19, 1-24

- Roberts, M. C., 1997: Genetic mobility and distribution of tetracycline resistance determinants. Ciba Found.Symp., 207, 206-218
- Roberts, M. C., 2002: Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. Mol.Biotechnol., 20, 261-283
- Roberts, M. C., 2003: Tetracycline therapy: update. Clin.Infect.Dis., 36, 462-467
- Roberts, M. C., 2005: Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol.Lett., 245, 195-203
- Roeder, B. L., Chengappa, M. M., Lechtenberg, K. F., Nagaraja, T. G. und Varga, G. A., 1989: *Fusobacterium necrophorum* and *Actinomyces pyogenes* associated facial and mandibular abscesses in Blue Duiker. J.Wildl.Dis., 25, 370-377
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H. und Cunliffe, W. J., 1998: 16S-rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positiv bacterium. Antimicrob.Agents Chemother., 42, 1702-1705
- Ruoff, K. L., Whiley, R. A. und Beighton, D., 1999: *Streptococcus*. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. und Tenover, R. H.: Manual of clinical microbiology, 283-296, Ed.7, ASM Press, Washington D.C.
- Schaal, K. P., 1986: Genus *Actinomyces* Harz 1877. In: Sneath, P. H. A, Mair, N. S., Sharpe, M. E. und Holt, J. G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1383-1418, Ed.9, Williams & Wilkins, Baltimore
- Schröter, K. und Wallmann, J., 2003: Monitoring der in-vitro Empfindlichkeit tierpathogener Bakterien von landwirtschaftlichen Nutztieren in Deutschland; Teil 1: Methodik zur Planung aussagekräftiger nationaler Überwachungsstudien zur Antibiotikaresistenz. DTBl., 3, 238-240
- Schwarz, S., Roberts, M. C., Werckenthin C., Pang, Y. und Lange, C., 1998: Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. Vet.Microbiol., 63, 217-227
- Schwarz, S. und Chaslus-Dancla, E., 2001: Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet.Res., 32, 201-225

- Schwarz, S., Böttner, A., Hafez, H. M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Wallmann, J. und Werckenthin C., 2003: Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung im Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl.Münch.Tierärztl.Wsch., 116, 353-361
- Scott, K. P., Barbosa, T. M., Forbes, K. J. und Flint, H. J., 1997: High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance element in the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. Appl.Environ.Microbiol., 63, 3405-3411
- Scott, K. P., Melville, C. M., Barbosa, T. M. und Flint, H. J., 2000: Occurrence of the new tetracycline resistance gene *tet(W)* in bacteria from the human gut. Antimicrob.Agents Chemother., 44, 775-777
- Scott, K. P., 2002: The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. Cell Mol.Life Sci., 59, 2071-2082
- Sheldon, I. M., Bushnell, M., Montgomery, J. und Rycroft, A. N., 2004: Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. Vet.Rec., 155, 383-387
- Sougakoff, W., Papadopoulou, B., Nordmann, P. und Courvalin, P., 1987: Nucleotide sequence and distribution of gene *tet(O)* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol.Lett., 44, 153-159
- Speer, B. S., Bedzyk, L. und Salyers, A. A., 1991: Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. J.Bacteriol., 173, 176-183
- Stahlmann, R. und Lode, H., 2005: Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie. In: Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. und Starke, K. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 781-911, Ed.9, Elsevier GmbH, München
- Stanton, Th. B. und Humphrey, S. B., 2003: Isolation of tetracycline-resistant *Megasphaera elsdenii* strains with novel mosaic gene combinations of *tet(O)* and *tet(W)* from swine. Appl.Environ.Microbiol., 69, 3874-3882
- Stryer, L., 1999: Biochemie. Ed. 4, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin

- Tauch, A., Puhler, A., Kalinowski, J., und Thierbach, G., 2000: TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid*, 44, 285-291
- Tauch, A., Gotker, S., Puhler, A., Kalinowski, J. und Thierbach, G., 2002: The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette aadA9 and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*, 48, 117-129
- Thomas, C. M und Nielsen, K. M., 2005: Mechanism of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat.Rev.*, 3, 711-721
- Trinh, H. T., Billington, S. J., Field, A. C., Songer, J. G. und Jost, B. H., 2002: Susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* from different sources to tetracycline, macrolide and lincosamide antimicrobial agents. *Vet.Microbiol.*, 85, 353-359
- Villedieu, A., Diaz-Torres, M. L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D. A., Wilson, M. und Mullany, P., 2003: Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 47, 878-882
- Wallmann, J., Schröter, K. und Kroker, R., 2003 a: Monitoring der *In-vitro*-Empfindlichkeit tierpathogener Bakterien von landwirtschaftlichen Nutztieren in Deutschland; Teil 2: Ergebnisse 2001 der nationalen Überwachungsstudie zur Antibiotikaresistenz im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). *DTBl.*, 6, 617-620
- Wallmann, J., Schröter, K., Wieler, L. H. und Kroker, R., 2003 b: National antibiotic resistance monitoring in veterinary pathogens from sick food-producing animals: the German programme and results from the 2001 pilot study. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 22, 420-428
- Wallmann, J., Böttner, A., Hafez, H. M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Schwarz, S., Sigge, C., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Werckenthin C. und Zschiesche, E., 2005: Ergebnisse eines deutschlandweiten Ringversuches zur Implementierung der Bouillon-Mikrodilution zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Bakterien von Tieren. *Berl.Münch.Tierärztl.Wsch.*, 118, 205-213
- Watanabe T., 1963: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 27, 87-115

- Wegener, H. C., 2003: Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr.Opin.Microbiol.*, 6, 439-445
- Werckenthin C., 1997: Molekularbiologische Untersuchungen zur Verbreitung antibiotischer Resistenzgene bei Staphylokokken unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung resistenzvermittelnder Plasmide und Transposons. Dissertationsschrift. Tierärztliche Hochschule Hannover
- Werckenthin C., Cardoso, M., Martel, J. L. und Schwarz, S., 2001: Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet.Res.*, 32, 341-362
- Werckenthin C., Böttner, A., Hafez, H. M., Hartmann, K., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Luhofer, G., Richter, A., Schulz, B., Schwarz, S., Sigge, C., Traeder, W., Waldmann, K.-H. und Wallmann, J., 2005: Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung. *Berl.Münch.Tierärztl.Wsch.*, 118, 471-480
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H. und Sheldon, I. M., 2005: Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogen.*, 63, 102-117
- Witte, W., 2000: Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 16, 19-24
- World Health Organization (WHO), 2001: WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO-Report WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
- World Health Organization (WHO), 2002: Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health: Report of a WHO consultation. WHO-Report: WHO/CDS/CSR/EPH/2002.11.
- Yoshimura, H., Kojima, A. und Ishimaru, M., 2000: Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. *J.Vet.Med.B*, 47, 139-143
- Zhanel, G. G., Homenuik, K., Nichol, K., Noreddin, A., Vercaigne, L., Embil, J., Gin, A., Karlowsky, J. A. und Hoban, D. J., 2004: The glycylcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, 64, 63-88

8. Anhang

8.1 Materialien

8.1.1 Chemikalien, Enzyme, Nährmedien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Köln
Ampicillin	Sigma, München
Bacto - Tryptone	BD Diagnostics, Heidelberg
Bariumchloriddihydrat	VWR, Darmstadt
Benzylpenicillin - Natrium	Grünenthal, Aachen
Blutagarbasis	VWR, Darmstadt
BHI-Pulver	VWR, Darmstadt
BSA	NEB, Frankfurt am Main
CaMHB-Pulver	BD Diagnostics, Heidelberg
Chloroform	VWR, Darmstadt
Dimethylformamide	Sigma, München
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	NEB, Frankfurt am Main
<i>EcoRI</i> Puffer	NEB, Frankfurt am Main
<i>EcoRV</i>	NEB, Frankfurt am Main
<i>EcoRV</i> Puffer	NEB, Frankfurt am Main
Erythromycin	Merck, Darmstadt, Charge K26017715
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	VWR, Darmstadt
FKS	Perbio Science, Charge CNU 0059
Fuchsin	VWR, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	VWR, Darmstadt
<i>HindIII</i>	NEB, Frankfurt am Main
<i>HindIII</i> Puffer	NEB, Frankfurt am Main
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Jod	VWR, Darmstadt
Kaliumiodid	VWR, Darmstadt
Karbolgentianaviolett	VWR, Darmstadt
Größenstandard (100bp -, 1kb - Marker)	NEB, Frankfurt am Main
Lysiertes Pferdeblut	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Lysostaphin	VWR, Darmstadt
Lysozym	VWR, Darmstadt
Magnesiumsulfatpuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
McFarland-Standard 6	BioMérieux, Nürtingen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Phenolchloroform	Roth, Karlsruhe
RNase	VWR, Darmstadt

Schwefelsäure	VWR, Darmstadt
Supplement C [™]	BD Diagnostics, Heidelberg
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tetracyclin	VWR, Darmstadt, Charge B56796
Wasserstoffperoxid	VWR, Darmstadt
X-Gal	AppliChem, Darmstadt
Xylose	VWR, Darmstadt

8.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank aerob	Heraeus function line (Kendro, Langenselbold)
Brutschrank CO ₂	Heraeus function line (Kendro, Langenselbold)
CCD-Kamera	peqLab, Erlangen
Einmalimpfösen	VWR, Darmstadt
Elektronische Analysenwaage	Sartorius Research (Mettler Toledo, Giessen)
Exsiccator	Speed Vac Concentrator (Bachhofer, Reutlingen)
Gelektrophoresekammer	Model B1 (Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth NH USA)
Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Silberbrand Eterna Klasse B (Brand, Wertheim)
Kühlzentrifuge	5810 R (Eppendorf, Hamburg), RotorNr. A-4-62/06896
Kühlzentrifuge Sigma	3K15 (Sigma, Osterode am Harz), RotorNr. 12156-H
Zentrifuge für 1,8 ml Reaktionsgefäße	1-15 (Sigma, Osterode am Harz), RotorNr. 12124
Laborglaswaren	Schott, Mainz
Laborwaage	Navigator (Ohaus Corporation, Schweiz)
Latexhandschuhe	Multi-Perect Latexhandschuhe (Multi-Com Goods, Ahrenburg)
Lichtmikroskop	Laborlux K (Leitz, Wetzlar)
Mehrkanalpipette/-Spitzen	Research (Eppendorf, Hamburg)/1-200 µl, Ratiolab, Dreieich
Mikrowellengerät	SS-758 (Panasonic, Matsushita Electric, UK)
Nitrilhandschuhe	TouchNTuff [™] (Ansell Edmont, Cochocton, Ohio, USA)
pH-Meter	pH 535 MultiCal (Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim)
Photometer (DNA-Messungen)	GeneQuant (Fa. Amersham, UK)
Photometer (Bakteriensuspensionen)	Uvikon xs (Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
Pipettenspitzen	Plastibrand®-Pipettenspitzen Typ A 0,5-20 µl, Typ B 2-200 µl, Typ D 50-1000 µl (Brand, Wertheim)
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere Filter Tips (Sarstedt, Nürnbrecht)
Pipettierhilfe	Accu Jet® (Brand, Wertheim)
Plastikpetrischalen	Greiner Bio One GmbH, Österreich
Polypropylenröhrchen 15 ml, 50 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Reaktionsgefäße 1,8 ml	Eppendorf, Köln
Sicherheitswerkbank	Hera safe (Kendro, Langenselbold)
Stromgeber für die Gelektrophoresekammer	Constant Power Supply (LKB Bromma)
Thermocycler	Primus 96 advanced Gradient (peqLab, Erlangen)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tücher	Roth, Karlsruhe
UV-Tisch	Tex - 35c ltf (Labortechnik, Wasserburg)
Vortex-Genie	Mod.K550-GE (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
Wasserbad	Gfl 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

8.2 Rezepte

Ampicillin Stocklösung (10mg/ ml)

Ampicillin	10	mg
A. demin.	1	ml

Blaumarker

Bromphenolblau 1%	12,5	ml
0,5 M Na ₂ - EDTA	5	ml
Glycerin	25	ml
A. demin.	7,5	ml

BHI - Medium

BHI-Pulver	37	g
A. demin.	1000	ml

Autoklavieren, abkühlen lassen und bei 4 °C aufbewahren.

Größenstandards (100 bp, 1 kb-Marker)

Größenstandard	4	µl
Blaumarker	8	µl
A.demin. steril	12	µl

LB - Bouillon

Caseinpepton tryptisch verdaut	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
NaOH	nach Bedarf	
A. demin.	1000	ml

Zusätze in A. demin. lösen, mit NaOH auf pH-Wert 7,2 bis 7,4 einstellen, autoklavieren, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

LB Selektivplatten mit Ampicillin

Caseinpepton tryptisch verdaut	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	5	g
Bacto Agar	12	g
NaOH	nach Bedarf	
Ampicillin (10mg/ml)10	ml	
A. demin.	1000	ml

Zubereitung wie LB-Bouillon, nur Ampicillin erst nach dem Abkühlen (ca. 52 °C) zugeben.

LB-Z Selektivplatten

LB-Medium mit Ampicillin	1000	ml
X-Gal	80	g: in Dimethylformamid gelöst
0,1 M IPTG	238	g: in 10 ml A. demin. lösen

X-Gal und IPTG LB Amp Medium zugeben, Platten gießen, erstarren lassen, bei 4°C im dunklen aufbewahren

Löfflerserum

Glukose	1	g
Pepton	1	g
NaCl	0,5	g
A. demin.	100	ml
Rinderserum	300	ml

Glukose, Pepton und NaCl in A. demin. lösen, Serum zugeben, pH-Wert auf 7,4 einstellen. In Petrischalen gießen, auf 68 °C erwärmen und erstarren lassen.

Lysostaphin Stocklösung (2 mg/ml)

Lysostaphin	1	mg
A. demin.	500	µl

Lysozym Stocklösung (100 mg/ml)

Lysozym	0,5	g
A. demin.	5	ml

McFarlandstandard 0,5

Bariumchloriddihydrat 0,1173 g
A. demin 10,00 ml
lösen und gut mischen

Schwefelsäure (95-97%) 960,00 µl
A. demin. 99,00 ml
gut mischen

aus den 100 ml der Schwefelsäurelösung 500 µl abnehmen und verwerfen, 500 µl der Bariumchloridlösung zugeben und gut mischen. OD₆₂₅ der fertigen Lösung gegen A. demin. messen. OD muss zwischen 0,08 und 0,1 liegen. Die 100 ml in Röhrchen zu je 4 bis 6 ml portionieren und bei Raumtemperatur lagern.

Minilysatlösung III

Natriumacetat 3 M
Mit Essigsäure auf pH = 4,8 einstellen, autoklavieren.

Müller - Hinton Blutplatten

Müller-Hinton-Agar nach
CLSI 38,00 g
A. demin. 1000 ml
autoklavieren, auf 52 °C abkühlen lassen, 50 - 100 ml defibriniertes Schafblut pro Liter zugeben, Platten gießen und bei 4 °C aufbewahren.

Müller - Hinton - Bouillon

CaMHB-Pulver 22,00 g
A. demin. 1000 ml
autoklavieren, bei 4°C aufbewahren

Puffer P1 mit RNase

Tris/HCl pH = 8,0 50 mM
EDTA 10 mM
Den Puffer mit RNaseA (100 µg/ml) versetzen.

Puffer P2

NaOH 200 mM
1%ig SDS dazu

Tris-Acetat-EDTA (TAE) - Puffer (10x)

Tris	0,4	M
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	0,01	M
Essigsäure	11,4	ml/l

Den pH-Wert des Puffers auf 7,8 einstellen. Die Lösung autoklavieren.
Zum Gebrauch als Laufpuffer (1x) 1:10 mit A. demin. verdünnen

Tris-EDTA-Natriumchlorid (TES) Puffer

NaCl	100	mM
Tris/HCl, pH = 8,0	10	mM
EDTA	1	mM

Veterinary fastidious medium (VFM)

CaMHB-Pulver	22,00	g
A. demin.	957	ml
lysiertes Pferdeblut	20	ml
Supplement C	20	ml

CaMHB Pulver in A. demin. lösen, autoklavieren, auf 8 °C abkühlen lassen, restliche
Ingredienzien zugeben, mischen und bei 4 °C lagern.

Xylose-Bouillon

NaCl	2,50	g
Protease-Pepton	10,00	g
K ₂ HPO ₄	1,25	g
A. demin.	1000	ml
Bromthymolblau (0,1%ig)	40,00	ml

den pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen, autoklavieren

Xylose 1%ig einwiegen, in Röhrchen zu je 3 ml abfüllen und an drei aufeinander folgenden
Tagen im Dampftopf erhitzen.

8.3 Tabellenanhang

Anhang

Tab. 8.1: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der „LMU-Arcanobakterien“

Isolatnummer	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	Xylose-verstoffwechslung	Proteolyse auf Löffler-Serum	API	Speziesidentität bestätigt?
144-04	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
264-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1229-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1257-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1269-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1332-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1677-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1847-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1890-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1891-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1950-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1954-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1959-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1974-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1976-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1977-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1978-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1982-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1983-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
1985-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2023-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2031-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2349-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2641-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja

Anhang

Tab. 8.1: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der „LMU-Arcanobakterien“ (Fortsetzung)

Isolatnummer	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	Xylose-verstoffwechslung	Proteolyse auf Löffler-Serum	API	Speziesidentität bestätigt?
2642-03	nach 24h angedeutete Hämolyse, nach 48h nur stecknadelspitze große, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	-	n. d.	<i>Cellu. spp.</i>	nein
2649-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2928-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
2931-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3611-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3809-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3850-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3869-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+/-	+	<i>A. pyogenes</i> (p = 0,999) ²	ja
3891-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3922-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3923-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3938-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
3968-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4004-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4039-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4040-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4075-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4249-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4368-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4371-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4390-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4399-03	nach 24h deutliche Hämolyse, nach 48h nur stecknadelspitze große, weiße, matte Kolonien mit deutlicher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	<i>A. pyogenes</i> (p = 0,999) ²	ja
4631-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja

Tab. 8.1: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der LMU-Arcanobakterien (Fortsetzung)

Isolat- nummer	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	Xylose- verstoffwechslung	Proteolyse auf Löffler- Serum	API	Speziesidentität bestätigt?
4783-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4790-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4855-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
4939-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
5009-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
5244-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja
5504-03	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	-	+	+	n. d.	ja

Legende:

¹ das Resultat *A. pyogenes* bei den morphologischen Untersuchungen steht für eine für *A. pyogenes* typische Morphologie (nach Reddy *et al.*, 1982; Schaal, 1986; Funke *et al.*, 1997)

² Wahrscheinlichkeit nach Herstellerangaben

+: Reaktion positiv

-: Reaktion negativ

+/-: Reaktion indifferent (im konkreten Fall war der Farbumschlag grünlich)

n. d.: Nicht durchgeführt

Anhang

Tab. 8.2: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der „BfT-Arcanobakterien“

BfT.-Nr.	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	API	Spezies bestätigt?
91	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
141	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
291	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
292	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
293	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
294	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
405	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
478	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
479	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
480	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
481	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
530	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
747	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
996	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1027	nach 24 h Hämolyse deutlich, nach 48 h ca. 3 mm große, weiße, matte Kolonien mit deutlicher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
1071	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1077	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1081	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1086	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
1087	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
1088	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
1089	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
1094	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja

Anhang

Tab. 8.2: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der „BfT-Arcanobakterien“ (Fortsetzung)

BfT.-Nr.	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	API	Spezies bestätigt?
1113	nach 24 h bereits stecknadelkopfgroße, weiße matte Kolonien mit deutlicher Hämolyse	grampositive Kokken	-	n. d.	nein
1114	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1115	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1116	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1128	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1162	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1163	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1191	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1250	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1318	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1319	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1320	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1321	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1322	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1323	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1324	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1325	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1326	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1327	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1328	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1508	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1545	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1546	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1858	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1895	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1914	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
1941	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2035	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2239	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2412	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja

Anhang

Tab. 8.2: Ergebnisse der phänotypischen Untersuchung der „BfT-Arcanobakterien“ (Fortsetzung)

BfT.-Nr.	Identifizierung nach makroskopischer Morphologie ¹	Identifizierung nach mikroskopischer Morphologie ¹	Katalase	API	Spezies bestätigt?
2413	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2654	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2655	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	Grampositive, pleomorphe, vorwiegend kokkoide Stäbchen	-	<i>A. pyogenes</i> (p=0,999) ²	ja
2656	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	Grampositive, pleomorphe, vorwiegend kokkoide Stäbchen	-	<i>A. pyogenes</i> (p=0,999) ²	ja
2657	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja
2658	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2659	nach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	Grampositive, pleomorphe, vorwiegend kokkoide Stäbchen	-	<i>A. pyogenes</i> (p=0,999) ²	ja
2660	nNach 24 h Hämolyse sichtbar, nach 48 h stecknadelkopfgroße, weiße, matte Kolonien mit schwacher Hämolyse	Grampositive pleomorphe Stäbchen	-	<i>Propioni. acnes</i>	nein
2662	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2663	<i>A. pyogenes</i>	<i>A. pyogenes</i>	n. d.	n. d.	ja
2664	nach 24h Hämolyse deutlich, nach 48h nur nadelspitzgroße, weiße, matte Kolonien mit deutlicher Hämolyse	<i>A. pyogenes</i>	-	n. d.	ja

Legende:

¹ das Resultat *A. pyogenes* bei den morphologischen Untersuchungen steht für eine für *A. pyogenes* typische Morphologie (Reddy *et al.*, 1982; Schaal, 1986; Funke *et al.*, 1997)

² Wahrscheinlichkeit nach Herstellerangaben

-: Reaktion negativ

n. d.: Nicht durchgeführt

Tab. 8.3: Wachstum der „LMU-Arcanobakterien“ auf verschiedenen, antibiotikahaltigen Blutagarplatten

Isolatnummer	Wachstum auf Tc5 ¹	Wachstum auf Pen0,125 ²	Wachstum auf Erythro0,5 ³
144-04	+	-	-
264-03	+	-	-
1229-03	+	-	-
1257-03	-	-	-
1269-03	+	-	-
1332-03	-	-	-
1677-03	-	-	-
1847-03	+	-	-
1890-03	+	-	-
1891-03	-	-	-
1950-03	+	-	-
1954-03	+	-	-
1959-03	+	-	-
1974-03	+	-	-
1976-03	-	-	-
1977-03	-	-	-
1978-03	-	-	-
1982-03	+	-	-
1983-03	+	-	-
1985-03	-	-	+
2023-03	+	-	-
2031-03	+	-	-
2349-03	+	-	-
2641-03	+	-	-
2649-03	+	-	-
2928-03	-	-	-
2931-03	+	-	+
3611-03	-	-	-
3809-03	+	-	+
3850-03	-	-	-
3869-03	+	-	-
3891-03	-	-	-
3922-03	+	-	-
3923-03	+	-	-
3938-03	-	-	-
3968-03	+	-	-
4004-03	+	-	-
4039-03	+	-	-
4040-03	+	-	+
4075-03	+	-	+
4249-03	+	-	-
4368-03	-	-	-
4371-03	+	-	-
4390-03	+	-	-
4399-03	-	-	-
4631-03	-	-	-
4783-03	+	-	-
4790-03	-	-	-
4855-03	-	-	+
4939-03	+	-	-
5009-03	+	-	-
5244-03	+	-	-

Tab. 8.3: Wachstum der „LMU-Arcanobakterien“ auf verschiedenen, antibiotikahaltigen Blutagarplatten (Fortsetzung)

Isolatnummer	Wachstum auf Tc5 ¹	Wachstum auf Pen0,125 ²	Wachstum auf Erythro0,5 ³
5504-03	+	-	-
DSM 20630	-	-	-
DSM 20594	-	-	-

Legende:

¹ Tetracyclinkonzentration in der Blutplatte von 5 µg/ml

² Penicillin G-Konzentration in der Blutplatte von 0,125 µg/ml

³ Erythromycinkonzentration in der Blutplatte von 0,5 µg/ml

+: Wachstum

-: Kein Wachstum

Tab. 8.4: Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung für Tetracyclin in Bouillonmikrodilution und Agardilution von 55 *A. pyogenes*-Stämmen

Isolatnummer	BMD-MHK (in µg/ml) Ansatz 1	Inokulumdichte Ansatz 1 (x 10 ⁵ KBE/ml)	BMD-MHK (in µg/ml) Ansatz 2	Inokulumdichte Ansatz 2 (x 10 ⁵ KBE/ml)	Agardilution-MHK (in µg/ml)
0144-04	32	2,2	32	5,2	32
0264-03	16	5	32	6,2	32
1229-03	32	1	32	2,8	32
1257-03	0,25	4	0,25	4,6	0,25
1269-03	16	5,7	16	8,1	16
1332-03	0,25	3,6	0,25	8	0,12
1677-03	0,25	3,2	0,25	4,2	0,25
1847-03	32	0,8	32	4,6	32
1890-03	16	5	16	6,1	16
1891-03	0,25	7,5	0,25	9,9	0,12
1950-03	32	6,7	32	7,7	32
1954-03	32	6,8	32	10	32
1959-03	64	3,8	64	6,3	32
1974-03	16	7,5	32	9,9	16
1976-03	0,25	8	0,25	10	0,25
1977-03	0,12	5,7	0,12	9,8	0,25
1978-03	0,12	3,7	0,12	8,9	0,25
1982-03	8	5,4	8	6,1	8
1983-03	8	4,7	8	7,4	8
1985-03	0,06	6,6	0,25	9,1	0,25
2023-03	8	2,8	8	6,3	16
2031-03	8	7,6	8	7,8	8
2349-03	32	8,2	32	8,4	32
2641-03	8	4,2	8	6,2	8
2649-03	64	2,1	64	2,9	64
2928-03	0,06	5,8	0,12	8,2	0,12
2931-03	8	7,3	8	7,8	8
3611-03	0,25	7,1	0,25	8,9	0,25
3809-03	8	4,6	8	8,5	8
3850-03	0,25	4	0,25	6,1	0,25
3869-03	64	6,3	64	7,9	64
3891-03	0,25	6,9	0,25	9,8	0,5
3922-03	16	4,3	16	7,5	16
3923-03	16	7,5	16	10	16
3938-03	0,12	3,1	0,12	8,1	0,25
3968-03	64	3,9	64	5,5	64
4004-03	32	3	32	4,6	64
4039-03	64	4,8	64	5,3	64
4040-03	16	5,4	16	6,6	16
4075-03	8	5	8	9,8	8
4249-03	16	3,7	16	5,8	16
4368-03	0,25	7,7	0,25	9,9	0,25
4371-03	8	6,3	8	6,9	8

Tab. 8.4: Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung für Tetracyclin in Bouillonmikrodilution und Agardilution von 55 *A. pyogenes*-Stämmen (Fortsetzung)

Isolatnummer	BMD-MHK (in µg/ml) Ansatz 1	Inokulumdichte Ansatz 1 (x 10 ⁵ KBE/ml)	BMD-MHK (in µg/ml) Ansatz 2	Inokulumdichte Ansatz 2 (x 10 ⁵ KBE/ml)	Agardilution-MHK (in µg/ml)
4390-03	16	8,2	16	8,3	32
4399-03	16	1,9	16	2,5	16
4631-03	0,25	6,8	0,25	8,3	0,5
4783-03	16	6,1	16	9,3	32
4790-03	0,25	3,2	0,25	5,1	0,25
4855-03	0,12	5,1	0,12	2,1	0,06
4939-03	16	6,9	16	9,3	32
5009-03	8	5,1	8	7,5	8
5244-03	8	4,6	8	7,8	8
5504-03	16	3,7	16	6	16
DSM 20594	0,12	6	0,12	10	0,25
DSM 20630	0,12	4,5	0,12	7	0,5

Anhang

Tab. 8.5: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV31

BfT-Nummer	Ampicillin	Amoxicillin/ Clavulansäure	Penicillin G	Ceftiofur	Cequinom	Cephalothin	Cephazolin	Cefoperazon
91	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,5	0,125
141	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
291	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,125
292	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,06	0,06	0,25	0,06
293	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
294	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,5	0,125
405	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,06	0,12	0,125
478	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,125	0,125	0,25	0,06
479	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,06	0,125	0,5	0,06
480	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,125
481	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,06	0,125	0,5	≤ 0,03
530	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,25	0,12	0,5	0,125
747	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,06
996	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,06	0,12	0,25	0,06
1027	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1071	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,06	0,125	0,06
1077	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,125	0,125	0,25	0,06
1081	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,25	0,06
1086	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1087	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,5	0,125
1088	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1089	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1094	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,5	0,125
1114	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,25	0,12	0,25	0,125
1115	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,12	0,25	0,06
1116	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,12	0,25	0,125
1128	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,125	≤ 0,03
1162	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1163	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1191	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,06	0,06	0,12	0,06
1250	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,12	0,25	0,06
1318	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,25	0,5	0,06
1319	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,125	0,06	0,125	0,06
1320	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,25	0,06	0,25	0,125
1321	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,06
1322	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,06
1323	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,06
1324	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,125	0,5	0,125
1325	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,125
1326	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,06	0,125	0,25	0,06
1327	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1328	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1508	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,125	0,06	0,12	0,06
1545	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,12	0,06
1546	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,25	0,25	0,5	0,06
1858	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	0,06
1895	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,25	0,06
1914	≤ 0,03	≤ 0,015/0,07	≤ 0,015	0,25	0,03	0,03	0,06	≤ 0,03
1941	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,125	0,125	0,5	≤ 0,03

Anhang

Tab. 8.5: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV31 (Fortsetzung)

BfT- Nummer	Ampicillin	Amoxicillin/ Clavulansäure	Penicillin G	Ceftiofur	Cequinom	Cephalothin	Cephazolin	Cefoperazon
2035	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,125	0,125	0,25	0,06
2239	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,06	0,25	0,06
2412	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,25	0,25	0,5	0,125
2413	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,12	0,06	0,12	0,125
2654	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,12	0,5	0,06
2655	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,06	0,12	0,5	0,06
2656	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,06	0,06	0,12	≤ 0,03
2657	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,03	0,5	0,25	0,12	0,5	0,125
2658	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,03	0,5	0,12	0,12	0,25	0,125
2659	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,12	0,12	0,12	0,06
2662	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,25	0,06	0,12	0,5	≤ 0,03
2663	≤ 0,03	0,03/0,015	≤ 0,015	0,5	0,06	0,12	0,5	≤ 0,03
2664	≤ 0,03	0,06/0,03	≤ 0,03	0,5	0,12	0,12	0,25	0,06

Anhang

Tab. 8.6: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV32

BfT- Nummer	Tulathro- mycin	Gentamicin	Enrofloxacin	SxT	Spiramycin	Tetracyclin	Neomycin	Chlor- amphenicol
91	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,5	4	1
141	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
291	0,06	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	1
292	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	64	4	1
293	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	16	4	1
294	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
405	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	0,5
478	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	16	4	1
479	0,06	0,5	0,5	0,015/0,3	≤ 0,06	32	4	1
480	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
481	0,06	0,5	0,5	0,03/0,6	≤ 0,06	16	4	1
530	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,5	8	2
747	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
996	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
1027	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,125	2	2
1071	≥ 128	1	1	0,12/2,38	≥ 256	16	4	2
1077	0,06	1	1	0,03/0,6	≤ 0,06	64	4	1
1081	0,125	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	1
1086	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,125	4	1
1087	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
1088	0,125	0,5	1	≤ 0,015/0,3	≤ 0,06	0,125	2	1
1089	0,125	1	1	0,03/0,6	0,125	16	4	2
1094	0,125	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	32	4	2
1114	0,125	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	16	4	1
1115	0,06	0,5	1	≤ 0,015/0,3	≤ 0,06	16	4	1
1116	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	16	4	1
1128	0,06	0,5	4	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	2
1162	0,125	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	8	4	1
1163	0,06	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	1
1191	0,06	1	0,5	0,03/0,6	≤ 0,06	8	4	2
1250	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	8	4	1
1318	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	32	4	2
1319	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	16	4	1
1320	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	32	4	1
1321	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
1322	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
1323	0,06	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	1
1324	≥ 128	2	1	0,03/0,6	≥ 256	16	4	2
1325	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
1326	≥ 128	1	0,5	≤ 0,015/0,3	≥ 256	64	2	2
1327	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
1328	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
1508	0,25	1	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
1545	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	16	4	1
1546	0,06	0,5	1	0,03/0,06	≤ 0,06	0,25	4	2
1858	0,06	2	1	0,06/1,19	≤ 0,06	8	4	1
1895	0,06	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	2
1914	0,06	0,5	0,25	≤ 0,015/0,3	≤ 0,06	16	4	1
1941	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	4	4	1
2035	0,125	0,5	2	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1

Tab. 8.6: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV32 (Fortsetzung)

BfT-Nummer	Tulathromycin	Gentamicin	Enrofloxacin	SxT	Spiramycin	Tetracyclin	Neomycin	Chloramphenicol
2239	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	8	4	1
2412	2	1	1	0,06/1,19	≥ 256	8	4	2
2413	0,06	0,5	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,125	4	1
2654	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,125	4	1
2655	0,06	1	1	0,03/0,6	≤ 0,06	0,25	4	1
2656	0,06	0,5	0,5	0,12/2,38	≤ 0,06	8	2	1
2657	0,06	1	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1
2658	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,125	4	1
2659	≥ 128	1	1	0,12/2,38	≥ 256	32	4	2
2662	0,06	0,5	1	0,12/2,38	≤ 0,06	32	4	1
2663	0,25	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	16	4	1
2664	0,06	0,5	1	0,06/1,19	≤ 0,06	0,25	4	1

Anhang

Tab. 8.7: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV33

BfT- Nummer	Erythro- mycin	Clindamycin	Tilmicosin	Spectino- mycin	Florfenicol	Colistin	Sulf- methoxazol	Oxacillin/ Natrium
91	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	32	32	0,25
141	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	16	0,25
291	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	4	1	≥ 64	≥ 2048	0,125
292	0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	≤ 0,03
293	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,125
294	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	1	1	≥ 64	32	0,125
405	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,25
478	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,25	0,5	≥ 64	2	0,25
479	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	≤ 0,5	0,125
480	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	16	0,125
481	≤ 0,015	0,06	0,06	0,5	1	≥ 64	4	0,125
530	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	1	1	≥ 64	64	0,25
747	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	4	0,06
996	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	1	0,06
1027	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	8	0,06
1071	≥ 64	≥ 128	≥ 128	2	1	≥ 64	≥ 2048	0,06
1077	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	8	0,125
1081	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	4	0,5	≥ 64	≥ 2048	0,25
1086	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	32	0,25
1087	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	16	0,25
1088	≤ 0,015	≤ 0,03	0,06	0,5	0,5	≥ 64	2	0,25
1089	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	8	0,125
1094	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	32	0,125
1114	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,25
1115	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	1	1	≥ 64	≤ 0,5	0,25
1116	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	4	0,125
1128	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	2	0,5	≥ 64	≥ 2048	0,125
1162	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	4	1	≥ 64	≥ 2048	0,125
1163	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	4	1	32	1024	0,06
1191	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	1	1	16	16	≤ 0,03
1250	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	32	0,06
1318	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	1	1	≥ 64	16	0,06
1319	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	2	0,125
1320	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,125
1321	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	32	0,25
1322	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	32	32	0,25
1323	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	4	1	≥ 64	≥ 2048	0,25
1324	≥ 64	≥ 128	≥ 128	0,5	1	≥ 64	4	0,125
1325	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	8	0,125
1326	≥ 64	≥ 128	≥ 128	≤ 0,25	1	≥ 64	1024	0,06
1327	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	4	0,25
1328	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,125
1508	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	16	0,125
1545	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	2	1	≥ 64	≥ 2048	0,06
1546	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	16	0,125
1858	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	32	0,125
1895	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	4	1	≥ 64	1024	0,25
1914	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,25	0,5	≥ 64	≤ 0,5	≤ 0,03
1941	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	64	0,06

Tab. 8.7: MHK-Ergebnisse (in µg/ml) der im Rahmen des BfT-GermVet getesteten Arcanobakterien auf NLV33 (Fortsetzung)

BfT-Nummer	Erythro- mycin	Clindamycin	Tilmicosin	Spectino- mycin	Florfenicol	Colistin	Sulf- methoxazol	Oxacillin/ Natrium
2035	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	2	0,25
2239	≤ 0,015	0,06	0,25	0,5	0,5	≥ 64	4	0,125
2412	≥ 64	≥ 128	2	1	1	≥ 64	≥ 2048	0,25
2413	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	4	0,25
2654	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	32	0,25
2655	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	16	0,125
2656	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	2	0,5	≥ 64	≥ 2048	0,06
2657	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	≥ 64	64	0,125
2658	≤ 0,015	≤ 0,03	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	16	0,125
2659	≥ 64	≥ 128	≥ 128	1	1	≥ 64	≥ 2048	0,06
2662	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	2	0,5	≥ 64	≥ 2048	0,125
2663	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	0,5	≥ 64	8	0,125
2664	≤ 0,015	0,06	≤ 0,03	0,5	1	32	512	0,125

Anhang

Tab. 8.8: Ergebnisse der durchgeführten Screening-PCRs für die jeweiligen Gene

Isolatnr.	Herkunft	<i>tet(W)</i>	<i>tet(33)</i>	<i>tet(Z)</i>	<i>tet(O)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(K)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(Q)</i>
0144-04	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
0264-03	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1229-03	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1269-03	Rind	-	-	-	-	-	-	-	-
1847-03	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1890-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1950-03	Rind	+	+	-	-	-	-	-	-
1954-03	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1959-03	Rind	+	+	-	-	-	-	-	-
1974-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
1982-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
1983-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
2023-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
2031-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
2349-03	Rind	+	+	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
2641-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
2649-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
2931-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
3809-03	unbekannt	-	-	-	-	-	-	-	-
3869-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
3922-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
3923-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
3968-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
4004-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
4039-03	Rind	+	-	-	-	-	-	-	-
4040-03	Rind	-	-	-	-	-	-	-	-
4075-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
4249-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4371-03	Rind	-	-	+	-	-	-	-	-
4390-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4399-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4783-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
4939-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
5009-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
5244-03	Schwein	-	-	-	-	-	-	-	-
5504-03	Rind	+	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Legende:

+: Isolat positiv in der durchgeführten Screening-PCR

-: Isolat negativ in der durchgeführten Screening-PCR

n. d.: Nicht durchgeführt

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich ganz herzlich bei **Prof. Märtlbauer** bedanken, der die Leitung dieser Arbeit übernommen und damit ihr Zustandekommen ermöglicht hat.

Christiane Werckenthin danke ich für die ausgezeichnete Betreuung in den letzten Jahren. Ohne Deine Ideen, Deinen ständigen Einsatz, sowohl bei der praktischen als auch bei der schriftlichen Arbeit, Deine Unterstützung bei jeglicher Art von Problemen und vor allem ohne die Geduld, die Du gegenüber meinen Macken aufgebracht hast, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem ein ganz großes Dankeschön an folgende Menschen:

Hilke Hubert: Dankeschön für den Berg von Arbeit, den Du mir abgenommen hast, für das viele Lachen, die umfassende Lebensmittelversorgung und nicht zuletzt dafür, dass Du, sei es bei privaten, sei es bei beruflichen Problemen, immer ein offenes Ohr hattest.

Mira Vodopija: Danke für die vielen, vielen Kleinigkeiten, die mir das Leben so sehr vereinfachten und für die gute Laune, die Du auch hattest, wenn Du eigentlich schlechter Laune warst.

Georg Wolf: Vielen lieben Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und für die Tipps beim Erstellen dieser Arbeit.

Iлона Moßbrugger: Danke für das unermüdliche Korrekturlesen, die aufmunternden Worte und die reichlich gespendeten Zigaretten.

Angelika Gerber, Elisabeth Kügele, Gudrun Matschke, Barbara Scholin und Gabi Platzer: Dankeschön für die Mithilfe beim Sammeln und Identifizieren der Isolate, die unterhaltsamen Kaffee- und Zigarettenpausen, sowie manch nettes Wort dazwischen.

Anke Schmidt: Vielen, vielen Dank für die vielen, vielen Liter und vielen, vielen Platten...

Gaby Hölzlwimmer: Danke, dass Du mir den Rücken frei gehalten, meine Launen ertragen, Dir die Nächte um die Ohren geschlagen und mir, wenn nötig, den richtigen „Tritt“ zum richtigen Zeitpunkt verpasst hast.

Meinen **Eltern, Geschwistern, Großeltern, Tante Dagmar, Onkel Milan, Tante Helga, Tanja und Markus** möchte ich dafür danken, dass sie mein ganzes Leben lang für mich da waren und sind. Insbesondere meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir, trotz z.T. „schlechter Prognose“, stets den Glauben an mich selbst vermittelt haben.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei **Prof. S. Schwarz**, der die Diskussion Korrektur gelesen hat und wichtige Hinweise gab.

Es gibt noch viele Menschen, die ich nicht namentlich genannt habe und die mir dennoch mit vielen Kleinigkeiten geholfen haben. All diesen Menschen sei ebenfalls ein herzliches Dankeschön ausgesprochen.

Dem **Bundesverband für Tiergesundheit e. V. (BfT)** danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 17. August 1977
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Wohnort: Carl-Orff-Bogen 160, 80939 München
Heimatort: Hauptstr. 53, 92431 Neunburg v. Wald

Ausbildungsdaten:

1984 - 1988 Grundschule Rain am Lech

1988 - 1997 Gymnasium Donauwörth, humanistischer Zweig
Abschluss 27. Juni 1997, Allgemeine Hochschulreife

1997 - 2003 Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität
Abschluss (LMU) München
17. September 2003, Tierärztin

Seit 1. Januar 2004 Promotionsarbeit an dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU
München