

Aus dem Institut
für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle

**Antibakterielle Resistenz bei
Yersinia enterocolitica Stämmen aus verschiedenen Quellen mittels
Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsverfahren**

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

von
Cornelia Sabine Meyer
aus Montevideo

München 2007

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Stolle

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Hoffmann

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amc	Amoxicillin/Clavulansäure
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
Aufl.	Auflage
Azt	Aztreonam
BAP	Blutagar-Platte
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAMHB	Kationenadjustierte Müller-Hinton-Bouillon
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
Chl	Chloramphenicol
Cip	Ciprofloxacin
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Col	Colistin
Ctx	Cefotaxim
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Eryt	Erythromycin
Gen	Gentamicin
HHD	Hemmhofdurchmesser
Hrsg.	Herausgeber
I	Intermediär
KBE	Kolonie bildende Einheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
MH-Agar	Müller-Hinton-Agar
MH-Bouillon	Müller-Hinton-Bouillon
MHK	minimale Hemm(stoff)konzentration
ml	Milliliter
MRL	Maximum residue limit
Msch	Mensch
MTP	Mikrotiterplatte
Na	Nalidixinsäure
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
R	Resistent
RKI	Robert-Koch-Institut
S	Sensibel

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Schw	Schwein
Sm	Streptomycin
sog.	sogenannte
Su	Sulfamethoxazol
SVA	Statens Veterinärmedicinska Anstalt
Sxt	Sulfamethoxazol/Trimethoprim
T	Trimethoprim
Te	Tetracyclin
v.a.	vor allem
VRE	Vancomycin-resistente <i>Enterococci</i>
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1 Definition antimikrobieller Wirkstoffe.....	2
2.2 Antimikrobielle Wirkstoffe in der Veterinärmedizin.....	3
2.2.1 Antimikrobielle Wirkstoffe für die orale Verabreichung bei Lebensmittel liefernden Tieren.....	5
2.2.2 Verbrauchsmengen antimikrobieller Wirkstoffe in der Veterinärmedizin.....	6
2.2.3 Besondere Risiken für die Resistenzselektion.....	7
2.2.4 Postantibiotischer Effekt.....	8
2.3 Geschichtliches zum Verbot der Leistungsförderer.....	9
2.4 Folgen des massiven Einsatzes antimikrobieller Wirkstoffe.....	11
2.5 Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe.....	13
2.5.1 Ursprung der Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe.....	13
2.5.2 Grundlagen der bakteriellen Resistenz.....	14
2.5.3 Resistenzmechanismen.....	18
2.5.4 Kreuz- und Coresistenz.....	21
2.5.5 Die Darmflora als Reservoir für Resistenzgene.....	22
2.6 Rückstandsproblematik.....	22
2.7 Verbreitung übertragbarer Antibiotikaresistenzen.....	25
2.7.1 Bedeutung der Lebensmittel bei der Verbreitung übertragbarer antibakterieller Resistenzen.....	27
2.7.2 Übertragung resistenter Lebensmittelinfektionserreger.....	28
2.8 <i>Yersinia enterocolitica</i>	31
2.8.1 Einteilung.....	32
2.8.2 Klinische Bedeutung: Yersiniose.....	32
2.8.3 Therapie.....	33
2.8.4 Epidemiologie.....	34
2.8.5 Empfindlichkeitstestung und bisher bekannte Resistenzen.....	36
2.9 <i>In-vitro</i> Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger.....	39
2.9.1 Methoden der <i>in-vitro</i> Empfindlichkeitsprüfung.....	39

2.9.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe.....	46
3. Material und Methoden.....	50
3.1 Material.....	50
3.1.1 Herkunft und Anzahl der Stämme.....	50
3.1.2 Qualitätskontrollstämmе.....	51
3.1.3 Antimikrobielle Wirkstoffe für die Agardiffusion.....	51
3.1.4 Layout der Mikrotiterplatte für die Bouillon-Mikrodilution.....	52
3.2 Methode.....	53
3.2.1 Methode zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 Bakterien/ml.....	53
3.3 Ergebnisse der Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 KBE/ml.....	56
3.3.1 Anzuchtbedingungen der Referenz- und der Bakterienstämme.....	57
3.3.2 Agardiffusionsmethode.....	57
3.3.3 Bouillon-Mikrodilutionsmethode.....	60
4. Ergebnisse.....	63
4.1 Ergebnisse der Resistenzbestimmung im Agardiffusionstest.....	63
4.2 Vergleich der mittels Agardiffusionsmethode ermittelten Ergebnisse der <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme humaner und porciner Herkunft.....	69
4.3 Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode.....	70
4.4 Vergleich der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode ermittelten Ergebnisse der <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme humaner und porciner Herkunft.....	73
4.5 Ergebnisse der Agardiffusion im Vergleich mit der Bouillon-Mikrodilution.....	74
5. Diskussion.....	79
6. Zusammenfassung.....	88
7. Summary.....	90
8. Literaturverzeichnis.....	92
9. Tabellenverzeichnis.....	106
10. Abbildungsverzeichnis.....	108
11. Anhang.....	109
10. Danksagung.....	119
11. Lebenslauf.....	120

1. EINLEITUNG

Der Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe 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. Jede Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe in diesen Gebieten birgt gewisse Risiken im Hinblick auf die mögliche Entstehung und Verbreitung resistenter Bakterien. Die selektierten, resistenten Keime können auf unterschiedlichen Wegen auf den Menschen übertragen werden. Mit dem 2006 in Kraft getretenen Verbot antibakterieller Leistungsförderer in der Mast wurde ein wichtiger Beitrag zum Schutz des Menschen geleistet. Dennoch sind antibakterielle Tierarzneimittel sowohl aus Gründen des Tierschutzes als auch zum Schutz des Menschen vor Zoonosen und zur Gewährleistung einwandfreier Qualität tierischer Lebensmittel unverzichtbar.

Vor allem das Vorkommen resistenter Lebensmittelinfektionserreger wie Salmonellen, *Campylobacter* und *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) können ein erhöhtes Gesundheitsrisiko für den Menschen darstellen. Während komplikationslos verlaufende Enteritiden in der Regel keiner Behandlung bedürfen, ist bei systemischen Erkrankungen eine antibakterielle Therapie erforderlich. In Deutschland tritt *Y. enterocolitica* nach *Campylobacter* und Salmonellen an dritter Stelle der Lebensmittelinfektionserreger auf. Die meisten *Y. enterocolitica*-Stämme, die bei humanen Gastroenteritiden isoliert werden, sind vom Bioserotyp 4/O:3. Dieser Bioserotyp kommt in Europa bei humanen Yersiniosen am häufigsten vor. Für menschliche Infektionen stellen symptomlos infizierte Schweine das wichtigste Erregerreservoir dar, wobei Schweinefleisch als wichtigste Kontaminationsquelle gilt.

Da in Deutschland bisher in nur einer Studie über das Resistenzverhalten von *Y. enterocolitica* berichtet wurde, befasste sich diese Untersuchung mit der Empfindlichkeitsbestimmung dieses Lebensmittelinfektionserregers. Besondere Bedeutung für die Durchführung und den Vergleich solcher Studien zeigt der Einsatz etablierter Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung, sowie die klinische Bewertung der im Labor erhobenen Daten anhand von Grenzwerten und damit die Festlegung welche Stämme als „resistent“ zu bezeichnen sind.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Definition antimikrobieller Wirkstoffe

Unter dem Begriff antimikrobielle Chemotherapeutika werden sowohl natürliche, halbsynthetische als auch synthetische Stoffe zusammengefasst, die Bakterien in ihrem Wachstum hemmen oder abtöten (TROLLDENIER und UNGEMACH 1999). Halbsynthetische und synthetische antimikrobielle Substanzen werden auch unter dem Begriff „Antiinfektiva“ zusammengefasst.

Als Antibiotika werden nur natürliche antibakterielle Wirkstoffe bezeichnet, die von verschiedenen Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen produziert werden und in der Lage sind, Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen oder diese abzutöten. Trotz der frühen Entdeckung des Penicillins 1929 durch Alexander Flemming wurde dieses erst in den 40er Jahren industriell gewonnen und therapeutisch genutzt (PERRETEN 2003). Weitere Beispiele für natürliche Antibiotika sind Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Macrolide.

Halbsynthetische Wirkstoffe sind Derivate von natürlichen Antibiotika, die durch Veränderungen der Strukturformeln hergestellt werden. So werden die Derivate z.B. säurefest gemacht, um dann für die orale Verabreichung geeignet zu sein. Beispiele für semi-synthetische Antibiotika sind Penicillinase-resistente Penicilline wie Nafcillin, Cloxacillin und Flucloxacillin (EMEA 1999).

Synthetische Antiinfektiva werden chemisch hergestellt. Paul Ehrlich untersuchte Anfang des 20. Jahrhunderts die Wirkung von Farbstoffen auf Bakterien. Vor der Einführung der Penicilline waren die Sulfonamide die wichtigsten Wirkstoffe zur Behandlung bakterieller Infektionen. Entdeckt wurde die Wirkung 1932 von Domagk, der die Wirksamkeit des Azofarbstoffes Prontosil (strukturell verwandt mit Sulfanilamid) gegen experimentelle Kokkeninfektion zeigte (KROKER et al. 2002). Daraufhin wurden weitere Sulfonamide entwickelt, die auch heute noch eine wichtige Rolle in der Behandlung von Infektionskrankheiten spielen. Nitrofurane und (Fluor)Chinolone sind ebenfalls Beispiele für synthetische Antiinfektiva (EMEA 1999).

2.2 Antimikrobielle Wirkstoffe in der Veterinärmedizin

Der medizinische Einsatz antibakterieller Wirkstoffe findet in der Veterinärmedizin Anwendung in der Therapie, Metaphylaxe und Prophylaxe (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). Die **therapeutische** Anwendung antibakterieller Substanzen dient der gezielten Behandlung bestehender, durch bakterielle Erreger bedingter Infektionskrankheiten (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001).

Die **metaphylaktische** Anwendung erfolgt ebenfalls an ganzen Tiergruppen, jedoch zu einem Zeitpunkt, an dem einzelne Tiere des Bestandes bereits Krankheitssymptome zeigen und zu erwarten ist, dass in kürzester Zeit weitere Tiere des Bestandes erkranken werden (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Diese Art der Anwendung wird praktiziert um die klinisch betroffenen Tiere zu therapieren, die Ausbreitung der Krankheit zu minimieren und um einem Auftreten klinischer Symptome bei den restlichen Tieren vorzubeugen.

Eine **prophylaktische** Anwendung erfolgt als präventive Maßnahme – also zu einem Zeitpunkt an dem noch keine klinischen Symptome aufgetreten sind – am einzelnen Tier (z.B. perioperativ oder beim „Trockenstellen“ von Milchkühen gegen Laktationsende) oder im Rahmen der Tierproduktion bei ganzen Tiergruppen in Form der „Einstallprophylaxe“ (SCHWARZ et al. 2001). Hierfür werden die Tiere über einen definierten Zeitraum mit mäßig bis hohen Dosierungen antimikrobiell behandelt (BARTON 2000). Diese Art des chemotherapeutischen Einsatzes wird für eine Selektion resistenter Bakterien und der Förderung der Verbreitung von Resistenzgenen verantwortlich gemacht (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Chemotherapeutika besteht in ihrem nicht medizinischen Einsatz als sogenannte **Leistungsförderer**. Positive Effekte der Leistungsförderer sind neben einer Wachstumssteigerung, eine Kontrolle über chronische Krankheiten sowie eine verminderte Phosphat- und Stickstoffausscheidung mit der Gülle (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 1999). Bei dieser Art der Anwendung werden die antibakteriell wirkenden Substanzen für die gesamte Herde über einen längeren Zeitraum in

subtherapeutischen Dosierungen über das Futter oder das Trinkwasser verabreicht (BARTON 2000). Diese Art der Applikation fördert die Selektion und Vermehrung resistenter Erreger (TEUBER 1999).

Tabelle 1: In Deutschland für die orale Verabreichung zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe bei Lebensmittel liefernden Tieren (mod. nach EMEA 1999)

Antimikrobielle Wirkstoffe	Tierart
β-Laktam	
Penicillin G	S/G
Ampicillin	R/S/G
Amoxicillin	R/S
Amoxicillin/Clavulansäure	R
Aminoglykoside	
Neomycin	R/S/G
Gentamicin	R
Apramycin	S
Spectinomycin	S/G
Tetracycline	
Oxytetracyclin	R/S/G
Chlortetracyclin	R/S/G
Tetracyclin	R/S/G
Lincosamide	
Lincomycin	S/G
Makrolide	
Tylosin	R/S/G
Erythromycin	R/G
Tilmicosin	R/S/G
Tiamulin	S/G
Valnemulin	S
Polypeptide	
Colistin	R/S/G
Trimethoprim	R/S
Trimethoprim+ Sulfonamide	R/S/G
Sulfonamide	R/S/G
Fluorchinolone	
Enrofloxacin	R/S/G
Marbofloxacin	R
Difloxacin	G

R= Rind, S= Schwein, G= Geflügel

2.2.1 Antimikrobielle Wirkstoffe für die orale Verabreichung bei Lebensmittel liefernden Tieren

In Tabelle 1 sind die wichtigsten antimikrobiellen Wirkstoffe dargestellt, die in Deutschland zur oralen Verabreichung bei Rindern, Schweinen und/oder Geflügel zugelassen sind. Die Daten beruhen hauptsächlich auf Angaben der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA 1999); sie wurden zusätzlich bei VETIDATA (2007) überprüft bzw. ergänzt. Von einigen Ausnahmen abgesehen, kommen die gleichen bzw. ähnliche Wirkstoffe in der Humanmedizin zum Einsatz. Aus der Tabelle kann man entnehmen, dass für Schweine 19 von 24 Substanzen für die orale Applikation zugelassen sind. Wie unter Kapitel 2.2 beschrieben, stellt die Verabreichung von Fütterungsarzneimitteln eine erhöhte Gefahr für die Entstehung und Vermehrung resistenter Bakterien dar. Im Gegensatz zu den in Tabelle 1 aufgelisteten Chemotherapeutika, sind in Tabelle 2 nur die in der Tiermedizin zugelassenen antimikrobiellen Wirkstoffe dargestellt.

Tabelle 2: Nur in der Veterinärmedizin zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe sowie ihre Zugehörigkeit zu einer Wirkstoffgruppe (Quelle: mod. nach UNGEMACH 1999)

Antimikrobielle Wirkstoffe	Wirkstoffgruppe
Ceftiofur	Cephlosporin 4. Generation
Cefquinom	Cephlosporin 4. Generation
Florfenicol	Amphenicol
Enrofloxacin	Fluorchinolon
Danofloxacin	Fluorchinolon
Marbofloxacin	Fluorchinolon
Difloxacin	Fluorchinolon
Tylosin	Makrolid
Tilmicosin	Makrolid
Lincomycin	Lincosamid
Tiamulin	Pleuromutilin
Valnemulin	Pleuromutilin

2.2.2 Verbrauchsmengen antimikrobieller Wirkstoffe in der Veterinärmedizin

Antibiotika besitzen mit 31% den höchsten Marktanteil der Tierarzneimittel in Deutschland (N.N. 2005). Tabelle 3 zeigt den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in Deutschland in der Veterinärmedizin für die Jahre 2003 und 2005. Die Gesamtmenge an Chemotherapeutika für das Jahr 2005 ergab 784,4 Tonnen (t) im Vergleich zum Jahr 2003 mit 724,2 t. Diese im Vergleich zu anderen Wirkstoffmengen große Gesamtmenge erklärt sich durch die notwendigen wirksamen Dosen und die sehr großen Tierzahlen, die in Deutschland bestehen. Die höchsten Einsatzmengen sind bei Tetracyclinen zu verzeichnen, gefolgt von β -Laktamen, Sulfonamiden und Aminoglykosiden. Im Gegensatz dazu wurden Chinolone, Phenicolle und Pleuromutiline in geringen Mengen eingesetzt. Im Jahr 2005 wurden 35 t weniger an Tetracyclinen eingesetzt als zwei Jahre zuvor. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre das Auslaufen von Zulassungen mehrerer niedrigpreisiger oraler Tetracyclin-Produkte in dieser Zeit. Bei den β -Laktamen wurde dagegen ein deutlicher Anstieg um 44 t verzeichnet. Hier hat mit großer Wahrscheinlichkeit der Preisabfall bei Amoxicillinen zum vermehrten Einsatz dieser Gruppe beigetragen (N.N. 2005).

Tabelle 3: Veterinärmedizinischer Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in Deutschland (Angaben in Tonnen, N.N. 2005)

Antimikrobielle Wirkstoffe	2003	2005
Aminoglykoside	27,3	36,3
β-Laktame	155,2	199,2
Chinolone	3,5	3,7
Lincosamide	7,5	12,1
Makrolide	38,6	52,6
Phenicolle	4,7	4,8
Pleuromutiline	6,8	6,4
Polypeptide	23,4	21,8
Sulfonamide	71,7	97,5
Tetracycline	385,5	350,0
Gesamt	724,2	784,4

In Tabelle 4 sind die Einsatzmengen antimikrobieller Wirkstoffe in unterschiedlichen Ländern der Europäischen Union (EU) dargestellt. Zum besseren Verständnis sei gesagt, dass von insgesamt 240,0 Millionen Schweinen die in Europa produziert werden mit circa 42 Millionen der größte Teil aus Deutschland stammt, gefolgt von Spanien, Frankreich, Dänemark und den Niederlanden. In der Geflügelfleischproduktion ist Frankreich Europas größter Einzelproduzent, gefolgt von Großbritannien, Spanien und Deutschland. Die Zahlen stammen aus unterschiedlichen Erhebungsjahren und sind nicht unmittelbar vergleichbar; dennoch kann man sagen, dass die Verabreichung von Tetracyclinen in allen europäischen Ländern ein wichtiger Bestandteil der antibakteriellen Therapie ist. Sie beträgt ungefähr 50% der gesamten eingesetzten Menge.

Tabelle 4: Veterinärmedizinischer Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in unterschiedlichen EU-Staaten (Angaben in t, nach N.N. 2005)

Antimikrobielle Wirkstoffe	UK (2004)	F (2003)	NL (2004)	DK (2005)	D (2005)
Aminoglykoside	22	79,1	9	8,5	36,3
β-Laktame	63	119,4	45	23,6	199,2
Chinolone	1	20,1	7	0,5	3,7
Makrolide	59	102,1	24	10,9	52,6
Tetracycline	243	609,4	269	27,5	350,0
Sulfonamide bzw. Trimethoprim/Sulf.	77	240,5	93	8,5	97,5
Andere	11	90,4	6	34,5	45,1
Gesamt	476	1261	453	114	784,4

UK= Großbritannien, F= Frankreich, NL= Niederlande, DK= Dänemark, D= Deutschland

2.2.3 Besondere Risiken für die Resistenzselektion

In der Veterinär- und Humanmedizin kommen die gleichen Wirkstoffgruppen antimikrobieller Arzneimittel zum Einsatz, wobei in der Tiermedizin meistens aus Kostengründen ältere Substanzen bevorzugt werden (UNGEMACH 1999). Die individuelle Verabreichung von Wirkstoffen ist bei der Behandlung von ganzen Tierbeständen aufgrund der hohen Tierzahlen nicht durchführbar. Daher stellt die Therapie des ganzen Bestandes durch Verabreichung der Wirkstoffe in Form von Fütterungsarzneimitteln oder über das Trinkwasser eine unverzichtbare

Behandlungsart dar (UNGEMACH 1999, SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Die orale Verabreichung antimikrobieller Arzneimittel übt einen höheren Selektionsdruck auf die Mikroflora des Darmes aus als die Applikation mittels Injektion und führt somit zur Selektion von resistenten Bakterien (PERRETEN 2003). Außerdem stellen Fütterungsarzneimittel ein erhöhtes Risiko der Resistenzselektion dar, da häufig mehrere Tiere des Bestandes mit nicht ausreichend hohen Wirkstoffkonzentrationen versorgt werden (UNGEMACH 1999). Mögliche Ursachen für Unterdosierungen von Fütterungsarzneimitteln können z.B. inhomogene Vermischung, Entmischung, Zersetzung, Inkompatibilitäten mit Futterbestandteilen oder mit verschiedenen Vormischungen, reduzierte Bioverfügbarkeit sowie eine verringerte Futteraufnahme z.B. bei kranken, geschwächten oder rangniederen Tieren sein (UNGEMACH 1999). Dennoch sind ordnungsgemäß hergestellte und dosierte Fütterungsarzneimittel bei den heutigen Haltungsformen unverzichtbare Darreichungsformen (UNGEMACH 1999).

2.2.4 Postantibiotischer Effekt

Die Wirkung von antibakteriellen Substanzen kann länger anhalten als sie verabreicht werden. Die "normale" antibakterielle Therapie wird mit Konzentrationen durchgeführt, die mindestens dem minimalen Wirkungslevel entsprechen oder sogar darüber liegen. Nach oder während der Therapie kommt es aufgrund der Halbwertszeit in den einzelnen Kompartimenten des Körpers und in den Ausscheidungen zum Absinken der Konzentration unter den inhibitorisch wirksamen Level. Nach Absinken des Wirkspiegels unter die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) des Erregers kann ein Anhalten der Wirksamkeit nachgewiesen werden (WERCKENTHIN 2004). Dieser postantibiotische Effekt kann auch nach Entfernen des Chemotherapeutikums noch eine hemmende Wirkung auf Bakterien ausüben. Bedingung für diesen Effekt ist die Verabreichung suprainhibitorischer Konzentrationen (ODENHOLT-TORNQVIST et al. 1991). In den "Ausscheidungen" ist die subinhibitorische Konzentration für eine Bakterienhemmung nicht ausreichend, hier besteht eher die Gefahr der Resistenzbildung bzw. des Resistenzgen-Transfers (HÖLZEL 2006).

2.3 Geschichtliches zum Verbot der Leistungsförderer

Der wachstumsfördernde Effekt antimikrobieller Substanzen wurde das erste Mal in den späten 40er Jahren bei Hühnern beobachtet. STOKSTAD et al. (1949) fanden heraus, dass Hühner denen Tetracycline über das Futter verabreicht wurden, ein schnelleres Wachstum als die Kontrollgruppe zeigten. Seitdem konnte dieser Effekt bei einer weiteren Anzahl von antimikrobiellen Wirkstoffen nachgewiesen werden (BARTON 2000).

In den 50er und 60er Jahren wurden Antibiotika, wie Penicillin und Tetracyclin, zusätzlich zur therapeutischen Anwendung in vielen Ländern in subtherapeutischen Dosierungen als Leistungsförderer verwendet (EMEA 1999). In den 60er Jahren entstanden immer mehr Bedenken über die Zunahme resistenter Bakterien gegen antimikrobielle Substanzen. Das Auftreten multipler Resistenzen bei unterschiedlichen Bakterien (*S. Typhimurium* DT104, *Enterococcus*-Stämme) führte in Großbritannien zur Gründung des „Swann Committee“. In seinem Bericht für die englische Regierung hat das „Swann Committee“ 1969 bekannt gegeben, dass die Verabreichung von Antibiotika, vor allem in subtherapeutischen Dosierungen, verschiedene Gefahren für die Gesundheit von Mensch und Tier darstellt (EMEA 1999). Das Komitee kam zu dem Entschluss, dass diese Gefahren weitgehend vermieden werden müssten und empfahl 1969, dass antimikrobielle Wirkstoffe, die zur Therapie beim Menschen eingesetzt werden oder Kreuzresistenzen zu den in der Humanmedizin verwendeten Chemotherapeutika hervorrufen können, nicht als Leistungsförderer verwendet werden dürfen (PERRETEN 2003). Daraufhin etablierte sich in der EU das Prinzip, unterschiedliche Chemotherapeutika in der Therapie und der Leistungsförderung zu verwenden. Schließlich wurden Penicillin, Streptomycin und Tetracycline nur noch für therapeutische Zwecke zugelassen (PERRETEN 2003).

Dennoch waren bis vor 10 Jahren noch 11 antimikrobielle Substanzen als Leistungsförderer zugelassen: Avoparcin, Bacitracin, Flavomycin, Spiramycin, Tylosin, Virginiamycin, Carbadox, Olaquinox, Monensin, Salinomycin und Avilamycin (PERRETEN 2003). Avoparcin gehört wie Vancomycin zur Gruppe der Glykopeptide und wurde über 20 Jahre lang als Leistungsförderer eingesetzt,

während zur gleichen Zeit Vancomycin in der Humanmedizin als Reserveantibiotikum für Infektionen, die durch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) hervorgerufen werden, verwendet wurde (PERRETEN 2003). Im Sinne des Verbraucherschutzes, um eine Verbreitung der Vancomycinresistenzen zu verhindern, wurde im Mai 1995 in Dänemark, im Januar 1996 in Deutschland und im Dezember 1996 in der gesamten EU die Anwendung von Avoparcin als Leistungsförderer verboten (BARTON 2000, PERRETEN 2003). Zum 1. Juli 1999 wurden des Weiteren die Makrolid-Antibiotika Tylosin und Spiramycin, das Streptogramin-Antibiotikum Virginiamycin und das Polypeptid-Antibiotikum Zink-Bacitracin als Leistungsförderer verboten (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Gründe für den Widerruf der Zulassung waren aufgetretene Kreuzresistenzen bei den therapeutisch genutzten Glykopeptiden (Vancomycin), Makroliden (Erythromycin, Clarithromycin) und Streptograminen (Dalfo-/Quinupristin). Bei Zink-Bacitracin gab es Bedenken hinsichtlich des Erhalts dieser Substanz als Therapeutikum in der Humanmedizin. Zum 31. August 1999 wurden die Chinoxaline Olaquinox und Carbadox auf Grund toxikologischer Bedenken als Futtermittelzusatzstoffe in der EU verboten. Somit waren Ende 1999 noch folgende vier antimikrobielle Wirkstoffe als Leistungsförderer zugelassen: Avilamycin, Flavophospholipol, Monensin und Salinomycin. Im März 2002 erfolgte schließlich von der Europäischen Kommission (EU-Kommission) der Vorschlag, auch diese verbliebenen antimikrobiellen Wirkstoffe aus dem Verkehr zu ziehen. SCHWARZ und WERCKENTHIN (2001) sowie PERRETEN (2003) haben diese Entwicklung ausführlich dargestellt. Seit dem 1. Januar 2006 gilt innerhalb der EU ein generelles Anwendungsverbot für antimikrobielle Wirkstoffe als Leistungsförderer bei landwirtschaftlichen Nutztieren (N.N. 2007a). Durch dieses Verbot wurde ein wichtiger Beitrag zum Schutz des Menschen geleistet.

In Tabelle 5 sind die seit 1996 innerhalb der EU als Leistungsförderer zugelassen antimikrobiellen Substanzen mit den dazugehörigen Wirkstoffgruppen aufgelistet. Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass mit 7 von 11 Leistungsförderern die meisten in der Schweineproduktion eingesetzt wurden, gefolgt von 6 Wirkstoffen, die in der Geflügelproduktion Verwendung fanden. Bei Rindern erfolgte mit nur 2 Leistungsförderern der niedrigste Einsatz.

Tabelle 5: Als Leistungsförderer in der EU zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe (mod. nach Barton 2000)

Wirkstoffgruppe	Antimikrobielle Wirkstoffe	Tierarten	Anwendungsverbot
Glykopeptide	Avoparcin	G	Dezember 1996
Makrolide	Tylosin	S	Juli 1999
Makrolide	Spiramycin	S/G	Juli 1999
Polypeptide	Bacitracin	G	Juli 1999
Chinoxaline	Carbadox	S	August 1999
Chinoxaline	Olaquinox	S	August 1999
Streptogramine	Virginiamycin	S/G	Juli 1999
Oligosaccharide	Avilamycin	S/G	Januar 2006
Polyether (Ionophore)	Monensin	R	Januar 2006
Polyether (Ionophore)	Salinomycin	S	Januar 2006
Bambermycine	Flavophospholipol	R/S/G	Januar 2006

R= Rind, S= Schwein, G= Geflügel

2.4 Folgen des massiven Einsatzes antimikrobieller Wirkstoffe

Die moderne Ära der Chemotherapie von Infektionen fand 1936 mit dem klinischen Einsatz von Sulphanilamiden beim Menschen ihren Anfang. Die antibakterielle Therapie begann 1941 mit der Herstellung von Benzylpenicillin, es folgte die Entwicklung von Streptomycin (1944), Chloramphenicol (1947), Chlortetracycline (1948), halbsynthetische Penicilline (ab 1958), Cephalosporine (60er Jahre) und Fluorchinolone (80er Jahre) (EMEA 1999). Seit den 50er Jahren und parallel zur Entwicklung von Chemotherapeutika zur Kontrolle von Krankheiten beim Menschen, hat die tierärztliche Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe zu einer Verbesserung der Tiergesundheit und der artgerechten Haltung bei landwirtschaftlichen Nutztieren und bei Haustieren geführt. Mit dem vermehrten Einsatz antibakterieller Substanzen traten aber auch Probleme in Form von resistenten Bakterien auf. Jeder Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen bei Tier und Mensch birgt das Risiko der Entstehung resistenter Erreger (UNGEMACH 1999, SCHWARZ et al. 2001). Dieses Risiko ist nicht völlig eliminierbar, es lässt sich aber durch einen verantwortungsvollen Umgang mit antimikrobiellen Wirkstoffen minimieren (SCHWARZ et al. 2001). In der EU wurden über einen langen Zeitraum antimikrobielle Wirkstoffe als Leistungsförderer verwendet, deren gleiche Wirkstoffgruppen in der Humanmedizin Anwendung fanden (PERRETEN 2003). Da antibiotikaresistente Bakterien tierischen Ursprungs

auftraten, die Kreuzresistenzen mit Chemotherapeutika aus der Humanmedizin aufwiesen, wurden später nur noch antimikrobielle Wirkstoffe als Leistungsförderer zugelassen, die nicht in der Humanmedizin Anwendung fanden (PERRETEN 2003). In Tabelle 6 sind einige antimikrobielle Wirkstoffe, ihre Entdeckung und Beginn des klinischen Einsatzes sowie das Auftreten erster resistenter Bakterien dargestellt. Aus der Tabelle kann man erkennen, dass das Auftreten bakterieller Resistenzen in unterschiedlichen Zeiträumen nach dem Beginn des klinischen Einsatzes erfolgte. Die meisten Resistenzen traten etwa 3 bis 4 Jahre nach dem Beginn der medizinischen Anwendung auf, bei Vancomycin wurden erst 15 Jahre nach dem klinischen Einsatz antibakterielle Resistenzen festgestellt. Dagegen wurden bei Penicillin und Streptomycin bereits im gleichen Jahr Unempfindlichkeiten entdeckt.

Tabelle 6: Zeitintervalle zwischen der Entdeckung antimikrobieller Wirkstoffe, dem Beginn ihres klinischen Einsatzes und Auftreten erster Resistenzen (nach EMEA 1999)

Chemotherapeutikum	Entdeckung	Klinischer Einsatz	Erste Resistenzen
Penicillin	1940	1943	1940
Streptomycin	1944	1947	1947, 1956
Tetracyclin	1948	1952	1956
Erythromycin	1952	1955	1956
Vancomycin	1956	1972	1987
Nalidixinsäure	1960	1962	1966
Gentamicin	1963	1967	1970
Fluorchinolone	1978	1982	1985

Das Auftreten resistenter Bakterien stellt ein allgemeines Gesundheitsproblem dar. Resistente pathogene Bakterien wie Methicillin-resistente *S. aureus* oder Vancomycin-resistente β -Laktamase bildende *Enterococcus spp.* nehmen in der Prävalenz zu (PÉREZ-TRALLERO und ZIGORRAGA 1995). Eine Ursache für das Auftreten antibakterieller Resistenzen stellt der übermäßige Verbrauch von antimikrobiellen Substanzen dar. Vor allem in der Humanmedizin führen orale Verabreichungen, falsche Verschreibungen von Chemotherapeutika (z.B. bei viralen Infektionen), Unterdosierungen und die Anwendung von Breitspektrum-antibakteriellen Wirkstoffen zu vermehrten Problemen (PÉREZ-TRALLERO und ZIGORRAGA 1995). Aber auch in der Veterinärmedizin hat der hohe Verbrauch von antibakteriellen Substanzen, vor allem im Rahmen ihrer Anwendung als

Leistungsförderer, zu einem Anstieg von pathogenen Bakterien geführt (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000).

2.5 Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe

2.5.1 Ursprung der Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe

Es ist anzunehmen, dass ein Teil der Resistenzmechanismen bereits vor dem klinischen Einsatz von Chemotherapeutika existierte. Dennoch hat der intensive Einsatz antibiotischer Wirkstoffe und der damit verbundene Selektionsdruck die Entwicklung und Verbreitung unabsichtlich beschleunigt (McDERMOTT et al. 2003).

Antibiotika werden seit über 60 Jahren verwendet. Während dieser Zeit wurde ein riesiger Selektionsdruck auf bakterielle Ökosysteme bei Menschen und Tieren ausgeübt. Dies hat zum Auftreten resistenter Bakterien geführt. In Betrachtung der Geschichte antimikrobieller Wirkstoffe ist die Entwicklung bakterieller Resistenzen ein erwartetes aber unberechenbares Phänomen. Da Bakterien seit jeher der Konfrontation mit antimikrobiellen Substanzen ausgesetzt sind, liegen die Ursprünge der bakteriellen Unempfindlichkeit in einer Zeit lange vor der klinischen Anwendung von Chemotherapeutika in Human- oder Veterinärmedizin (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Immer wenn Chemotherapeutika angewendet werden, werden Bakterien unvermeidlich Resistenzen entwickeln, entweder durch Mutation oder durch Genübertragung oder durch beides. Für die Entstehung bakterieller Resistenzen werden grundsätzlich zwei Wege als wahrscheinlich angenommen. So können Resistenzgene entweder nach schrittweiser chromosomaler Mutation verändert werden oder sie können nach Integration in mobile genetische Elemente über horizontale Gentransferprozesse in andere Mikroorganismen gelangen (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000).

2.5.2 Grundlagen der bakteriellen Resistenz

Resistenz ist eine Eigenschaft von Mikroorganismen, gegen eine am Infektionsort erreichbare Chemotherapeutikakonzentration unempfindlich zu sein und ihren Stoffwechsel fortzusetzen (TROLLDENIER 1999). SCHWARZ und KEHRENBURG (2000) definieren den Begriff „Resistenz“ als eine graduell variierende Unempfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen; dabei ist der Grad der Unempfindlichkeit als MHK messbar.

Mikrobiologische Resistenz:

Aus mikrobiologischer Sicht sind resistente Organismen jene, die irgendeine Art von Resistenzmechanismus oder Resistenzgen besitzen. Dieser Begriff kann quantitativ in „mäßig resistent“ oder „hoch resistent“ eingeteilt werden. Die MHK eines antimikrobiellen Wirkstoffes liefert quantitative Information über die bakterielle Empfindlichkeit. Ein Organismus wird normalerweise als sensibel eingestuft, wenn seine MHK unterhalb des Grenzwertes („breakpoint“) liegt (EMEA 1999). Als Grenzwerte werden die Wirkstoffkonzentrationen definiert, die eine Erregereinteilung in die Kategorien „empfindlich“, „intermediär“ oder „resistent“ ermöglichen. Grenzwerte sind nicht direkt messbar sondern werden aus Ergebnissen aufwändiger Untersuchungen abgeleitet.

Klinische Resistenz:

Aus klinischer Sicht hängt die Klassifizierung der Bakterien in die Kategorien „empfindlich“ oder „resistent“ davon ab, ob die Infektion mit einem Erreger auf eine Behandlung anspricht oder nicht. Obwohl eine Empfindlichkeitsprüfung für eine gezielte Therapie unerlässlich ist, spiegelt die MHK eines spezifischen Erregers die antibakterielle Aktivität des Chemotherapeutikums unter klinischen Bedingungen nicht hundertprozentig wieder. Das heißt, die Empfindlichkeitsbestimmung wird *in-vitro* unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, die den Bedingungen *in-vivo* am Infektionsort nicht gleich sind (EMEA 1999).

Grundsätzlich kann man zwischen intrinsischen (natürlichen) und erworbenen Resistenzeigenschaften unterscheiden. Die **intrinsische** Resistenz ist für

Bakterienarten charakteristisch, die homogen resistent zu einem bestimmten Chemotherapeutikum sind, weil ihnen der Zellmechanismus fehlt, bei dem das Chemotherapeutikum seine Wirkung entfaltet, oder weil die Zellwand für das Antibiotikum undurchlässig ist (EMEA 1999). Dies tritt gewöhnlich bei gramnegativen Bakterien auf, so sind z.B. Yersinien natürlich resistent gegenüber Ampicillin, Cephalothin, Carbenicillin und Penicillin (BOTTONNE 1997). **Erworbene** Resistenz beruht entweder auf einer chromosomalen Mutation oder auf dem Erwerb von Resistenzgenen, die häufig auf mobilen DNA-Elementen wie z.B. Plasmiden lokalisiert sind und somit horizontal auf andere Bakterien übertragen werden können. Resistenzgene können bei jeder pathogenen Bakterienart und bei Kommensalen von Tier und Mensch vorkommen. Allerdings variiert die Prävalenz erheblich innerhalb der Bakterienarten und auch innerhalb der Subspezies. So fehlt den grampositiven Bakterien, mit Ausnahme der Staphylokokken und der Enterokokken, häufig die Fähigkeit, Plasmide die Resistenzgene enthalten, aufzunehmen (EMEA 1999).

Als Folge der Resistenzbildung können Resistenzen gegenüber einzelnen Wirkstoffen oder Vertretern der gleichen Wirkstoffklasse (z.B. bestimmte β -Laktamantibiotika, Tetracycline oder Aminoglykoside), gegenüber Vertretern unterschiedlicher Wirkstoffklassen, die aber die gleiche bakterielle Angriffsstelle besitzen (z.B. Makrolide, Lincosamide und B-Komponenten der Streptogramine) oder aber gegenüber strukturell und funktionell verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000) entstehen.

2.5.2.1 Chromosomale Resistenz

Diese Art der Resistenz entsteht durch Mutation der Nukleotidsequenz der bakteriellen Chromosomen. Resistenzen, die aufgrund von Mutationen entstehen, sind meistens spezifisch gegenüber dem ausgewählten antimikrobiellen Wirkstoff oder gegenüber eng verwandten antimikrobiellen Substanzen (EMEA 1999, SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Chromosomale Resistenz wird nur vertikal übertragen. Das bedeutet, dass die Resistenzeigenschaft bei der Zellteilung an die Tochterzellen vererbt wird, aber nicht auf andere Bakterien übertragen werden kann (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Diese Form der Resistenz entsteht *in-vivo*

seltener als *in-vitro*. Dies hängt eventuell damit zusammen, dass bei vorliegender chromosomaler Resistenz häufig bestimmte Zelleigenschaften verändert werden. Dies kann wiederum nachteilig für das Bakterium sein (EMEA 1999). Im Allgemeinen nimmt die Anzahl der auf diese Weise entstandenen resistenten Bakterien, nachdem sie dem Wirkstoff nicht mehr ausgesetzt sind, ab (EMEA 1999). Aus diesem Grund wird diese Resistenzform von den meisten Wissenschaftlern als die weniger gefährliche angesehen (EMEA 1999).

2.5.2.2 Extrachromosomale Resistenz

Bakterien besitzen sehr effiziente Gentransfersysteme, die im Stande sind Resistenzgene zu akkumulieren oder auszutauschen. Bestimmte Resistenzgene können sich zwischen den chromosomalen und extrachromosomalen DNA-Elementen bewegen. Diese Übertragung von Resistenzgenen kann innerhalb einer Bakterienart, zwischen verschiedenen Bakterienarten sowie auch zwischen unterschiedlichen Bakteriengattungen erfolgen (EMEA 1999). Für die Übertragung von Resistenzgenen bei Bakterien sind Plasmide, Transposons und Integrons die wichtigsten mobilen DNA-Elemente (EMEA 1999).

Plasmide:

Plasmide sind extrachromosomal gelegene, zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die Resistenzgene enthalten können. Sie können sich unabhängig der chromosomalen DNA replizieren und werden sowohl vertikal als auch horizontal übertragen (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Mehrere Plasmide können in einer Bakterienzelle vorhanden sein und können für bis zu zehn unterschiedliche antimikrobielle Resistenzgene kodieren (EMEA 1999).

Transposons:

Transposons ("springende Gene") sind kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte die sich in Plasmiden, zwischen Plasmiden und Chromosomen oder zwischen Plasmiden und Bakteriophagen bewegen können. Transposons können sich im Gegensatz zu Plasmiden nicht unabhängig vermehren, sie benötigen vielmehr ein funktionsfähiges Vektormolekül, z.B. ein Plasmid, in das sie integrieren (SCHWARZ

und KEHRENBURG 2000). Transposons besitzen Resistenzgene gegen antimikrobielle Wirkstoffe (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). Des Weiteren sind sie in der Lage innerhalb des bakteriellen Genoms einen Ortswechsel durchzuführen, welcher als Transposition bezeichnet wird (SMITH 2007). Durch die Transposition ist es möglich, transposonlokalisierte Resistenzgene innerhalb des bakteriellen Genoms von einem Ort zu einem anderen zu verlagern, z.B. aus der chromosomalen DNA in ein Plasmid oder umgekehrt (KEHRENBURG 2002). Transposons, die fähig sind, sich von einem Bakterium zum anderen bewegen zu können, ohne Vektoren zu nutzen, werden konjugative Transposons genannt. Bei gramnegativen Bakterien kommen ausschließlich nicht-konjugative Transposons vor. Diese können nur horizontal übertragen werden, wenn sie in einem Plasmid integriert worden sind. Bei grampositiven Bakterien dagegen kommen sowohl konjugative als auch nicht-konjugative Transposons vor (EMEA 1999).

Genkassetten:

Genkassetten stellen kleine mobile Elemente dar, die normalerweise aus lediglich einem Gen, meist einem Antibiotikaresistenzgen, und einer spezifischen Rekombinationsstelle aufgebaut sind (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Ihnen fehlt sowohl ein eigenes Replikationssystem als auch ein Transpositionssystem (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). Genkassetten liegen meist an einer spezifischen Stelle integriert vor, diese Stelle wird als Integron bezeichnet (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Ihre Mobilität basiert auf ortsspezifischen Rekombinationsprozessen, die von einer Integrase des jeweiligen Empfänger-integrans katalysiert werden. Häufig fungieren Transposons als Integrons, die dann eine oder mehrere Genkassetten tragen (Kehrenberg 2002).

2.5.2.3 Mechanismen der Genübertragung zwischen Bakterien

Der Transfer von mobilen Elementen erfolgt bei den meisten Bakterien *in-vivo* entweder in Form einer Transduktion oder Konjugation (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000); eine dritte Möglichkeit ist die der Transformation.

Die **Transduktion** ist die Übertragung von DNA mittels Bakteriophagen. Diese Form der Übertragung ist bei verschiedenen Bakterien bekannt. Durch das enge Wirtsspektrum der Bakteriophagen und aufgrund ihrer Genomgröße ist die Übertragung relativ begrenzt (WERCKENTHIN 2004). Die **Konjugation** ist der eigenständige Transfer eines selbstübertragbaren (konjugativen) Plasmides oder Transposons aus einer Spenderzelle in eine Empfängerzelle, wobei eine Kopie des betreffenden resistenzvermittelnden Elementes in der Spenderzelle verbleibt und eine weitere Kopie in die Empfängerzelle gelangt (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Außer bei einigen Bakterien wie den *Streptococcus*- oder *Bacillus*-Arten, spielt die **Transformation** meistens nur *in-vitro* eine Rolle. Dabei wird die extrazellulär gelegene DNA von Bakterienzellen aufgenommen (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000).

2.5.3 Resistenzmechanismen

Mit der Zeit haben Bakterien zahlreiche Wege entwickelt, um sich dem Einfluss antimikrobieller Wirkstoffe zu entziehen. Resistenzmechanismen lassen sich in drei Hauptgruppen unterscheiden:

Enzymatische Inaktivierung antibakterieller Wirkstoffe:

Bakterien produzieren Enzyme, die fähig sind, antimikrobielle Wirkstoffe zu verändern und zu inaktivieren (EMEA 1999). Dies erfolgt meist durch hydrolytische Spaltung (z.B. β -Laktamantibiotika, Makrolide) oder durch chemische Veränderung (z.B. Aminoglykoside, Chloramphenicol) der Wirkstoffe. Gene für inaktivierende Enzyme sind meist auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert und das Substratspektrum der inaktivierenden Enzyme ist auf eine kleine Gruppe strukturell verwandter Wirkstoffe beschränkt (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). Bei *Y. enterocolitica*, sowie bei gramnegativen Bakterien allgemein, sind β -Laktamasen chromosomal kodiert (STOCK et al. 1999). In Tabelle 7 sind Resistenzmechanismen gramnegativer Bakterien durch enzymatische Inaktivierung sowie deren Genlokalisierung dargestellt. Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass die meisten dieser Resistenzmechanismen auf Plasmiden und die wenigsten auf Genkassetten lokalisiert sind.

Tabelle 7: Beispiele unterschiedlicher Resistenzmechanismen gegen antibakterielle Wirkstoffe sowie Lokalisation der Resistenzgene auf verschiedenen genetischen Elementen bei gramnegativen Bakterien (mod. nach SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001)

Resistenzmechanismus	Antimikrobieller Wirkstoff	Gen Lokalisation	Bakterien
Enzymatische Inaktivierung			
Chemische Modifizierung	Chloramphenicol	P,C,T,GC	gramnegativ
	Aminoglykoside	P,T,GC,C	gramnegativ <i>Escherichia,</i> <i>Shigella</i>
Hydrolyse	Makrolide	P,T,C	gramnegativ
	β -Laktame	P,T,C	gramnegativ
	Makrolide	P,GC	gramnegativ
Verminderte intrazelluläre Akkumulation			
Aktiver Transport über spezifische Effluxsysteme	Tetracycline	P,T,C	gramnegativ
	Chloramphenicol, Florfenicol	P,T,GC,C	<i>Salmonella,</i> <i>Escherichia</i>
	Tetracycline	C	<i>Escherichia</i>
	Chloramphenicol, β -Laktame, Makrolide, Fluorchinolone, Tetracycline	C	<i>Pseudomonas</i> <i>E. coli, Salmonella</i>
Veränderung der Angriffsstelle			
Schutz der Zielstelle (target site)	Tetracycline	T,C	gramnegativ
Chemische Veränderung der Zielstelle	Makrolide, Lincosamide	P,T,C	<i>Escherichia</i>
Ersatz einer empfindlichen Zielstruktur durch eine resistente	Trimethoprim	P,T,GC	<i>Enterobacteriaceae</i>
	Sulfonamide	P,GC	<i>Enterobacteriaceae,</i> <i>Pasteurellaceae</i>
Änderung der Zielstelle durch Mutation	Streptomycin	C	gramnegativ
	Fluorchinolone	C	gramnegativ

P= Plasmid, T= Transposon, GC= Genkassette, C= Chromosomale DNA

Verminderte intrazelluläre Akkumulation antimikrobieller Wirkstoffe:

Dies geschieht entweder durch eine verminderte Aufnahme der Wirkstoffe in die Zelle, z.B. durch Verringerung der bakteriellen Permeabilität, was aber nur innerhalb bestimmter Konzentrationsbereiche möglich ist, oder das in der Zelle akkumulierte Chemotherapeutikum wird aktiv aus der Zelle ausgeschleust (EMEA 1999, SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Letzteres geschieht meist durch energieabhängige Effluxsysteme. Viele dieser Ausschleussysteme besitzen ein relativ enges Substratspektrum, welches z.B. nur bestimmte Makrolide oder Tetracycline umfasst. Es gibt aber auch unspezifische Effluxsysteme, sogenannte Multidrugtransporter, die strukturell unterschiedliche Substanzen wie Antibiotika und Detergentien aus der Zelle ausschleusen können (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA 2001). Gene für spezifische Effluxsysteme sind meist auf Plasmiden oder Transposons lokalisiert und Gene für unspezifische Transportsysteme liegen meist chromosomal vor (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Tabelle 7 zeigt Resistenzmechanismen bei gramnegativen Bakterien durch verminderte intrazelluläre Akkumulation antibakterieller Wirkstoffe sowie deren Genlokalisierung. Wie bei der enzymatisch bedingten Inaktivierung sind auch hier die wenigsten Resistenzmechanismen auf Genkassetten lokalisiert, dagegen befinden sich die meisten auf der chromosomalen DNA.

Änderung der bakteriellen Angriffsstellen:

Mit dieser Strategie können Bakterien ihre Angriffsstellen für Chemotherapeutika mittels verschiedener Mechanismen verändern. So wird durch enzymatische Veränderung (Methylierung) der bakteriellen Angriffsstelle das Anheften der Wirkstoffe an ihre Zielstrukturen verhindert. Dies findet man z.B. bei der Resistenz gegenüber Makroliden und Lincosamiden (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Bei der Tetracyclinresistenz findet man spezifische Schutzproteine, die die bakteriellen Ribosomen vor den inhibitorischen Effekten der Tetracycline schützen. Gene für modifizierende Enzyme und ribosomale Schutzproteine sind auf Plasmiden und Transposons lokalisiert (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Weiterhin können Bakterien ihre empfindlichen Zielstrukturen durch andere mit einer reduzierten Empfindlichkeit ersetzen. Beispiele hierfür sind Resistenzen gegen Sulfonamide oder Trimethoprim, dessen Resistenzgene meistens auf Plasmiden,

Transposons oder Genkassetten lokalisiert sind. Auch durch chromosomale Mutation können Gene so verändert werden, dass daraus Resistenzen gegenüber bestimmten Substanzen entstehen. Beispiele hierfür sind sowohl die Streptomycin- als auch die Fluorchinolonresistenzen (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). In Tabelle 7 sind Resistenzmechanismen durch Veränderung der Angriffsstelle und deren Genlokalisierung bei gramnegativen Bakterien dargestellt. Auch hier sind, wie bei der verminderten intrazellulären Akkumulation, die meisten Resistenzmechanismen auf der chromosomalen DNA lokalisiert und die wenigsten kommen auf Genkassetten vor.

2.5.4 Kreuz- und Coresistenz

Bei einer gleichzeitigen Unempfindlichkeit von Bakterien gegenüber mehr als einem antimikrobiellen Wirkstoff (Multiresistenz) kommen unterschiedliche Ursachen in Frage: es kann eine intrinsische Resistenz gegen verschiedene Wirkstoffe vorliegen oder es handelt sich um erworbene Kreuz- oder Parallelresistenzen (Coresistenzen) (WERCKENTHIN et al. 2005). Unter **Kreuzresistenz** versteht man eine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen der gleichen Wirkstoffgruppe, die auf einem gemeinsamen Resistenzmechanismus basiert (SHAH 2005). Als Beispiel sei die gleichzeitige Resistenz gegen Enrofloxacin und Ciprofloxacin bei *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) genannt (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000). **Coresistenz** bezeichnet dagegen die simultan vermittelte Resistenz gegenüber Vertretern unterschiedlicher Wirkstoffgruppen (SHAH 2005). Diese Form der Resistenz basiert auf unterschiedlichen Resistenzgenen. Ein Beispiel ist die gleichzeitige Unempfindlichkeit von *S. aureus* gegen Methicillin und Gentamicin (SHAH 2005). Einen Sonderfall der Coresistenz stellen sogenannte "Multidrug-Transporter" dar. Sie verfügen über ein breites, weniger spezifisches Substratspektrum und können unterschiedliche Stoffe aus der Bakterienzelle transportieren (WERCKENTHIN et al. 2005). Multidrug-Transporter können Plasmid-codiert sein, aber auch in Integrons werden Multidrug-Transporter codierende Gene gefunden (HÖLZEL 2006).

2.5.5 Die Darmflora als Reservoir für Resistenzgene

Die komplexe Darmflora kann als Reservoir resistenter Bakterien und resistenter Gene dienen. Die Anwendung antibakterieller Wirkstoffe induziert Veränderungen in der normalen Darmflora und begünstigt das Überleben und/oder die Entstehung resistenter Bakterien. Das komplexe Darmmilieu, in dem Bakterien einen engen Kontakt haben, stellt einen idealen Ort für den *In-vitro*-Transfer resistenter Gene zwischen verschiedenen Bakterienarten und Bakteriengattungen dar. Dieser horizontale Transfer von Resistenzgenen kann durch den Selektionsdruck, der von antimikrobiellen Wirkstoffen ausgeübt wird, verstärkt werden (NIKOLICH et al. 1994). Der Mechanismus des horizontalen Gentransfers ist sehr effektiv, da Mikroorganismen durch Aufnahme von Plasmiden, die für Resistenzen kodieren, unter Umständen mehrere Resistenzgene auf einmal erhalten können. Wichtig sei in diesem Kontext zu erwähnen, dass die Resistenzbildung gegen antimikrobielle Wirkstoffe nicht kennzeichnend für pathogene Bakterien ist. Der Selektionsdruck bei der Anwendung von Chemotherapeutika kann auch bei Kommensalen zur Resistenzentstehung führen (EMEA 1999).

2.6 Rückstandsproblematik

Eine Übertragung resistenter Bakterien kann durch Aufnahme von Lebensmitteln, durch direkten Kontakt mit Tieren oder durch Kontakt mit tierischen Ausscheidungen erfolgen. Daneben besteht für den Konsumenten theoretisch auch ein Risiko der Resistenzselektion durch Aufnahme antimikrobieller Rückstände mit der Nahrung (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Dieser Weg ist aber aufgrund der gesetzlich festgelegten Rückstandshöchstmengen eher unwahrscheinlich (UNGEMACH 1999). Vielmehr stellen Rückstände antimikrobieller Wirkstoffe für den Verbraucher durch ihre mögliche allergisierende Wirkung ein größeres Risiko dar. Allergische Reaktionen sind gegenüber folgenden Wirkstoffen bekannt: Penicilline, Makrolide, Sulfonamide, in selteneren Fällen auch Cephalosporine, Aminoglykoside, Chinolone, Tetracycline und Glykopeptide (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001).

Alle neuen sowie bereits existierenden Wirkstoffe für Lebensmittel liefernde Tiere unterliegen in der EU strengen gesetzlichen Regelungen. Alle pharmakologisch wirksamen Stoffe, die in Arzneimitteln bei Lebensmittel liefernden Tieren eingesetzt werden sollen, werden vor dem eigentlichen Zulassungsverfahren einer zentralen gesundheitlichen Risikobewertung unterzogen. Dabei ist die EMEA für die Zulassung neuer Arzneimittel und die Kommission F des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) für die Zulassung bereits vorhandener Arzneimittel zuständig. So kann die Lebensmittelsicherheit der Wirkstoffe abgeschätzt und ein Wert für Rückstandshöchstmengen (Maximum Residue Limit, MRL) festgelegt werden. Nach der Arzneimittelanwendung dürfen die MRL-Werte in den tierischen Lebensmitteln nicht überschritten werden. Dies ist durch die Verordnung EWG Nr. 2377/90 geregelt.

Europaweit werden sowohl im Schlachthof als auch im Erzeugerbetrieb stichprobenweise Proben genommen und auf Rückstände untersucht. Art und Umfang der Untersuchungen sind in Deutschland im Nationalen Rückstandskontrollplan festgelegt, der auf der EU-Rückstandskontroll-Richtlinie 96/23/EG sowie der Ergänzung durch die Entscheidung der Kommission 97/747/EG und der Entscheidung 98/179/EG basiert. Das BVL erstellt den Plan, schickt ihn zuerst an die EU-Kommission und danach an die Bundesländer. Die amtlichen Untersuchungsergebnisse der Bundesländer werden vom BVL jährlich zusammengefasst und unter der Homepage des BVL veröffentlicht. Eine Liste der Substanzen für die MRL-Werte festgelegt wurden, sind in Anhang I bis IV der Verordnung EWG Nr. 2377/90 des Rates aufgelistet.

Ergebnisse der Untersuchung auf Stoffe mit antibakterieller Wirkung aus dem Nationalen Rückstandskontrollplan für das Jahr 2005 sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Daten wurden aus der Homepage des BVL entnommen (BVL 2007). Mit 0,18 % der ermittelten positiven Rückstandshöchstmengen lag der Prozentsatz auf ähnlichem Niveau wie im Jahr 2004 mit 0,19 %. Diese Belastung gilt nach Auffassung des BVL als gering nach ordnungsgemäßer Handhabung sollte sie jedoch null sein. Insgesamt gesehen war Geflügel am geringsten belastet, etwas häufiger wiesen Schweine und Rinder Höchstmengenüberschreitungen auf. Bei

Rindern wurden insgesamt 3052 Proben auf antimikrobielle Wirkstoffe untersucht. Davon waren 15 (0,5 %) positiv. Die Untersuchungsergebnisse bei Schweinen zeigen, dass von 6840 Proben die auf Stoffe mit antibakterieller Wirkung untersucht worden sind, 17 (0,3 %) positiv waren. Bei Geflügel wurden insgesamt 1779 Proben auf antibakteriell wirksame Stoffe untersucht. In 3 von 1649 Proben (0,2 %) wurde das verbotene Antibiotikum Chloramphenicol nachgewiesen.

Tabelle 8: Höchstmengenüberschreitungen antibakterieller Wirkstoffe bei Rindern, Schweinen und Geflügel für das Jahr 2005 (Rückstandskontrollplan mod. nach BVL 2007)

Antimikrobielle Wirkstoffe	Rind		Schwein		Geflügel	
	N Proben	N positive	N Proben	N positive	N Proben	N positive
Tetracycline	1193	2	2302	3		
Aminoglykoside	340	10	674	4		
Penicilline	264	2	574	1		
Chinolone	627	1				
Sulfonamide			1521	9		
Chloramphenicol					1649	3

N= Anzahl untersuchte Proben

2.7 Verbreitung übertragbarer Antibiotikaresistenzen

Unter dem Begriff „Verbreitung“ versteht man hauptsächlich den horizontalen Transfer von Resistenzgenen zwischen Bakterien. Daneben kann unter dem Begriff auch die Translokation eines Resistenzgenes von einem Ort des bakteriellen Genoms zu einem anderen Ort verstanden werden (TEUBER 1999). Unter der Verbreitung übertragbarer Antibiotikaresistenzen versteht man ebenso die Ausbreitung resistenter Erreger von Krankenhäusern auf die Bevölkerung oder Umwelt, vom Tier in die Umwelt und auf den Menschen durch direkten Kontakt oder über Lebensmittel (TEUBER 1999).

Bei jeder antibakteriellen Anwendung besteht durch den erhöhten Selektionsdruck prinzipiell die Gefahr der Entwicklung resistenter Bakterien (SCHWARZ et al. 2001). Der Selektionsdruck stellt eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbreitung resistenter Erreger und für die Übertragung von Resistenzgenen dar (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). Die Entstehung und Verbreitung antimikrobieller Resistenzen hängt in erster Linie vom verabreichten Chemotherapeutikum ab (SCHWARZ et al. 2001), aber auch von anderen Faktoren wie der Bakterienart, der Verfügbarkeit vorher vorhandener Resistenzgene und Austauschbarkeit der Resistenzgene (SCHWARZ et al. 2001). Weitere wichtige Voraussetzungen für die schnelle Ausbreitung von Resistenzen sind die Lokalisation der Resistenzgene auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Transposons, Genkassetten/Integrans sowie der enge Kontakt zwischen Bakterien in einem polymikrobiellen Milieu wie es beispielsweise auf den Schleimhäuten des Respirations- und Verdauungstraktes der Fall ist (SCHWARZ und KEHRENBURG 2001, SCHWARZ et al. 2001). Neben den Transferprozessen, die innerhalb von Bakterienpopulationen eines einzigen Wirtes (Tier oder Mensch) erfolgen können, stellt die Übertragung resistenter Bakterien zwischen verschiedenen Menschen, unterschiedlichen Tieren oder aber zwischen Tieren und Menschen einen wichtigen Gesichtspunkt bei der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen dar (SCHWARZ und KEHRENBURG 2000). Hierbei kann es nach dem Austausch resistenter Bakterien auch zur Übertragung von Resistenzgenen in Bakterien des neuen Wirtes kommen. Der Austausch resistenter Erreger zwischen verschiedenen Wirten erfolgt meist problemlos durch

direkten Kontakt oder durch orale bzw. aerogene Aufnahme. Haftung und Vermehrung der Erreger erfordern dagegen im Wirt eine fehlende oder stark reduzierte Wirtsspezifität der Erreger, wie z.B. bei *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *C.jejuni* oder *Y. enterocolitica*. Sie benötigen geeignete Milieubedingungen und müssen die Infektionsabwehr des Wirtes überstehen (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001).

Bei der Übertragung resistenter Erreger tierischer Herkunft auf den Menschen können zwei Aspekte unterschieden werden: einerseits der Transfer resistenter Zoonoseerreger und andererseits die Übertragung von Bakterien, die zwar keine Krankheiten auslösen, aber während ihres Aufenthaltes auf oder im Menschen ihre Resistenzgene auf andere Bakterien übertragen können (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001).

Da in der Human- und Tiermedizin die gleichen antibakteriellen Wirkstoffe bzw. Substanzen aus der gleichen Wirkstoffgruppe verwendet werden, ist es oft schwierig zu beweisen, ob die aufgetretenen Resistenzen beim Menschen eine Folge der Chemotherapeutika-Anwendung in der Human- oder Veterinärmedizin sind. Dagegen ist die Beweisführung leichter, wenn es sich um antimikrobielle Wirkstoffe handelt, die nur bei Tieren, nicht aber beim Menschen eingesetzt werden (AARESTRUP und WEGENER 1999). Diese Situation lag vor, als in der ehemaligen DDR Oxytetracyclin als Leistungsförderer durch das Streptothricin-Antibiotikum Nourseothricin im Jahr 1983 ersetzt wurde. Kein ähnliches Antibiotikum wurde zu diesem Zeitpunkt in der Humanmedizin verwendet. Zwei Jahre später wurden Streptothricin-Resistenzen bei *E. coli* aus der Darmflora von Schweinen und in Fleischprodukten gefunden. Als der nutritive Einsatz mit der Wiedervereinigung beendet wurde, hatten sich die Resistenzen auf *E. coli* beim Personal der Schweinemastanlagen, bei der ländlichen Bevölkerung sowie bei Stadtbewohnern mit Harntraktinfektionen ausgebreitet (WITTE 2000). Generell sind Langzeitresistenz-Trends nicht vorhersehbar und eine spezifische Informationen über die Reversibilität der Resistenz einer Bakterienart oder -population in Bezug auf ein neues Chemotherapeutikum wird normalerweise nicht erlangt werden, bis das Präparat eine Zeit lang weit verbreitet angewandt wird.

2.7.1 Bedeutung der Lebensmittel bei der Verbreitung übertragbarer antibakterieller Resistenzen

Die Bedeutung von Fleisch und Fleischprodukten für die Ausbreitung antimikrobieller Resistenzen ist bekannt (WITTE 2000). Am Beispiel der EU kann man sehen, dass trotz einheitlicher Grundlagen die geübte Praxis doch zu einem unterschiedlichen Hygienestandard führt. Ein gewisser Kontaminationsgrad während des hochtechnisierten Schlachtungs- und Zerlegungsprozesses ist unvermeidbar (STOLLE 1989). Aus diesem Grund ist das Fleisch, insbesondere rohes Fleisch, das direkte Bindeglied zwischen der tierischen Mikroflora und dem Menschen (TEUBER 1999). Als Beispiel sei ein Schwarzsauer-assoziiertes Yersiniose-Ausbruch genannt, der 2001 in den USA auftrat (JONES et al. 2003).

Auch andere Lebensmittel wie Rohmilch bzw. pasteurisierte Milch und deren Produkte können bis zu 50 % mit Lebensmittelinfektionserregern kontaminiert sein (TEUBER 1999), was aber nicht bedeutet, dass es sich dabei nur um resistente Erreger handelt. Eier können ebenfalls eine Rolle bei der Übertragung resistenter Keime spielen, da ihre Schale durch die Darmflora der Hennen kontaminiert sein kann (PAPADOPOULOU et al. 1997, FREI et al. 2001). Des Weiteren ist eine Aufnahme resistenter Bakterien über pflanzliche Lebensmittel möglich. Dies beweist ein 1981 aufgetretener Yersiniose-Ausbruch durch kontaminierten Tofu bei 50 Menschen in USA (TACKET et al. 1985). Vegetarische Lebensmittel stellen sogar ein größeres Risiko im Vergleich zu Fleisch und Fleischprodukten dar, da sie auch ohne Erhitzung zum Verzehr geeignet sind (WITTE 2000). Dagegen werden im Zuge einer ordnungsgemäßen Zubereitung von Fleisch (braten, kochen, backen) in der Regel die Bakterien abgetötet. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass der Verbraucher selbst durch einen fehlerhaften Umgang oder durch eine Kontamination während der Zubereitung und/oder durch falsch gelagerte Lebensmittel das Gefährdungsrisiko beträchtlich erhöhen kann (SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001).

Bei Yersinien und Listerien ist zu beachten, dass sie psychrotroph sind und sich problemlos auf im Kühlschrank gelagerten Lebensmitteln vermehren können. Neben resistenten Zoonoseerregern können Kommensalen wie *E. coli* ein Gesundheitsrisiko

darstellen, da sie ihre Resistenzgene auf im menschlichen Körper befindliche humanpathogene Bakterien übertragen können (BARTON 2000, SCHWARZ und WERCKENTHIN 2001). In Deutschland sind bisher, trotz Auftreten vereinzelter Yersiniosen, keine Massenausbrüche wie bei Salmonellen bekannt.

2.7.2 Übertragung resistenter Lebensmittelinfektionserreger

Das Vorkommen antibakteriell resistenter Lebensmittelinfektionserreger wie *Campylobacter*, Salmonellen und *Y. enterocolitica* aber auch *E. coli* kann ein Gesundheitsrisiko darstellen. Vor allem Fleisch und Milch können unbeabsichtigterweise mit diesen Bakterien kontaminiert sein. Trotz der Tatsache, dass seit der Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe in Human- und Veterinärmedizin Resistenzen bei menschlichen und tierischen Stämmen allgemein zugenommen haben, ist die Mehrzahl der klinischen Stämme noch immer empfindlich für die meisten antibakteriellen Wirkstoffe (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000).

2.7.2.1 Gramnegative Bakterien

Die Prävalenz Olaquinox-resistenter *E. coli* aus Schweinekotproben stieg nach Zulassung dieses antimikrobiellen Wirkstoffes als Leistungsförderer innerhalb von drei Jahren von 0,004 % auf 6,0 % an. Ebenso stieg die Prävalenz in den nachbarschaftlich liegenden Betrieben, die diesen Leistungsförderer nicht verwendeten, jedoch war dieser Anstieg deutlich geringer (LINTON et al. 1988). OHMAE et al. (1981) berichten in ihrer Studie über eine Zunahme Carbadox-resistenter fäkaler *E. coli* vom Schwein nach dessen Einführung als Leistungsförderer. Über die Übertragung resistenter **Salmonellen** vom Tier auf den Menschen ist in einigen Studien berichtet worden (BEZNASON et al. 1983, SPIKA et al. 1987). Der Hauptübertragungsweg findet über tierische Produkte statt. Daneben ist eine Infektion mit Salmonellen auch durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder durch Kontakt mit deren Kot möglich (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000). Asymptomatische Salmonelleninfektionen sind bei Nutztieren in Massentierhaltungen unvermeidbar. Seit 1994 hat *S. Typhimurium* DT 104 immer wieder auch in Deutschland Epidemien verursacht. Dieser Stamm wies von Beginn ein bestimmtes Resistenzmuster gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin,

Tetracyclin und Sulfonamide auf. Zusätzlich hat der Stamm Resistenzen gegen Trimethoprim und Ciprofloxacin erworben (TEUBER 1999, VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000). In Dänemark ist ein klinischer Ausbruch mit Fluorchinolon-resistenten *S. Typhimurium* DT 104 bei 25 Menschen aufgetreten. Epidemiologische Untersuchungen ergaben, dass eine dänische Schweineherde die primäre Infektionsquelle war (MØLBAK et al. 1999). *C. jejuni* wurde zwar aus dem Darminhalt unterschiedlicher Tiere isoliert, jedoch scheint dieser Keim besonders an den Magen-Darm-Trakt von Geflügel adaptiert zu sein (TEUBER 1999). Bei schweren *Campylobacter*-Infektionen stellen Erythromycin und Fluorchinolone die Mittel der Wahl dar. Das weltweite Auftreten Chinolon-resistenter *Campylobacter* ist eindeutig auf den Einsatz dieser Chemotherapeutika sowohl in Human- als auch in Tiermedizin zurückzuführen (TEUBER 1999). In den Niederlanden wurde ein klarer Zusammenhang zwischen dem Auftauchen Fluorchinolon-resistenter *C. jejuni* Infektionen bei Menschen und der Einführung 1987 von Enrofloxacin für Geflügel festgestellt (ENDTZ et al. 1991).

2.7.2.2 Yersinien

Mehrere Studien haben sich mit dem Resistenzverhalten humaner *Y. enterocolitica* Stämme und einem möglichen Zusammenhang zu tierischen Infektionsquellen befasst (HAMMERBERG et al. 1977, JUHLIN und WINBLAD 1981, HORNSTEIN et al. 1985, PÉREZ-TRALLERO et al. 1988a,b, KWAGA and IVERSEN 1990, LYONS et al. 1991, PRESTON et al. 1994, PHAM et al. 1991, 1995, ALZUGARAY et al. 1995, HARIHARAN et al. 1995, STOLK-ENGELAAR et al. 1995, AARESTRUP et al. 1998, STOCK und WIEDEMANN 1999, RASTAWICKI et al. 2000, PRATS et al. 2000, MAYRHOFER 2003, ABDEL-HAQ et al. 2006, BAUMGARTNER et al. 2007), allerdings konnte nur in einer dieser Studien ein direkter Zusammenhang festgestellt werden. Lediglich PÉREZ-TRALLERO (1988a) nehmen eine Übertragung Chloramphenicol-resistenter *Y. enterocolitica*-Stämme von Tieren auf Menschen als wahrscheinlich an. Bisher sind in Deutschland keine Yersiniose-Ausbrüche sondern nur sporadische Fälle von Infektionen mit *Y. enterocolitica*, überwiegend des Bioserotyps 4/O:3, bekannt. Diese werden meist in Zusammenhang mit der Aufnahme von Schweinefleisch gebracht. Zahlen des Robert-Koch-Instituts (RKI)

zeigen, dass durchschnittlich 1 bis 10 Erkrankungsfälle pro Woche und Bundesland auftreten (RKI 2002, 2003, 2004, 2005, 2007). Dagegen wurde in den USA und in Australien über unterschiedliche Yersiniose-Ausbrüche berichtet (TACKET et al. 1984, TACKET et al. 1985, BUTT et al 1991, JONES et al. 2003), jedoch wiesen nur einzelne Stämme wenige Resistenzen auf. Dabei kamen Resistenzen gegen Sulfonamide, Streptomycin und Chloramphenicol am häufigsten vor (PRATS et al. 2000). Gegen Fluorchinolone zeigen Yersinien eine hohe Empfindlichkeit, im Gegensatz zu den in Kap. 2.6.2.1.1 erwähnten Bakterien wie *E. coli*, Salmonellen und *Campylobacter*. Ebenso scheinen Yersinien keine multiplen Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe erworben zu haben, wie öfters bei anderen *Enterobacteriaceae* beobachtet (PHAM et al. 1991). SORIANO und VEGA (1982) sowie PÉREZ-TRALLERO (1988a) konnten allerdings kombinierte Resistenzen gegen Sulfonamide und Streptomycin bei 17,0 % bzw. 46,0 % der untersuchten Stämme feststellen.

2.7.2.3 Grampositive Bakterien

In einer Studie aus den USA, wo das Glykopeptid Avoparcin als Leistungsförderer nicht zugelassen war, konnten in humanen Stuhlproben keine Glykopeptid-resistenten *Enterococcus faecium* (*E. faecium*)-Stämme nachgewiesen werden (COQUE et al. 1996). Bei Infektionen mit Glykopeptid-resistenten *E. faecium* ist die Kombination von Quinopristin/Dalfopristin (StreptograminB/A) eine der letzten Therapiemöglichkeiten. Die Tatsache, dass in Deutschland schon vor dem humanmedizinischen Einsatz von Quinopristin/Dalfopristin resistente *E. faecium* aus klinischem Material isoliert worden sind, lässt auf einen tierischen Ursprung der Resistenz schließen (WITTE 2000). VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH (2000) berichten, dass in Ländern, in denen Avoparcin als Leistungsförderer angewendet wurde, **Vancomycin-resistente *Enterococci*** (VRE) auftraten. Diese wurden sowohl bei Lebensmittel liefernden Tieren, als auch in der Darmflora gesunder Menschen und Haustiere nachgewiesen. Eine Studie aus Dänemark ergab, dass zwischen der Anwendung von Avoparcin in landwirtschaftlichen Betrieben und der Prävalenz von VRE in der Darmflora von Tieren eine hohe Korrelation besteht. Die Wahrscheinlichkeit VRE aus Kotproben von Schweinen und

Geflügel, die mit Avoparcin gefüttert wurden, zu isolieren, ist drei Mal höher als bei anderen Tieren (BAGER et al. 1997). Nach dem Verbot des Leistungsförderers Avoparcin sank in Dänemark von 1995 bis 1998 das Vorkommen Vancomycin-resistenter *E. faecium* in Geflügelkotproben von über 80,0 % auf weniger als 5,0 %. In Schweinekotproben blieb dagegen die Prävalenz mit 20,0 % gleich (BAGER et al. 1999). In Deutschland wurde zwei Jahre nach Anwendungsverbot von Avoparcin eine signifikante Abnahme der Prävalenz Vancomycin-resistenter *E. faecium* in Geflügelfleisch beobachtet (KLARE et al. 1999). Die Prävalenz von VRE bei gesunden Menschen nahm in Deutschland innerhalb der Jahre 1994 bis 1997 von 12,0 % auf 3,0 % sichtlich ab (KLARE et al. 1999). Diese Ergebnisse verdeutlichen den Selektionsdruck von Glykopeptiden für die Entstehung von VRE bei Geflügel und unterstreichen die Rolle von Geflügelfleisch bei der Übertragung resistenter Bakterien vom Tier auf den Menschen (VAN DEN BOGAARD und STOBBERINGH 2000).

2.8 *Yersinia enterocolitica*

Am Institut für Technologie und Hygiene der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wurde diese Problematik im Rahmen mehrerer Studien bearbeitet. Daher werden die grundlegenden Themen nur mit den Schwerpunkten abgehandelt, die für diese Studie von Bedeutung sind.

Yersinien sind gram-negative fakultativ anaerobe Stäbchen und gehören nach Bergey's Manual of Systematic Bacteriology zur Familie *Enterobacteriaceae*. Nach BOTTONE (1997) gehören zum Genus *Yersinia* (Y.) 11 verschiedene Spezies: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollareti*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei* und *Y. ruckeri*, letzteren taxonomische Einteilung ist noch unklar (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Nach neuesten Untersuchungen von SPRAGUE und NEUBAUER (2005) gehört als zwölfte Spezies *Y. aleksiciae* zum Genus. Für den Menschen sind die drei pathogenen Arten *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* Zoonoseerreger, von denen wiederum *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*

Lebensmittelinfektionserreger sind. Die anderen Arten sind in der Regel apathogene Umweltkeime, die aber auch in klinischem Material sowie in Lebensmittelproben nachgewiesen worden sind.

2.8.1 Einteilung

Y. enterocolitica wird je nach biochemischem Verhalten in 6 Biotypen (1A, 1B, 2, 3, 4 und 5) und circa 60 Serotypen, welche überwiegend anhand der O-Antigene unterteilt werden, eingeteilt. Die O-Antigene sind nicht Spezies-spezifisch, d.h. sie können bei verschiedenen *Yersinia*-Arten vorkommen (BOTTONE 1999). Als humanpathogen gelten vor allem die Serotypen O:3, O:8, O:9 und O:5,27. Der Bioserotyp 4/O:3 ist vor allem in Europa, Japan, Kanada und den USA als Yersinioseauslöser von Bedeutung (BOTTONE 1999).

Zu den obligat pathogenen *Y. enterocolitica*, die das Virulenzplasmid tragen, gehören der Biotyp 1B (Serotypen O:8, O:13a, 13b, O:18, O:20, O:21), Biotyp 2 (Serotypen O:9, O:5,27), Biotyp 3 (Serotypen O:1,2a,3, O:9, O:5,27), Biotyp 4 (Serotyp O:3) und Biotyp 5 (Serotyp O:2a,2b,3) (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Die Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica* lassen sich in plasmid- und chromosomal codiert einteilen (HEESEMANN 1990). Alle pathogenen Yersinien besitzen das Virulenzplasmid pYV (plasmid for *Yersinia* virulence). Zu den chromosomal codierten Pathogenitätsfaktoren gehört das *ail* (attachment invasion locus)-Gen, welches nur bei pathogenen Stämmen vorkommt (BOTTONE 1997) und das *inv*-Gen, das für das Invasin codiert (BOTTONE 1999).

2.8.2 Klinische Bedeutung: Yersiniose

Yersiniosen sind Erkrankungen bei Mensch und Tier, die durch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* verursacht werden. In Deutschland gelten als Yersiniosen nur Erkrankungen die durch *Y. enterocolitica* hervorgerufen werden. Yersiniosen nehmen in Deutschland die dritte Position bei Lebensmittelinfektionen ein, nach *Campylobacter* und Salmonellen. Studien aus Finnland und Deutschland haben gezeigt, dass bei klinisch gesunden Blutspendern die Prävalenz von *Y. enterocolitica*

O:3 und O:9-spezifischen Antikörpern -mittels Immunoblotting- mit 31,0 % (Finnland) und 43,0 % (Deutschland) relativ hoch ist (MÄKI-IKOLA et al. 1997).

Die Übertragung erfolgt hauptsächlich oral-alimentär über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser; seltener kommen Schmierinfektionen (z.B. in Krankenhäusern oder Kindertagesstätten) vor (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Nach oraler Aufnahme beträgt die relativ lange Inkubationszeit 7-10 Tage. In manchen Fällen kann sie aber auch nur einen Tag betragen (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Unterschiedliche Krankheitsbilder können beim Menschen mit *Y. enterocolitica* in Verbindung gebracht werden, wobei Gastroenteritis in Form von selbstlimitierendem Durchfall die häufigste Manifestationsart ist (ALEKSIC und BOCKEMÜHL 1990). Enterale Erkrankungen können sich in verschiedenen Formen manifestieren: entweder als Enteritis, terminale Ileitis, mesenteriale Lymphadenitis evtl. mit Symptomen einer Pseudoappendizitis oder als Septikämie (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Septikämische Verläufe sind selten, betreffen eher Erwachsene mit schwerer Grunderkrankung oder immunsupprimierte Personen und können zu fokalen Abszessen in Leber und Milz führen sowie zu Meningitis, Endokarditis und septischer Arthritis (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004).

Als Folgeerkrankung einer akuten oder latenten intestinalen Infektion mit *Y. enterocolitica* können extraintestinale Krankheitsbilder wie reaktive Arthritis, Myokarditis, Glomerulonephritis oder Erythema nodosum auftreten (BOTTONE 1999, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Unter Umständen kann der Erreger jahrelang in den Lymphknoten und dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe persistieren (HEESEMAN und KARCH 1995).

2.8.3 Therapie

In der Literatur sind mehrere Empfehlungen wirksamer Chemotherapeutika für die antibakterielle Behandlung von *Yersinia*-Infektionen zu finden. Der therapeutische Erfolg muss *in-vivo* nicht immer mit den *in-vitro* erhaltenen Empfindlichkeitsprüfungen übereinstimmen (HOOGKAMP-KORSTANJE und KONING 1990). Intestinale Infektionen mit *Y. enterocolitica*, die komplikationslos verlaufen, bedürfen in der Regel keiner Therapie (COVER und ABER 1989). Studien haben gezeigt, dass die

Dauer und der weitere Verlauf der Enteritis nicht unbedingt positiv durch eine antibakterielle Therapie beeinflusst werden (COVER und ABER 1989, HOOGKAMP-KORSTANJE und KONING 1990). Im Gegensatz dazu ist bei immungeschwächten Patienten oder bei klinisch schweren Verläufen immer eine antimikrobielle Therapie indiziert (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Erfolgreiche Behandlungen sind mit Cephalosporinen der 3. Generation alleine oder in Kombination mit Aminoglykosiden, Fluorchinolone, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Doxycyclin (STOLK-ENGELAAR et al. 1995, BOTTONE 1997, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004), sowie mit Chloramphenicol (STOLK-ENGELAAR et al. 1995) beschrieben worden. Bei immunsupprimierten Patienten wird die orale Verabreichung von Trimethoprim/Sulfamethoxazol oder Doxycyclin (COVER und ABER 1989) empfohlen und für die Behandlung einer Bakteriämie eignet sich die Kombination von Doxycyclin mit Aminoglykosiden (COVER und ABER 1989). Bei der Behandlung der reaktiven Arthritis hat der frühe Therapiebeginn mit Ciprofloxacin gute Ergebnisse gezeigt (ZHANG et al. 1997, HOOGKAMP-KORSTANJE et al. 2000).

2.8.4 Epidemiologie

Y. enterocolitica kommt weltweit beim Menschen und praktisch bei allen warmblütigen Wild- und Haustieren vor, gelegentlich bei Reptilien, Fischen und Muscheln. In Lebensmitteln, Erde und Oberflächengewässern sind sie ebenfalls nachgewiesen worden (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass nur Stämme mit Virulenzplasmid obligat pathogen sind. Die Stämme des Biotyps 1A sind stets pYV-negativ und somit apathogen. Inzwischen wurden jedoch auch sporadische Fälle mit Biotyp-1A-Stämmen beschrieben, die sich klinisch nicht wesentlich von pathogenen Stämmen unterscheiden (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004).

Seit dem 1. Januar 2001 ist die Infektion des Menschen mit *Y. enterocolitica* nach §7 des Infektionsschutzgesetzes meldepflichtig. Demzufolge liegen seit dieser Zeit beim RKI detaillierte Daten über intestinale Erkrankungen mit diesen Erregern vor, wobei man von einer höheren Dunkelziffer ausgehen muss, da nicht immer alle Fälle gemeldet werden. Die Zahlen des RKI zeigen, dass seit 2005 als

Lebensmittelinfektionserreger an erster Stelle *Campylobacter* steht, gefolgt von Salmonellen und *Y. enterocolitica*. In Tabelle 9 sind die Häufigkeiten von *Y. enterocolitica*-, *Campylobacter*- und *Salmonella*-Erkrankungen in Deutschland dargestellt. Die meisten *Y. enterocolitica*-Stämme, die bei Gastroenteritiden nachgewiesen werden, sind vom Serotyp O:3 (STOLK-ENGELAAR und HOOBKAMP-KORSANTJE 1996). Dieser Serotyp kommt in Europa bei humanen Yersiniosen am häufigsten vor (DE BOER und NOUWS 1991, BOTTONE 1999).

Tabelle 9: Häufigkeiten gemeldeter *Y. enterocolitica*-, *Campylobacter*- und *Salmonella*-Erkrankungen in Deutschland (RKI 2002, 2003, 2004, 2005, 2007)

Jahr	Anzahl <i>Y. enterocolitica</i>	Anzahl <i>Campylobacter</i>	Anzahl <i>Salmonella</i>
2001	7213	54616	77386
2002	7525	56372	72379
2003	6573	47906	63066
2004	6182	55796	56976
2005	5625	62129	52257
2006	5135	51764	52319

Schweine gelten als wichtigstes Erregerreservoir für menschliche Infektionen mit *Y. enterocolitica* (DE BOER und NOUWS 1991, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006), da sie das einzige Reservoir sind, bei dem regelmäßig pathogene Stämme isoliert wurden. Die Annahme, dass Schweine die Hauptinfektionsquelle für Yersiniosen sind, wird von der Tatsache unterstützt, dass von Mensch und Schwein isolierte Stämme ähnliche DNA-Muster aufweisen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006). Schweine sind symptomlose Träger und beherbergen die Erreger vor allem in den Tonsillen (KAPPERUD 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004), aber auch im Kot von Schweinen kann man diese Erreger finden, wie durch eine Studie von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001) belegt ist, bei der in der Region München Untersuchungen zum Vorkommen von *Y. enterocolitica* durchgeführt wurden. Es konnte eine Prävalenz des Bioserotyps 4/O:3 von 60,0 % in Tonsillen und 10,0 % in Kotproben festgestellt werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001).

Untersuchungen aus Deutschland und den Niederlanden ergaben pathogene *Y. enterocolitica* (v.a. der Serogruppe O:3) in der Mundhöhle bei 40,0 - 80,0 % gesunder Schlachtschweine (DE BOER und NOUWS 1991, FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2001).

Die Epidemiologie der Yersiniose ist komplex und noch immer zu wenig geklärt. Die meisten *Y. enterocolitica*-Infektionen kommen beim Menschen sporadisch vor ohne eine eindeutige Infektionsquelle aufzuweisen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al. 2006). Die Übertragung erfolgt hauptsächlich oral-alimentär (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004), überwiegend durch den Verzehr von rohem oder ungenügend erhitztem Schweinefleisch. Hierfür spricht die Tatsache, dass Schweine als Hauptreservoir für Yersinien gelten. Schweinezungen und -därme (KAPPERUD 1991, JONES et al. 2003) aber auch Milch (COVER und ABER 1989) wurden immer wieder in verschiedenen Studien als Infektionsquellen nachgewiesen. Yersinien sind psychrotolerante Bakterien und können sich noch bei 0°C vermehren (BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004). Diese Eigenschaft kommt ihnen als Lebensmittelinfektionserreger zugute. Untersuchungen von FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (1999) in Finnland und FREDRIKSSON-AHOMAA et al. (2001) in der Region München haben gezeigt, dass Hackfleisch eine wichtige Quelle für pathogene Yersinien ist; aus 12,0 % der Hackfleischproben wurden *Y. enterocolitica* des pathogenen Bioserotyps 4/O:3 isoliert.

2.8.5 Empfindlichkeitstestung und bisher bekannte Resistenzen

Eine Zunahme der Resistenzen von Bakterien gegen antimikrobielle Wirkstoffe ist ein global beobachtetes und gefürchtetes Problem. Weltweit sind eine Vielzahl von Studien veröffentlicht worden, die sich mit der Empfindlichkeitstestung von *Y. enterocolitica* befassen (AARESTRUP et al. 1998, ABDEL-HAQ et al. 2006, ALZUGARAY et al. 1995, BAUMGARTNER et al. 2007, HAMMERBERG et al. 1977, HARIHARAN et al. 1995, HORNSTEIN et al. 1985, JUHLIN and WINBLAD 1981, KWAGA and IVERSEN 1990, LYONS et al. 1991, MAYRHOFER 2003, PHAM et al. 1991,1995, PRATS et al. 2000, PRESTON et al.1994, RASTAWICKI et al. 2000, STOCK und WIEDEMANN 1999, STOLK-ENGELAAR et al. 1995, PÉREZ-

TRALLERO et al. 1988a,b). Die allgemeine Befürchtung, dass Resistenzen immer weiter zunehmen, wird in der von PRATS et al. (2000) veröffentlichten Studie nicht widerlegt, hier ist ein deutlicher Anstieg der Resistenzen innerhalb eines Jahrzehntes zu erkennen. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der in der Literatur gefundenen resistenten *Y. enterocolitica*-Stämme des Serotyps O:3 dargestellt. Dabei wurden nur die antimikrobiellen Wirkstoffe aufgeführt, die in dieser Untersuchung Anwendung fanden. Am häufigsten wurden Resistenzen gegen Ampicillin, Erythromycin und Sulfonamide ermittelt, gefolgt von Streptomycin, Chloramphenicol und Amoxicillin/Clavulansäure. Gentamicin, Cefotaxim und Tetracyclin wiesen die niedrigsten Resistenzraten auf. Besonders erwähnenswert ist die Tatsache, dass gegen Ciprofloxacin in keiner der aufgeführten Studien Unempfindlichkeiten nachgewiesen wurden. Weder in Frankreich noch in Österreich konnten gegen die getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe Unempfindlichkeiten ermittelt werden. Die Ergebnisse der Resistenztestung von KWAGA et al. (1986) sind in Tabelle 10 nicht aufgeführt, da mit nur 4 untersuchten Stämmen, keine aussagekräftige Anzahl vorlag. Zu erwähnen ist die Untersuchung dennoch, da Resistenzen gegen Erythromycin, Streptomycin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Nalidixinsäure ermittelt wurden. Allerdings geht aus den Ergebnissen nicht hervor, wie viele der 4 Stämme resistent waren oder ob sogar Multiresistenzen vorkamen.

Tabelle 10: Ergebnisse resistenter *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 aus weltweit durchgeführten Empfindlichkeitsbestimmungen (Angaben in %)

Land	N	Amc	Amp	Azt	Ctx	Chl	Chl	Col	Eryt	Gen	Kan	Sm	Te	Su*	Su/T	T	Na	Cip
Australien ¹	64	0	100			0			0				0			0		0
Australien ²	48	9,0	100	0	0													
Dänemark ³	91		98,0			1,0	0		1,0	0	0	4,0	0	2,0	0	0	5,0	0
Deutschland ⁴	63	0		0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Frankreich ⁵	49			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UK ⁶	73		100,0	0	0	4,1			0	0			100,0			100,0		0
Kanada ⁷	23		100,0			0			100	0	0				0	0		0
Kanada ⁸	945	26,3	99,0	0,6	0,3	0,4	0,3	100	0,3	0,3	0,3	0	0	0,4	0,1	0,1	0	0
Kanada ⁹	67		100,0	0	0				100	0					0	0		0
Kanada ¹⁰	57	31,8	76,5		0	0	0		0	0	1,8	0	0	0	0	0		0
Niederland ¹¹	139					0			100	0					0			0
Österreich ¹²	18					0			0	0	0	0	0		0	0	0	0
Polen ¹³	199	0		0	0	0			0	0	0	0	0	2,5	0	0	0	0
	114	0	100,0	0	0	0			0	0				3,5	0	0	0	0
Schweiz ¹⁴	62	3,2	100,0					3,2	0	0	8,1	0	0	6,5	3,2	0		0
Spanien ¹⁵	144					8,3					8,3							0
Spanien ¹⁶		0	100,0				0		0	0	0	0	0			0	0	0
Spanien ¹⁷	75	0	100,0		0	20,0			0	0	72,0	0	0	45,0	28,0		0	0
	20	0	100,0		0	60,0			0	0	90,0	0	0	90,0	70,0		5,0	0
Sweden ¹⁸	107		100,0			0			0	0					0			0
USA ¹⁹	184		87,2		0	1,0			0	0					0			0

^{1, 2}= PHAM et al. 1991, 1995, ³= AARESTROP et al. 1998, ⁴= STOCK und WIEDEMANN 1999, ⁵= HORNSTEIN et al. 1985, ⁶= LYONS et al. 1991, ⁷= HAMMERBERG et al. 1977, ⁸= PRESTON et al. 1994, ⁹= KWAGA and IVERSEN 1990, ¹⁰= HARIHARAN et al. 1995, ¹¹= STOLK-ENGELAAR et al. 1995, ¹²= MAYRHOFER 2003, ¹³= RASTAWICKI et al. 2000, ¹⁴= BAUMGARTNER et al. 2007, ¹⁵= PÉREZ-TRALLERO et al. 1988b, ¹⁶= ALZUGARAY et al. 1995, ¹⁷= PRATS et al. 2000, ¹⁸= JUHLIN and WINBLAD 1981, ¹⁹= ABDEL-HAQ et al. 2006

(N= Anzahl untersuchte Stämme, Amc= Amoxicillin/Glavulansäure, Amp= Ampicillin, Azt= Aztreonam, Ctx= Cefotaxim, Chl= Chloramphenicol, Col= Colistin, Eryt= Erythromycin, Gen= Gentamicin, Kan= Kanamycin, Sm= Streptomycin, Te= Tetracyclin, Su*= Sulphamethoxazol u.a. Sulfonamide, Su/T= Sulphamethoxazol/ Trimethoprim, T= Trimethoprim, Na= Nalidixinsäure, Cip= Ciprofloxacin; über die Antibiotika Ceftiofur und Florfenicol wurden keine Angaben in der Literatur gefunden)

2.9 *In-vitro* Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger

2.9.1 Methoden der *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung

Die Empfindlichkeitsprüfung hat zum einen das Ziel, durch Auswahl des richtigen antimikrobiellen Wirkstoffes eine gezielte Therapie für den einzelnen Patienten zu ermöglichen, zum anderen können durch die Auswertung der Ergebnisse gleichzeitig Rückschlüsse auf die epidemiologische Situation in einer bestimmten Umgebung (Krankenhaus) oder Region getroffen werden (KOLBERT und SHAH 2002). Dazu ist es wichtig, Veränderungen in der Empfindlichkeit z.B. durch Anstieg der MHK oder durch Abnahme des Hemmhofdurchmessers (HHD) rechtzeitig zu entdecken (KOLBERT und SHAH 2002).

Die *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung von Krankheitserregern gegenüber Chemotherapeutika kann mit Hilfe verschiedener Methoden und Durchführungsvorschriften bestimmt werden. In der Routinediagnostik am weitesten verbreitet ist der Agardiffusionstest (KOLBERT und SHAH 2002), seltener werden die Agardilutions-, Bouillon-Makrodilutions- und Bouillon-Mikrodilutionsmethode sowie der Epsilon-Test (E-Test) eingesetzt (ROCKSIN 2005). Als Methode der Wahl gilt die Ermittlung von MHK mittels Bouillon-Mikrodilution nach dem amerikanischen Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Dokument M31-A2 (2002) (SCHWARZ et al. 2003). Weitere Durchführungsvorschriften findet man z.B. bei der British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) oder dem Deutschen Institut für Normung (DIN).

Die folgende Literaturübersicht beschränkt sich auf die Beschreibung der Agardiffusions- und Bouillon-Mikrodilutionsmethode. KOLBERT und SHAH (2002) beschreiben ausführlich die Vor- und Nachteile beider Methoden. Vorteile des Agardiffusionstests sind einfache Durchführbarkeit und Kostengünstigkeit. Vor allem sind Mischkulturen erkennbar und die Beschickung mit Testblättchen ist variabel. Nachteile sind die manuelle Beimpfung der Agarplatten sowie die rein qualitativen Testergebnisse und somit eine eingeschränkte Möglichkeit vom HHD auf die MHK zu schließen. Die manuelle Auswertung der Agarplatten ist zwar arbeitsaufwändig, doch stehen heutzutage verschiedene Geräte (AURA, BIOMIC, OSIRIS, SIRSCAN) zur

Verfügung, mit denen die Agarplatten mit Testblättchen und Hemmhöfen abgebildet und gespeichert werden können (KOLBERT und SHAH 2002).

Vorteile der Mikrodilutionsmethode sind eine sowohl manuelle als auch automatische Durchführbarkeit und eine direkte MHK-Ablesung. Nachteilig ist, dass Mischkulturen nicht erkannt werden können, außerdem eine Veränderung der kommerziell erhältlichen Testpanels nicht möglich und die Methode teuer ist (KOLBERT und SHAH 2002).

2.9.1.1 Agardiffusionstest

In vielen veterinär-, aber auch humanmedizinischen Diagnostiklabors wird die Agardiffusionsmethode routinemäßig noch am häufigsten durchgeführt.

Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, müssen die Verfahren standardisiert sein. Die standardisierte Methode, die derzeit vom CLSI-Unterausschuss für veterinärmedizinische antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen für Agardiffusionstests empfohlen wird, ist das Dokument M31-A2 (2002). Die Methode wurde von BAUER et al. (1966) etabliert und im CLSI-Dokument, in Anlehnung an diese Methode, die Durchführungsvorschrift erneut beschrieben.

Der Agardiffusionstest erfolgt auf festen Kulturmedien. Es werden handelsübliche Wirkstoffträger (Testblättchen, Papierblättchen) mit einer definierten Menge eines oder mehrerer antimikrobieller Wirkstoffe verwendet. Die aus diagnostischem Material isolierten Bakterienstämme werden homogen auf einer Agarplatte (z.B. Mueller-Hinton-Agar) verteilt, entweder durch Verteilen von 100 µl der Bakteriensuspension mit dem Spatel (Drigalski-Spatel) oder durch Ausstrich des Inokulums mittels sterilem Wattetupfer. Anschließend werden Testblättchen aufgelegt und die Platten bebrütet. Aufgrund der Diffusion des Chemotherapeutikums in den Agar wird das Wachstum der empfindlichen Keime gehemmt, so dass unterschiedlich große wachstumsfreie Hemmhöfe entstehen. Die HDD werden auf den Millimeter genau abgelesen, dabei gelten die Ränder des deutlich reduzierten Wachstums als Grenzen des Hemmhofes. Bei Testung von Sulfonamiden wird als

Grenze eine 80 %-ige Wachstumshemmung gewertet. Die gemessenen HHD werden nach einem Bewertungsschlüssel in die Kategorien „sensibel“ (S), „intermediär“ (I) oder „resistent“ (R) eingeteilt; somit ist nur eine qualitative Aussage möglich. Um die untersuchten Bakterien anhand ihrer HHD-Werte in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ einteilen zu können, sind verlässliche Grenzwerte erforderlich. Grenzwerte sind nicht direkt messbar, sie werden aus Ergebnissen aufwändiger Untersuchungen abgeleitet und sind in den unterschiedlichsten standardisierten Durchführungsvorschriften zu finden.

Wenn ein Erreger als „sensibel“ definiert wird, ist aufgrund seines *in-vitro* Verhaltens gegenüber einem geeigneten antimikrobiellen Wirkstoff bei einer Therapie mit der üblichen Dosierung (sowie bei geeigneter pharmakokinetischer Verteilung) im Allgemeinen ein Therapieerfolg zu erwarten (CLSI 2002, KOLBERT und SHAH 2002). Wird ein Erreger hingegen aufgrund seines *in-vitro* Verhaltens gegenüber einem bestimmten Wirkstoff als „resistent“ beurteilt und dieser Wirkstoff in der Therapie angewendet, so ist auch bei Verwendung der zugelassenen Höchstdosierung ein Therapieerfolg nicht zu erwarten (CLSI 2002, KOLBERT und SHAH 2002, VARALDO 2002). Als dritte Möglichkeit kann ein Erreger für eine bestimmte antimikrobielle Substanz als „intermediär“ eingestuft werden, wenn der zu erwartende klinische Therapieerfolg zweifelhaft ist (CLSI 2002, KOLBERT und SHAH 2002). Kommt ein solcher Wirkstoff als Therapeutikum zum Einsatz, so ist damit zu rechnen, dass er in einer höheren Dosierung als üblich angewendet wird, was unter Umständen zu Unverträglichkeitsreaktionen führen kann und vor allem im Rahmen der Anwendung bei Lebensmittel liefernden Tieren aufgrund einer Verlängerung der Wartezeit problematisch ist (SCHWARZ et al. 2003). Aus diesen Gründen sollte für eine Therapie nur solche Substanzen empfohlen werden, gegenüber die der zu bekämpfende Erreger als „empfindlich“ getestet wurde. Die Einteilung der Erreger in die Kategorie „intermediär“ hat die Funktion einer „Pufferzone“ um den Organismus nicht fälschlicherweise als „empfindlich“ oder „resistent“ einzustufen (CLSI 2002).

2.9.1.2 Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen Reihenverdünnungstest mit der Bezeichnung Mikrodilution, da bei ihm nur kleine Volumina (50-100 µl) verwendet werden. Anders als bei der Agardiffusion kommen bei diesem Verfahren flüssige Nährmedien zum Einsatz. Mikrotiterplatten (MTP) für die *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung eines Erregers können im Labor hergestellt werden oder sind kommerziell erhältlich. Bei letzteren liegen die zu testenden antimikrobiellen Wirkstoffe in lyophilisiertem oder gefrorenem Zustand in der entsprechenden Konzentration (meist einer zweifachen Verdünnungsreihe) in den jeweiligen Vertiefungen der MTP vor. Nach der Zugabe der Bakteriensuspension mit standardisierter Dichte löst sich der Wirkstoff in dem Medium und entfaltet seine Wirkung. Die Einstellung des Inokulums hat einen großen Stellenwert innerhalb der Methodik und muss entsprechend der jeweiligen Durchführungsvorschrift definierte Bakteriendichten enthalten, die mit verschiedenen Methoden erreicht werden können (CLSI 2002). Anschließend wird die MTP mit einer Folie zugeklebt, um eine Verdunstung des Mediums während der Inkubationszeit zu verhindern. Nach der Inkubationszeit werden die Kavitäten der MTP auf vorhandenes Bakterienwachstum, welches sich als „Knopf“ am Boden der jeweiligen Vertiefung der MTP darstellt, überprüft. Als MHK gilt die niedrigste Konzentration eines antibakteriellen Wirkstoffes, die ein sichtbares Wachstum eines Mikroorganismus hemmt (CLSI 2002). Bei Sulfonamiden gilt als MHK-Wert die niedrigste Konzentration des Wirkstoffes, bei der 80 % des Keimwachstums gehemmt werden (CLSI 2002, SVA 2006). Somit liefern die Ergebnisse einer MHK-Bestimmung quantitative Aussagen zum Grad der Empfindlichkeit eines Erregers (WALLMANN 2003). Der MHK-Wert stellt dabei keinen absoluten Wert dar. Die „wahre“ MHK liegt irgendwo zwischen der niedrigsten Testkonzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes, die den Testorganismus vollständig hemmt, und der nächst niedrigeren Konzentration in der jeweiligen Verdünnungsreihe (CLSI 2002).

Die Ermittlung von minimalen Hemmkonzentrationen mittels Bouillon-Mikrodilution nach dem amerikanischen CLSI-Standard M31-A2 (2002) gilt als Methode der Wahl (STOCK et al. 2001, SCHWARZ et al. 2003). Vorteile sind die Möglichkeit der quantitativen Aussage durch direkte MHK-Ablesung, manuelle und automatische Durchführbarkeit, sowie -je nach Hersteller- ein umfangreiches Angebot an

vorgefertigten MTP (KOLBERT und SHAH 2002). Nachteile sind eine nur sehr schwer zu erkennende mögliche Kontamination. Bei zu klein gewählten Konzentrationsbereichen kann die MHK nicht ermittelt werden und nicht zu vernachlässigen sind die erhöhten Kosten, v.a. bei kommerziell erhältlichen MTP (KOLBERT und SHAH 2002).

Werden die MHK-Werte mit verlässlichen Grenzwerten verglichen, kann eine Einteilung in die qualitativen Kategorien „sensibel“, „intermediär“ und „resistent“ erfolgen (SCHWARZ et al. 2003). Bei der Empfindlichkeitsprüfung im Rahmen einer Monitoringstudie sieht die Plattenbelegung meist acht Wirkstoffe in elf oder zwölf Konzentrationen vor (SCHWARZ et al. 2003), da man einen möglichst umfangreichen Überblick über das Resistenzverhalten eines Mikroorganismus erhalten möchte und um genauere Aussagen über MHK-Werte und eine Resistenzentwicklung bzw. Resistenztrend schon innerhalb der empfindlichen Bakterienpopulation treffen zu können (KOLBERT und SHAH 2002). In der Routinediagnostik sind die Testplatten meist 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). Das kann von Nachteil sein, da unter Umständen, wie von KOLBERT und SHAH (2002) beschrieben, die MHK nicht ermittelt werden kann.

Nach den Angaben des CLSI (2002) wird ein Erreger als „sensibel“ eingestuft, wenn die für ein entsprechendes Chemotherapeutikum ermittelte MHK so gering ist, dass bei einer Therapie mit der üblichen Dosierung und bei geeigneter Indikation im Allgemeinen ein Therapieerfolg zu erwarten ist. Ein Erreger wird als „resistent“ bezeichnet, wenn die für ein entsprechendes Chemotherapeutikum ermittelte MHK so hoch ist, dass auch bei Verwendung der zugelassenen Höchstdosierung ein therapeutischer Erfolg nicht zu erwarten ist. Erreger die MHK-Werte aufweisen, die zwischen diesen beiden Grenzwerten liegen, sind als „intermediär“ zu beurteilen. In dieser Studie dienten zur Kategorisierung der MHK-Werte als „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ die vom CLSI genannten Grenzwerte. Fanden sich in diesem Dokument keine Angaben, so wurden die Grenzwerte der BSAC oder CA-

SFM herangezogen. Zur Qualitätsüberwachung wird im CLSI-Dokument M31-A2 (2002) empfohlen, bei jedem Untersuchungsgang Referenzstämme mitzuführen.

2.9.1.3 Korrelation von Ergebnissen aus Agardiffusion und Mikrodilution

Da der Agardiffusionstest keine MHK-Werte liefert, hat es immer wieder Versuche gegeben die HDD (über lineare Regressionsgleichungen) in MHK-Werte umzuwandeln. Werden die Ergebnisse der Agardiffusion mit denen der Dilution verglichen, so korrelieren die HDD umgekehrt mit den MHK-Werten. Das heisst, dass mit steigenden HDD-Werten die entsprechenden MHK-Werte sinken und mit abnehmenden HDD-Werten die entsprechenden MHK-Werte zunehmen.

Laut dem CLSI-Dokument M31-A2 (2002) können die Ergebnisse der HDD zur MHK in Beziehung gesetzt werden, was aber als kritisch zu beurteilen ist, da es sein kann, dass die HDD nicht exakt mit den aufgelisteten MHK-Grenzwerten übereinstimmen, was auf Unterschiede in den Methoden und ursprünglichen Datenbanken zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde dürfen die Angaben (aus der Regressionsgleichung) nicht dazu verwendet werden, HDD in absolute MHK-Werte zu konvertieren (CLSI 2002). Auch wenn entsprechende Regressionsgleichungen veröffentlicht worden sind (SCHWARZ et al. 2003), sind Umrechnungen von HDD auf MHK-Werte abzulehnen. Sofern MHK-Werte erwünscht sind, sollten sie mit Hilfe von standardisierten Verfahren ermittelt werden. Abbildung 1 stellt den Vergleich von HDD-Werten und MHK-Werten dar. Dabei wird bei einem Keim, der in einem der beiden verwendeten Verfahren als „intermediär“ und mit der anderen Methode als „empfindlich“ oder „resistent“ beurteilt wird, die Diskrepanz beider Ergebnisse als geringfügiger Fehler („minor error“) bezeichnet (SCHWARZ et al. 2003). Bei der Empfindlichkeitsbestimmung mittels beider Methoden wird der MHK-Wert als der verlässlichere Wert angesehen (SCHWARZ et al. 2003). Wird ein Erreger in der Agardiffusion als „resistent“ und in der Mikrodilution als „sensibel“ beurteilt, so wird dieser Unterschied als großer Fehler („major error“) bezeichnet, da ein solcher Erreger als fälschlicherweise „resistent“ angesehen wird. Dieses ist für die Klinik nur insofern von Bedeutung, als dass ein vermeintlich geeigneter Wirkstoff für eine Therapie ausgeschlossen wird. Bedenklicher ist dagegen, wenn ein Bakterienstamm

im Agardiffusionstest als „empfindlich“ beurteilt wird, anhand seines MHK-Wertes jedoch als „resistent“ eingestuft wird. Dieser Unterschied wird als größtmöglicher Fehler („very major error“) bezeichnet, da bei einer Therapie ein Wirkstoff zum Einsatz kommen würde, der mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die therapeutisch erhoffte Wirksamkeit zeigt (SCHWARZ et al. 2003).

HHD in mm										
31	sensibel					„minor error“		„very major error“		
30										
29										
28										
27										
26										
25										
24										
23										
22										
21										
20										
19										
18										
17	„minor error“				intermediär		„minor error“			
16										
15										
14										
13										
12	„major error“				„minor error“		resistent			
11										
10										
9										
8										
7										
6										
5										
4										
3										
2										
1										
0										
	≤1	2	4	8	16	32	64	≥128		
MHK in µg/ml										

Abbildung 1: Korrelation von HHD-Werten und MHK-Werten (nach SCHWARZ et al. 2003) (grün: in beiden Verfahren als „empfindlich“ bewertet; blau: „intermediär“, rot: in beiden Methoden als „resistent“ eingeteilt; HHD=Hemmhofdurchmesser, MHK=Minimale Hemmkonzentration)

2.9.2 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe

Bakterielle Infektionen, insbesondere Septikämien, können lebensbedrohlich sein, weshalb sie einer möglichst schnellen und gezielten Therapie bedürfen. Um dies zu erreichen, ist eine schnelle Identifizierung und Resistenztestung des Erregers notwendig (ROLAIN et al. 2004, CLEVEN et al. 2006). Die konventionelle, kulturelle (auch phenotypisch genannt) Empfindlichkeitsprüfung ist mit 2-4 Tagen besonders zeitintensiv. Aus diesem Grund wurde es mit der Zeit immer wichtiger, schnelle diagnostische Testverfahren zu entwickeln, um pathogene Erreger und deren Eigenschaften zu identifizieren (HULETZKY et al. 2004). In den letzten Jahren wurde in mehreren Veröffentlichungen über neue molekularbiologische Techniken berichtet, bei denen je nach Verfahren, Ergebnisse schon innerhalb weniger Stunden vorliegen können. Solche Methoden, die eine schnelle Identifizierung der Bakterien und ihrer Eigenschaften ermöglichen, können auch bei langsam wachsenden Bakterien angewendet werden, da bei ihnen die Anwendung kultureller Verfahren, wie z.B. die MHK-Bestimmung, oft problematisch ist (SUNDSFJORD et al. 2004, PERRETEN et al. 2005). In der Lebensmittelindustrie wäre die Verwendung molekularbiologischer Methoden ebenso von Interesse um Lebensmittelinfektionserreger direkt zu erfassen (STEARNS et al. 2003) oder um z.B. bei den als Starterkulturen verwendeten Bakterien, Antibiotikaresistenzgene zu identifizieren (PERRETEN et al. 2005). Denn Starterkulturen, die für die Lebensmittelindustrie verwendet werden, dürfen keine Antibiotikaresistenzgene aufweisen (N.N. 2007b).

Empfindlichkeitsnachweise mittels kulturellen Testverfahren sind nach wie vor der „Goldstandard“, mit welchem neuere Methoden in Bezug auf die Durchführbarkeit, Kosten und einfache Nutzung verglichen werden (WOODFORD und SUNDSFJORD 2005). Mehrere molekularbiologische Methoden werden bereits eingesetzt, allerdings überwiegend oder ausschließlich in Forschungseinrichtungen (ROLAIN et al. 2004, WOODFORD und SUNDSFJORD 2005). Die höheren Kosten für ihre Anwendung stellen im Moment noch den größten Nachteil dieser Schnell-Methoden dar. Des Weiteren sind die Verfahren noch nicht vollständig ausgereift (ROLAIN et al. 2004, SUNDSFJORD et al. 2004, WOODFORD und SUNDSFJORD 2005), um in der Routinediagnostik angewendet werden zu können.

Bakterien verfügen über verschiedenste Resistenzmechanismen. Bei grampositiven und gramnegativen Bakterien sind bereits hunderte Antibiotikaresistenzgene beschrieben worden und in Datenbanken zu finden. Sie bieten eine große Angriffsfläche für die Anwendung molekularbiologischer Verfahren (WOODFORD und SUNDSFJORD 2005). Diese Methoden haben den Nachteil, dass sie nur bereits bekannte Resistenzmechanismen erkennen (HULETZKY et al. 2004, SUNDSFJORD et al. 2004, CLEVEN et al. 2006) oder solche, die große DNA-Ähnlichkeiten aufweisen und deren übereinstimmende Sequenzen einer Familie von Genen zuzuordnen sind (PERRETEN et al. 2005) und somit das Anlagern der Primer ermöglichen. Neue Resistenzgene werden nicht erkannt und liefern ein falsch negatives Ergebnis (HULETZKY et al. 2004, WOODFORD und SUNDSFJORD 2005). Gene, die zwar vorhanden sind, aber nicht exprimiert werden, liefern ein falsch positives Ergebnis (SUNDSFJORD et al. 2004). Dies kann auch von Vorteil sein, da Antibiotikaresistenzgene, die phenotypisch nicht bzw. noch nicht exprimiert werden, auf diese Weise frühstmöglich entdeckt werden können. Aus diesem Grund sollten solche Nachweisverfahren sobald wie möglich für Überwachungsstudien in der Forschung und Industrie eingesetzt werden, um das Auftreten und die Ausbreitung von Resistenzen soweit wie möglich einschränken zu können (PERRETEN et al. 2005). In mehreren Veröffentlichungen sind unterschiedliche molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen von Bakterien beschrieben worden, wie z.B. Microarrays (CLEVEN et al. 2006, PERRETEN et al. 2005, CALL et al. 2003, GRIMM et al. 2004) oder PCR (HULETZKY et al. 2004, ROLAIN et al. 2004).

Die **PCR** ermöglicht die *In-vitro*-Amplifikation einer bekannten DNA-Region (BANGSOW et al. 2002). Eine DNA-Polymerase synthetisiert an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize (Template-DNA) mit Hilfe von Primern (DNA-Oligonukleotide) einen neuen DNA-Strang. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung, Extension. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert (BANGSOW et al. 2002). In der Regel werden 25-35 Zyklen durchgeführt (BANGSOW et al. 2002). Die Detektion der PCR-Amplifikate erfolgt in klassischer Weise mittels Gel-Elektrophorese und anschließender Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Die **real-time PCR** stellt eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar, bei der der wichtigste Unterschied darin besteht, die amplifizierte DNA schon während der Reaktion (in Echtzeit = real-time) zu erfassen. Es können zwei unterschiedliche Techniken angewendet werden. Entweder werden interkalierende Farbstoffe, die sich in die doppelsträngige DNA einlagern, eingesetzt, oder es werden sequenzspezifische Oligonukleotide (Sonden), die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, verwendet. Unabhängig vom verwendeten System emittiert die Probe, bei Anwesenheit der Zielsequenz, innerhalb des Zyklus ein Fluoreszenz-Signal. Die Intensität ist proportional zur Menge des gebildeten amplifizierten Produktes. Vorteil einer real-time PCR gegenüber einer konventionellen PCR besteht in der Zeitersparnis durch einen kürzeren Reaktionsablauf. Bei der normalen PCR erhält man die Ergebnisse erst nach mehreren Stunden, bei der real-time PCR dagegen sind die Ergebnisse schon nach 1-2 Stunden abzulesen. Von Vorteil ist auch das geringere Kontaminationsrisiko, da Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System stattfinden.

Sowohl bei der konventionellen als auch bei der real-time PCR kann man durch Hinzufügen unterschiedlicher Primerpaare mehrere PCR-Ziele gleichzeitig in einem Reaktionsansatz durchlaufen lassen; dieses Vorgehen bezeichnet man als **multiplex PCR**. Sie stellt eine material- und zeitsparende Technik zur simultanen Amplifikation verschiedener PCR-Ziele dar (RAOULT et al. 2004). Wie HULETZKY et al. (2004) beschrieben haben, ist es ihnen gelungen eine real-time multiplex PCR Methode zu entwickeln, die verwendet werden kann, um Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) direkt aus Nasentupferproben in weniger als einer Stunde nachzuweisen. Bei dieser von ihnen entwickelten multiplex PCR ist es nicht notwendig, den Erreger vorher zu isolieren oder ihn in einem Medium anzureichern. Das ist von Vorteil, da es zu einer deutlichen Verkürzung der Probenvorbereitungszeit führt und somit schneller vorhandene Ergebnisse liefert (HULETZKY et al. 2004).

Die **DNA-Microarray** Technologie ist eine vielversprechende molekularbiologische Methode, die eine gleichzeitige Identifizierung zahlreicher unterschiedlicher Gene ermöglicht (CALL et al. 2003, CLEVEN et al. 2006). Während man bei der multiplex PCR nur etwa 3-5 PCR-Ziele nachweisen kann, sind es bei der DNA-Microarray

Technologie etwa 50. Wie von CLEVEN et al. (2006) beschrieben, bietet der neuartige Microarray die Möglichkeit der Identifizierung von Pathogenen in Blutproben mit gleichzeitiger Bestimmung von Eigenschaften, wie z.B. Bestimmung der Antibiotikaresistenz und/oder Virulenz, ohne dass eine vorherige Identifizierung des Erregers notwendig ist. Microarrays bestehen aus einem festen Substrat (meist Glas), auf dem mehrere Sonden einzeln gitterförmig angeordnet sind (RAOULT et al. 2004). Die Sonden können entweder PCR-Produkte oder Oligonukleotide sein und das zu untersuchende Material kann ein PCR Produkt, genomische- oder plasmid-DNA, RNA, Bakteriensuspension oder klinisches Probenmaterial sein (RAOULT et al. 2004). Die zu untersuchende DNA oder RNA wird extrahiert, markiert und an das Array hybridisiert (SUNDSFJORD et al. 2004). PERRETEN et al. (2005) führten den Microarray mit PCR Produkten durch. Dieses Verfahren dauert etwas länger als der von CALL et al. (2003) beschriebene Microarray mit Oligonukleotiden. Die zu identifizierende Erregeranzahl kann leicht erweitert werden, indem man dem Array Gensonden hinzufügt (CLEVEN et al. 2006). Nach seinem weiteren Ausbau und weitergehenden Automatisierung, kommt der DNA-Chip als Gerät für diagnostische Untersuchungen und auch für epidemiologische Studien in Frage (ROLAIN et al. 2004, CLEVEN et al. 2006).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Herkunft und Anzahl der Stämme

In der Studie wurden insgesamt 200 verschiedene *Y. enterocolitica*-Stämme des Bioserotyps 4/O:3 untersucht (siehe Tabelle 11), die sich in einem Aufbewahrungsröhrchen im Mikrobank-System® bei -80°C befanden.

Porcine *Y. enterocolitica*-Stämme:

140 Bakterienstämme wurden aus unterschiedlichem porcinem Untersuchungsmaterial des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, welche in den Jahren 1999 bis 2004 isoliert.

Humane *Y. enterocolitica* Stämme:

60 Bakterienstämme wurden aus Stuhlproben von Patienten mit Durchfall im Rahmen einer Dissertation des Instituts für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der LMU München von November 2001 bis Dezember 2002 in einem humanmedizinischen Diagnostiklabor in München isoliert.

Tabelle 11: Herkunft und Anzahl der im Resistenztest untersuchten *Y. enterocolitica* Stämme, Bioserotyp 4/O:3

Stamm Herkunft	Stamm Herkunft speziell	Anzahl Stämme
Mensch (N= 60)	Stuhl	60
Schwein (N= 80)	Kot	17
	Tonsillen	63
	Fleischstücke	19
Schweinefleisch- Produkte (N= 60)	Hackfleisch	22
	Innereien	14
	Zunge	5
Summe		200

N= Anzahl der untersuchten Stämme

3.1.2 Qualitätskontrollstämme

Zur Qualitätssicherung und zur Kontrolle der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der eingesetzten Reagenzien sowie der Durchführung der Methode wird vom CLSI Dokument M31-A2 (2002) die Verwendung ausgewählter Kontrollstämme empfohlen. Diese Referenzstämme sollten aus einer zuverlässigen Quelle stammen, z.B. von der American Type Culture Collection (ATCC), der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder anderen vergleichbaren Institutionen. Für die Studie wurden folgende Kontrollstämme der DSMZ verwendet:

E. coli DSM[®] 1103 (ATCC[®] 25922)

S. aureus DSM[®] 1104 (ATCC[®] 25923)

3.1.3 Antimikrobielle Wirkstoffe für die Agardiffusion

Die in der Studie zur Prüfung eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffe waren Substanzen, die für die Veterinär- und/oder für die Humanmedizin (bzw. äquivalent in der Tiermedizin) zugelassen waren, sowie Substanzen entsprechend des zu testenden Erregers. In Tabelle 12 sind die im Agardiffusionstest verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe mit Angabe der Testblättchenbeschickung dargestellt.

Tabelle 12: Belegung der im Agardiffusionstest verwendeten Testblättchen (entspricht den Vorgaben des CLSI, Ausnahme Colistin, Sulfamethoxazol)

Antimikrobieller Wirkstoff	Beschickung
Ampicillin	10 µg
Amoxycillin/ Clavulansäure	30 µg
Cefotaxim	30 µg
Aztreonam	30 µg
Chloramphenicol	30 µg
Colistin	25 µg
Erythromycin	15 µg
Gentamicin	10 µg
Streptomycin	10 µg
Nalidixic acid	30 µg
Ciprofloxacin	5 µg
Tetracyclin	30 µg
Sulfamethoxazol	25 µg
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	25 µg
Trimethoprim	5 µg

Die Beschickung der Blättchen (μg) erfolgte in Anlehnung an die Empfehlungen des CLSI-Dokumentes M31-A2 (2002) für Empfindlichkeitsprüfungen von Bakterien tierischer Herkunft. Für Colistin sind im CLSI keine Angaben über die Beschickung der Testblättchen, daher erfolgte die Beschickung nach Empfehlung der BSAC. Für Sulfamethoxazol wurden die gleichen Grenzwerte herangezogen, die vom CLSI für den Kombinationswirkstoff Sulphamethoxazol/Trimethoprim vorgegeben werden.

3.1.4 Layout der Mikrotiterplatte für die Bouillon-Mikrodilution

Für die Durchführung der Bouillon-Mikrodilution sind im Handel unterschiedlich vorgefertigte MTP erhältlich. Die mit lyophilisierten antimikrobiellen Wirkstoffen versehenen MTP des Nationalen Veterinärinstitut Schweden (SVA) für Monitoringstudien bei gramnegativen Bakterien (VetMIC™ GN-mo) entsprach vom Plattenlayout und von den Kosten, im Gegensatz zu denen der Firmen Trek-Diagnostic-Systems und Merlin, am ehesten den Anforderungen dieser Studie. Die MTP beinhalteten die in Tabelle 13 dargestellten antimikrobiellen Wirkstoffe.

Tabelle 13: Belegung der antimikrobiellen Wirkstoffe für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode (VetMIC™ GN-mo; Konzentrationen der Wirkstoffe sind in $\mu\text{g/ml}$ angegeben)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amp 32	Cip 1	Na 128	Gen 64	Ce 16	Sm 256	Te 64	Ff 32	Su 2048	T 32	Chl 128	Ctx 2
B	16	0,5	64	32	8	128	32	16	1024	16	64	1
C	8	0,25	32	16	4	64	16	8	512	8	32	0,5
D	4	0,12	16	8	2	32	8	4	256	4	16	0,25
E	2	0,06	8	4	1	16	4	Kan 16	128	2	8	0,12
F	1	0,03	4	2	0,5	8	2	8	64	1	4	0,06
G	0,5	0,016	2	1	0,25	4	1	4	32	0,5	2	c1
H	0,25	0,008	1	0,5	0,12	2	0,5	2	16	0,25	1	c2

Amp= Ampicillin, Cip= Ciprofloxacin, Na= Nalidixinsäure, Gen= Gentamicin, Ce= Ceftiofur, Sm= Streptomycin, Te= Tetracyclin, Ff= Florfenicol, Kan= Kanamycin, Su= Sulfamethoxazol, T= Trimethoprim, Chl= Chloramphenicol, Ctx= Cefotaxim, c1= Kontrolle mit Puffer, c2= Kontrolle mit Aqua dest.

3.2 Methode

Die Durchführung der Agardiffusions- und Bouillon-Mikrodilutionsmethode erfolgte in Anlehnung an die Durchführungsvorschrift M31-A2 des CLSI (2002) für die Empfindlichkeitsbestimmung bei veterinärmedizinisch relevanten Erregern.

3.2.1 Methode zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 Bakterien/ml

Trübungsstandard:

Im CLSI-Dokument M31-A2 (2002) wird zur Beimpfung der Agarplatten für die Durchführung der Empfindlichkeitsprüfung eine Bakteriensuspension mit einem Trübungsstandard nach McFarland von 0,5 empfohlen. Dies entspricht einer Bakteriendichte von $1-4 \times 10^8$ Bakterien/ml und einer optischen Dichte von 0,125 bei 550 nm. Um mit einer standardisierten Bakteriendichte von 10^8 Bakterien/ml arbeiten zu können, wurde in einem Vorversuch die gewünschte Keimzahldichte mit Hilfe der photometrischen Bestimmung und mit Hilfe des Tropfplattenverfahrens ermittelt. In Abbildung 2 sind die einzelnen Schritte abgebildet.

Herstellung einer Verdünnungsreihe (um die gewünschte Bakteriendichte von 10^8 Bakterien/ml zu erreichen):

Tag 1: Die zu untersuchenden Stämme auf Plate Count Agarplatten über Nacht 24-30 Stunden bei 30°C (Referenzstämme *E. coli* DSM[®] 1103 und *S. aureus* DSM[®] 1104 bei 37°C) bebrüten.

Tag 2: Von jeder Platte 5 Kolonien mittels Öse in ein Reagenzglas mit 5 ml Peptonwasser suspendieren, mittels Vortex-Mixer homogenisieren und 16-20 Stunden bei 30°C (Referenzstämme bei 37°C) bebrüten = 0 Lösung

Tag 3: Ausgehend von der Bakteriensuspension des Vortages eine Verdünnungsreihe bis 10^{-9} herstellen. Dafür aus dem Röhrchen mit den 5 ml Bakteriensuspension 1 ml entnehmen und in 9 ml Peptonwasser geben, gut homogenisieren und jeweils neue Pipettenspitze verwenden.

Plate Count Platten im Doppelansatz mit je 6 Verdünnungsstufen (10^{-4} bis 10^{-9}) beschriften, aus der jeweiligen Peptonwasser-Verdünnungsstufe 50 μl pro Feld pipettieren und mit der Pipettenspitze nach innen verstreichen, warten bis die Flüssigkeit von dem Nährboden aufgenommen wurde und anschließend über Nacht 18-24 Stunden bei 30°C (Referenzstämmen bei 37°C) bebrüten.

Für die photometrische Bestimmung der Bakterienzeldichte:

Von der 0- Lösung eine weitere Verdünnungsreihe bis 10^{-3} herstellen. 0-Probe messen: dafür 100 μl in eine Küvette pipettieren und im Photometer bei 600 nm die optische Dichte bestimmen, im Anschluss daran, die 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnungsstufen photometrisch messen. Die Ergebnisse der photometrischen Bestimmung sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tag 4: Auswerten der Tropfplatten

Es werden jeweils zwei Sektoren auf den Agarplatten ausgezählt die zwischen 5 und 50 Kolonien aufweisen und anschließend anhand folgender Formel das Ergebnis berechnet:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} = \frac{4+15+4+19}{2 \times 1 + 2 \times 0,1} = 19,1$$

Quelle: N.N. (1984)

Ergebnis: $19,1 \times 20 \times 10^7 = 3,8 \times 10^9$ KBE/ml

\bar{c} = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

$\sum c$ = Summe der Kolonien aller Sektoren, die zur Berechnung herangezogen werden

n_1 = Anzahl der Sektoren der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Sektoren der nächst höheren Verdünnungsstufe

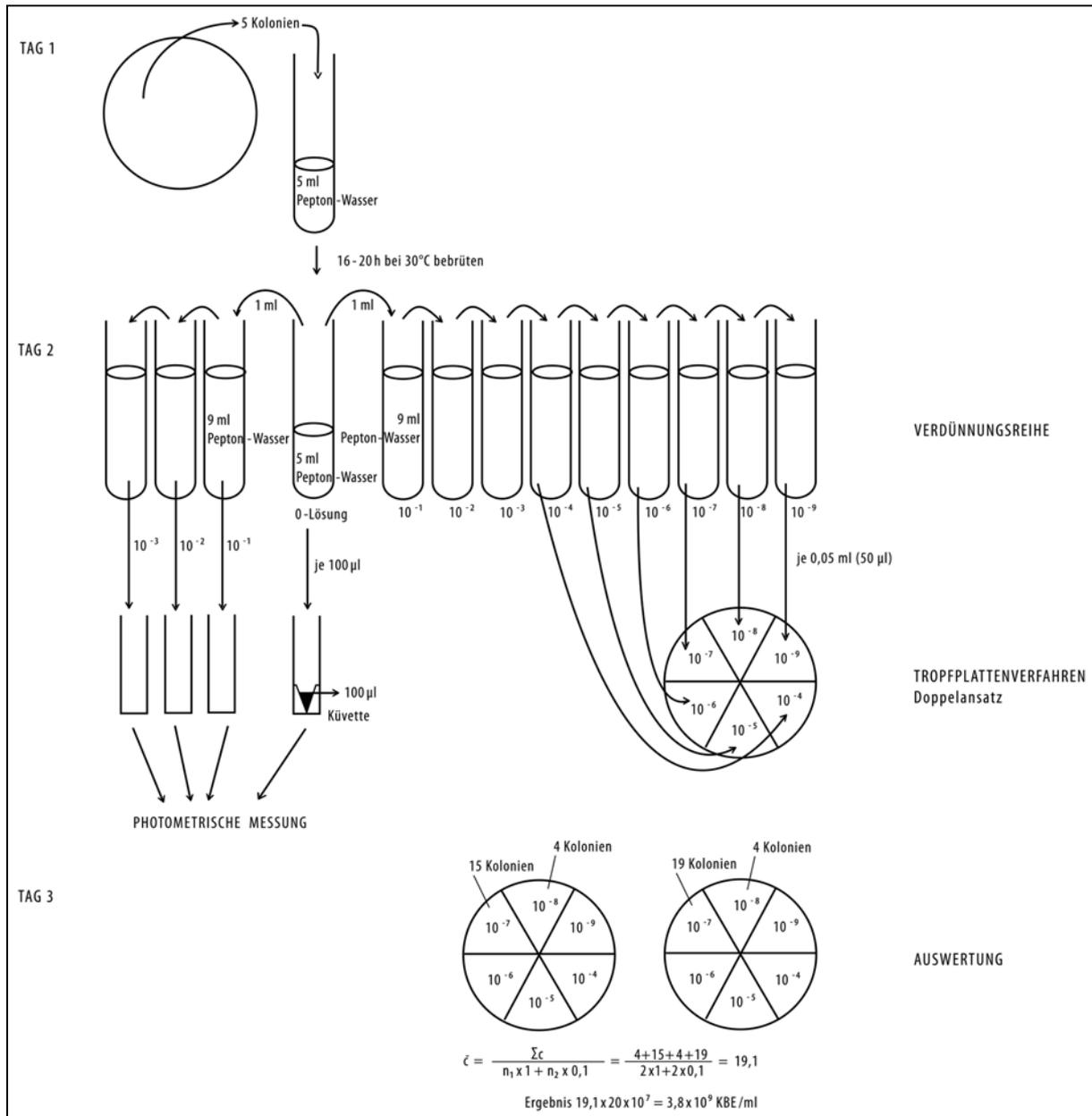


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 KBE/ml

3.3 Ergebnisse der Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 KBE/ml

In jeweils aufeinander folgenden Versuchen wurde sowohl die optische Dichte als auch die Bakteriendichte mit Hilfe der Keimzählung durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 600 nm und einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} , ergab die photometrische Bestimmung, als Durchschnittswert der vier Versuche bei *E. coli* eine optische Dichte von 0,236, bei *S. aureus* 0,206, bei *Y. enterocolitica* (HYE 9297) 0,133, bei *Y. enterocolitica* (HYE 2093) 0,140 und bei *Y. enterocolitica* (HYE 8205) 0,156. Die Keimzahlbestimmung erfolgte in drei Versuchsdurchläufen. Im Durchschnitt wurde bei *E. coli* eine Bakteriendichte von $1,6 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt. Bei *S. aureus* betrug die durchschnittliche Bakteriendichte $1,16 \times 10^9$ KBE/ml, bei *Y. enterocolitica* (HYE 9297) ergab die Keimzählung $1,9 \times 10^9$ KBE/ml, bei *Y. enterocolitica* (HYE 2093) waren es $2,1 \times 10^9$ KBE/ml und bei *Y. enterocolitica* (HYE 8205) wurde eine Keimdichte von $2,7 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Durchschnittliche Ergebnisse der photometrischen Dichtebestimmung sowie der Keimzählung mittels Tropfplattenverfahren

Stamm	Verdünnung	Optische Dichte bei 600 nm	Bakteriendichte x 10^9 /ml
<i>E. coli</i> DSM 1103	0	1,604	1,6
	10^{-1}	0,236	-
	10^{-2}	0,027	-
	10^{-3}	0,004	-
<i>S. aureus</i> DSM 1104	0	2,403	1,16
	10^{-1}	0,206	-
	10^{-2}	0,023	-
	10^{-3}	0,004	-
<i>Y. enterocolitica</i> HYE 9297	0	0,850	1,9
	10^{-1}	0,133	-
	10^{-2}	0,011	-
	10^{-3}	0,001	-
<i>Y. enterocolitica</i> HYE 2093	0	0,707	2,1
	10^{-1}	0,140	-
	10^{-2}	0,015	-
	10^{-3}	0,003	-
<i>Y. enterocolitica</i> HYE 8205	0	0,940	2,7
	10^{-1}	0,156	-
	10^{-2}	0,017	-
	10^{-3}	0,001	-

Bei einer 1:10 Verdünnung der 0-Lösung, ist dementsprechend eine Bakteriendichte von circa $1-3 \times 10^8$ KBE/ml zu erwarten. Diese Verdünnungsstufe wurde zum Ausstreichen der Agarplatten im Agardiffusionstest verwendet. Sie wurde ebenfalls als Ausgangsinokulum zur Herstellung der Keimsuspension im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren verwendet.

3.3.1 Anzuchtbedingungen der Referenz- und der Bakterienstämme

Die Anzucht der Bakterienstämme für die Empfindlichkeitsbestimmung erfolgte jeweils am Vortag. Dafür wurden die *Yersinia*-Stämme direkt aus der Mikrobank auf Blutagarplatten (BAP) ausgestrichen und bei 30°C für 24-30 Stunden bebrütet; *S. aureus* und *E. coli* wurden von der auf BAP vorhandenen Subkultur auf Plate Count Platten ausgestrichen und 24-30 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.3.2 Agardiffusionsmethode

Die Durchführung der Agardiffusionsmethode erfolgte nach den Richtlinien des CLSI-Dokument M31-A2 aus dem Jahr 2002.

Zur Herstellung des Inokulums wurden 5 Kolonien mit der Impföse in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon (MH-Bouillon) überimpft, gut homogenisiert (Vortex-Mixer) und 16-20 Stunden bei 30°C bebrütet. Die bei jedem Versuchsdurchgang mitgeführten Kontrollstämme wurden bei 37°C bebrütet. Von der Flüssigkultur wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt (1 ml von der Flüssigkultur in 9 ml MH-Bouillon-Röhrchen) und mit Hilfe des Vortex-Mixers gut gemischt. Zusätzlich wurde jedes verdünnte Inokulum visuell mit dem McFarland 0,5 Standard verglichen und gegebenenfalls mit MH-Bouillon verdünnt. Diese Verdünnungsstufe wurde für das weitere Vorgehen verwendet. Ein steriler Tupfer wurde in die Bakteriensuspension im Röhrchen eingetaucht und anschließend oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an die Röhrchenwand angeedrückt, um überschüssiges Inokulum aus dem Tupfer zu entfernen. Dann erfolgte der gleichmäßige dreifache Ausstrich über die gesamte Platte, wobei die MH-Agarplatte jedes Mal um 60° gedreht wurde. Nach der Beimpfung der Agarplatten wurden diese zum Abtrocknen des Inokulums für 3-5 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Wirkstoffträger (maximal

vier Testblättchen pro Platte) mit Hilfe des Dispensers auf die Agaroberfläche aufgebracht. Anschließend wurden die Platten 20-22 Stunden bei 30°C (bzw. die Kontrollstämme bei 37°C) bebrütet. Nach der Inkubation wurden die Hemmhofdurchmesser, einschließlich dem des Testblättchens, mit einem Lineal bis auf den Millimeter genau gemessen und in eine Tabelle eingetragen. In Abbildung 3 ist die Durchführung der Agardiffusionsmethode schematisch dargestellt. Bei dem Wirkstoff Sulfamethoxazol wurde eine 80%ige Wachstumshemmung als Hemmhof gewertet. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser werden, für jeden Wirkstoff getrennt, in die Bewertungsstufen „sensibel“ (S), „intermediär“ (I) und „resistent“ (R) eingeteilt. Da für Yersinien keine bekannten Grenzwerte vorliegen, wurden die Hemmhofbewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae* herangezogen (Tabelle 15). In Tabelle 16 sind die Hemmhofbewertungsschlüssel für die mitgeführten Referenzstämme angegeben.

Tabelle 15: Hemmhofbewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae* (Angaben entsprechen den Vorschriften des CLSI)

Antimikrobieller Wirkstoff	µg/ Testblättchen	Durchmesser (mm)		
		R	I	S
Ampicillin	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicillin/Clavulansäure	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefotaxim	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Aztreonam	30	≤ 15	16-21	≥ 22
Chloramphenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Colistin	25*	≤ 14		≥ 15
Erythromycin	15	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicin	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Streptomycin	10	≤ 11	12-14	≥ 15
Nalidixinsäure	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Ciprofloxacin	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Tetracyclin	30	≤ 14	15-18	≥ 19
Sulphamethoxazol [#]	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Sulphamethoxazol/Trim	25	≤ 10	11-15	≥ 16
Trimethoprim	5	≤ 10	11-15	≥ 16

Trim= Trimethoprim

* = für Colistin entspricht die Beladung den Vorschlägen der BSAC

[#]=für Sulphamethoxazol wurden die gleichen Grenzwerte herangezogen, die vom CLSI für den Kombinationswirkstoff Sulphamethoxazol/Trimethoprim vorgegeben werden

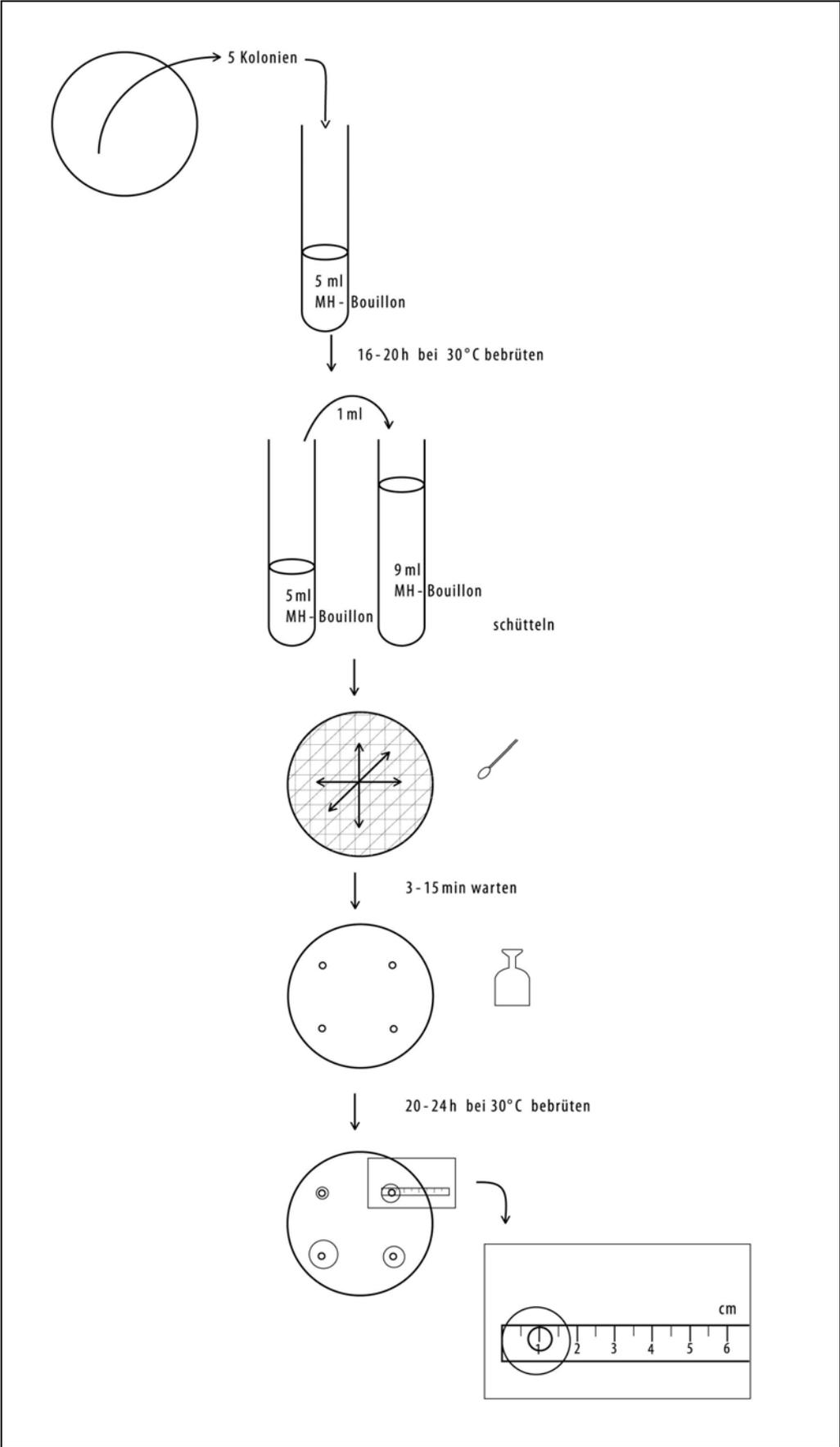


Abbildung 3: Durchführung der Agardiffusionsmethode

Tabelle 16: Hemmhofbewertungsschlüssel für Qualitätskontrollstämme (Angaben entsprechen den Vorschriften des CLSI)

Antimikrobieller Wirkstoff	µg/Testblättchen	<i>E. coli</i> DSM® 1103	<i>S. aureus</i> DSM® 1104
Ampicillin	10	16-22	27-35
Amoxicillin/Clavulansäure	30	18-24	28-36
Cefotaxim	30	34-44*	-
Aztreonam	30	36-40*	-
Chloramphenicol	30	21-27	19-26
Colistin	25	16-20*	-
Erythromycin	15	-	22-30
Gentamicin	10	19-26	19-27
Streptomycin	10	12-20	14-22
Nalidixinsäure	30	22-28	9-17*
Ciprofloxacin	5	30-40	-
Tetracyclin	30	18-25	24-30
Sulphamethoxazol	25	kA	kA
Sulphamethoxazol/ Trimethoprim	25	23-29	24-32
Trimethoprim	5	21-28	19-26

* = Quelle BSAC; kA= keine Angaben

3.3.3 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Die Durchführung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften des CLSI- Dokumentes M31-A2 aus dem Jahr 2002.

Herstellung des Inokulums und Plattenbeimpfung

Die Herstellung des Inokulums wurde entsprechend der Vorgabe des CLSI Dokument M31-A2 (2002) so hergestellt, dass die Bakteriendichte ca. 5×10^5 KBE/ml betragen soll. Die Einsaatdichte darf 1×10^5 KBE/ml nicht unterschreiten und 9×10^5 KBE/ml nicht überschreiten. Bei der Mikrodilutionsmethode muss kationenadjustierte MH-Bouillon (CAMHB) verwendet werden, das bedeutet, dass sie eine Konzentration von 20 bis 25 Milligramm (mg) Kalzium [Ca^{2+}]/Liter und 10 bis 15 mg Magnesium [Mg^{2+}]/Liter aufweist. Sonst kann es zu falschen Ergebnissen bei der MHK-Bestimmung von Tetracyclinen bei allen Bakterien kommen. Es wurde, wie bei Durchführung der Agardiffusionsmethode, über Nacht eine Bakteriensuspension mit der im Vorversuch (siehe Kapitel 3.3) ermittelten Konzentration von $1-3 \times 10^9$ KBE/ml hergestellt und als Ausgangssuspension verwendet. Aus diesem Röhrchen wurde zuerst eine 1:10 Verdünnung hergestellt (1 ml in 9 ml CAMHB) und gut

homogenisiert um eine Dichte zu erzielen, die dem McFarland-Standard 0,5 entspricht. Von dieser Bakteriensuspension wurden 50 µl entnommen und in 10 ml CAMHB gegeben und mittels Vortex-Mixer gut homogenisiert. Diese Suspension war das für die Beimpfung der MTP zu verwendende Inokulum, welches die zu erwartenden Bakteriendichte von $2-8 \times 10^5$ KBE/ml enthielt. Zur Dichtekontrolle wurden bei jedem Arbeitsdurchgang die Keimzahlen der verwendeten Bakteriensuspension bestimmt. Dafür wurden aus dem Inokulum 10 µl in ein Röhrchen mit 10 ml physiologischer NaCl-Lösung überimpft und mittels Vortex-Mixer gut homogenisiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Verdünnung auf eine BAP mit einem sterilen Spatel ausgespatelt und die Platten bei 30°C ca. 20 Stunden bebrütet. Das (Rest-) Inokulum wurde in eine sterile Wanne gegeben und in jede Kavität der MTP (VetMIC™ GN-mo-Platten) 50 µl des Inokulums luftblasenfrei pipettiert. Die MTP wurden mit der beigefügten Klebefolie verschlossen und bei 30°C ca. 20 Stunden inkubiert. Zur Absicherung der Ergebnisse sowie zur Qualitätskontrolle wurde bei jeder Empfindlichkeitstestung der Referenzstamm *E. coli* DSM® 1103 mitgeführt und entsprechend bei 37°C bebrütet.

Auswertung der MTP:

Um zuverlässige MHK-Ergebnisse zu erzielen, sollte die Bakteriendichte zwischen $2-8 \times 10^5$ KBE/ml liegen. Hierfür werden die Dichtekontrollplatten ausgezählt. Wenn auf den BAP zwischen 20 und 80 Bakterienkolonien gezählt werden, kann man mit der MHK-Ablesung der MTP fortfahren. Die Auswertung der bewachsenen und unbewachsenen Vertiefungen erfolgte mit Hilfe eines Spiegels. Das Wachstum in der MTP sollte als Knöpfe oder Trübung deutlich sichtbar und die MHK leicht abzulesen sein. Als MHK gilt die niedrigste Konzentrationsstufe in µg/ml des jeweiligen antimikrobiellen Wirkstoffes, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr feststellbar ist. Dazu wird der Trübungsgrad in den Vertiefungen der MTP, die den antimikrobiellen Wirkstoff enthalten, mit dem der Wachstumskontrollvertiefung (enthält keinen antibakteriellen Wirkstoff), die in jedem Testansatz mitverwendet werden, verglichen. Die Wachstumskontrollen müssen grundsätzlich trüb (bewachsen) sein, andernfalls muss der Test wiederholt werden. Die Ergebnisse werden in eine Tabelle eingetragen und die Bakterienstämme, entsprechend den Grenzwerten für *Enterobacteriaceae*, in die Kategorien „sensibel“ (S), „intermediär“

(I) oder „resistent“ (R) eingeteilt. Da auch hier wie bei der Agardiffusionsmethode keine bekannten Grenzwerte für Yersinien vorliegen, wurden entsprechend die MHK-Bewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae* herangezogen (Tabelle 17). In Tabelle 18 sind die MHK-Bewertungsschlüssel für den mitgeführten Referenzstamm dargestellt.

Tabelle 17: Minimale Hemmstoffkonzentration-Bewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae* (Angaben entsprechen den Vorschriften des CLSI)

Antimikrobielle Wirkstoffe	Minimale Hemmstoffkonzentration (µg/ml)		
	sensibel	intermediär	resistent
Ampicillin	<8	16	>32
Cefotaxim	<8		>32
Ceftiofur	<2	4	>8
Chloramphenicol	8	16	>32
Florfenicol	<2	4	>8
Gentamicin	<4	8	>16
Kanamycin	<16	32	>64
Streptomycin	<8*		>16*
Nalidixinsäure	<16		>32
Ciprofloxacin	<1		>2
Tetracyclin	<4	8	>16
Sulfamethoxazol	kA		
Sulfisoxazol	<256		>512
Trimethoprim	<8		>16

*= Quelle CA-SFM; kA= keine Angaben; für Sulfamethoxazol wurden Grenzwerte von Sulfisoxazol verwendet.

Tabelle 18: Minimale Hemmstoffkonzentration für den Qualitätskontrollstamm *E. coli* DSM® 1103 bei Verwendung von MH-Bouillon (Angaben entsprechenden den Vorschriften des CLSI)

Antimikrobielle Wirkstoffe	<i>E.coli</i> DSM® 1103
Ampicillin	2-8
Cefotaxim	0,06*
Ceftiofur	0,25-1
Chloramphenicol	2-8
Florfenicol	2-8
Gentamicin	0,25-1
Kanamycin	1-4
Streptomycin	#
Nalidixinsäure	1-4
Ciprofloxacin	0,004-0,016
Tetracyclin	0,5-2
Sulfamethoxazol	kA
Sulfisoxazol	8-32
Trimethoprim	0,5-2

*= Angaben gemäß BSAC, #= Angaben gemäß CA-SFM; kA= keine Angaben

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Resistenzbestimmung im Agardiffusionstest

200 *Y. enterocolitica*-Stämme vom Bioserotyp 4/O:3 wurden auf folgende 15 antimikrobielle Wirkstoffe getestet: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefotaxim, Aztreonam, Chloramphenicol, Colistin, Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Sulphamethoxazol, Sulphamethoxazol/Trimethoprim und Trimethoprim. Insgesamt betrachtet waren die meisten Wirkstoffe gegen die untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme wirksam. Eine Ausnahme stellten Ampicillin und Erythromycin dar, gegen welche die Yersinien fast ausschließlich resistent waren. Alle 200 Stämme (100,0 %) waren gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Cefotaxim, Aztreonam, Chloramphenicol, Colistin, Gentamicin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Tetracyclin und Trimethoprim empfindlich. Gegenüber Ampicillin waren 2 Stämme (1,0 %) sensibel, sie stammten aus einer humanen Stuhlprobe. Kein Stamm war für Erythromycin empfindlich. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Abbildung 4.

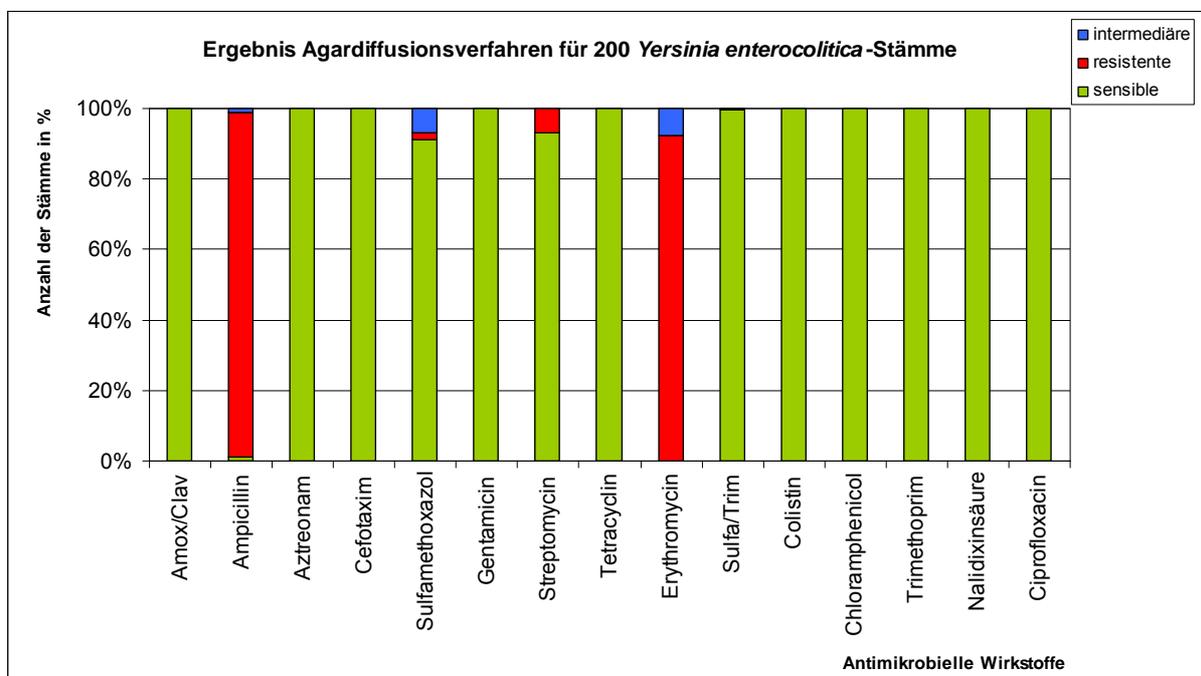


Abbildung 4: Prozentuale Ergebnisverteilung der mittels Agardiffusionsmethode verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe mit Angabe sensibler, intermediärer und resistenter *Y. enterocolitica*-Stämme (Amox/Clav= Amoxicillin/Clavulansäure, Sulfa/Trim= Sulphamethoxazol/Trimethoprim)

Im Folgenden stellen die Abbildungen 5a und 5b die Verteilung der HHD für die im Agardiffusionstest verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe dar. Dabei zeigen die Pfeile die Grenzwerte an, die eine Einteilung in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ ermöglichen (siehe Tabelle 15). Der Raum zwischen den beiden Pfeilen stellt den intermediären Bereich dar. Links davon befindet sich der resistente, rechts der sensible Bereich. Bei Ampicillin und Erythromycin wurden jeweils die kleinsten HHD ermittelt. Die überwiegende Anzahl der untersuchten Stämme befindet sich im resistenten Bereich. Im Gegensatz dazu wurden bei den Wirkstoffen Aztreonam, Cefotaxim und Ciprofloxacin die größten HHD, mit Werten um die 40 mm, ermittelt. Dabei lagen die HHD weit von den Grenzwerten entfernt. Dies deutet auf eine große Empfindlichkeit gegenüber dem Wirkstoff hin. Ebenfalls große HHD wurden bei Chloramphenicol, dem Kombinationswirkstoff Sulphamethoxazol/Trimethoprim, sowie bei Nalidixinsäure erhalten. Bei den antimikrobiellen Substanzen Amoxicillin/Clavulansäure, Gentamicin, Streptomycin, Tetracyclin, Sulphamethoxazol und Trimethoprim befinden sich die HHD in unmittelbarer Nähe zum Grenzwert. Durch ein ungenaues Ablesen der HHD kann es dann eventuell zu einer falschen Kategorisierung der Bakterien kommen. Die HHD von Colistin befanden sich ebenfalls nahe des Grenzwertes, mit Werten um die 20 mm wurden bei diesem Wirkstoff die einheitlichsten HHD erzielt.

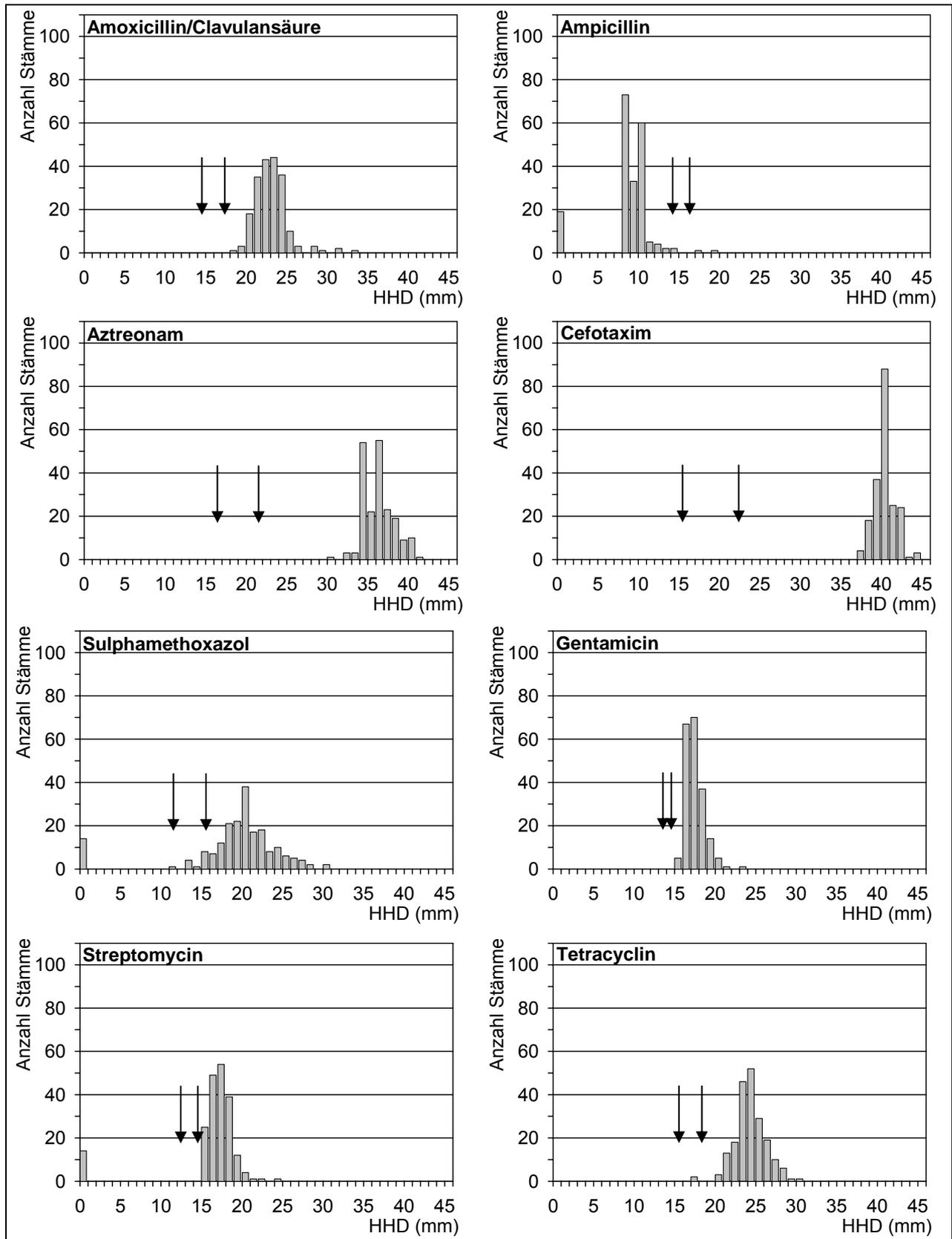


Abbildung 5a: Verteilung der Hemmhofdurchmesser für die mittels Agardiffusionsverfahren getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe bei 200 *Y. enterocolitica*-Stämmen (Bioserotyp 4/O:3); Pfeile zeigen die Grenzwerte an, die in Tabelle 15 angegeben sind

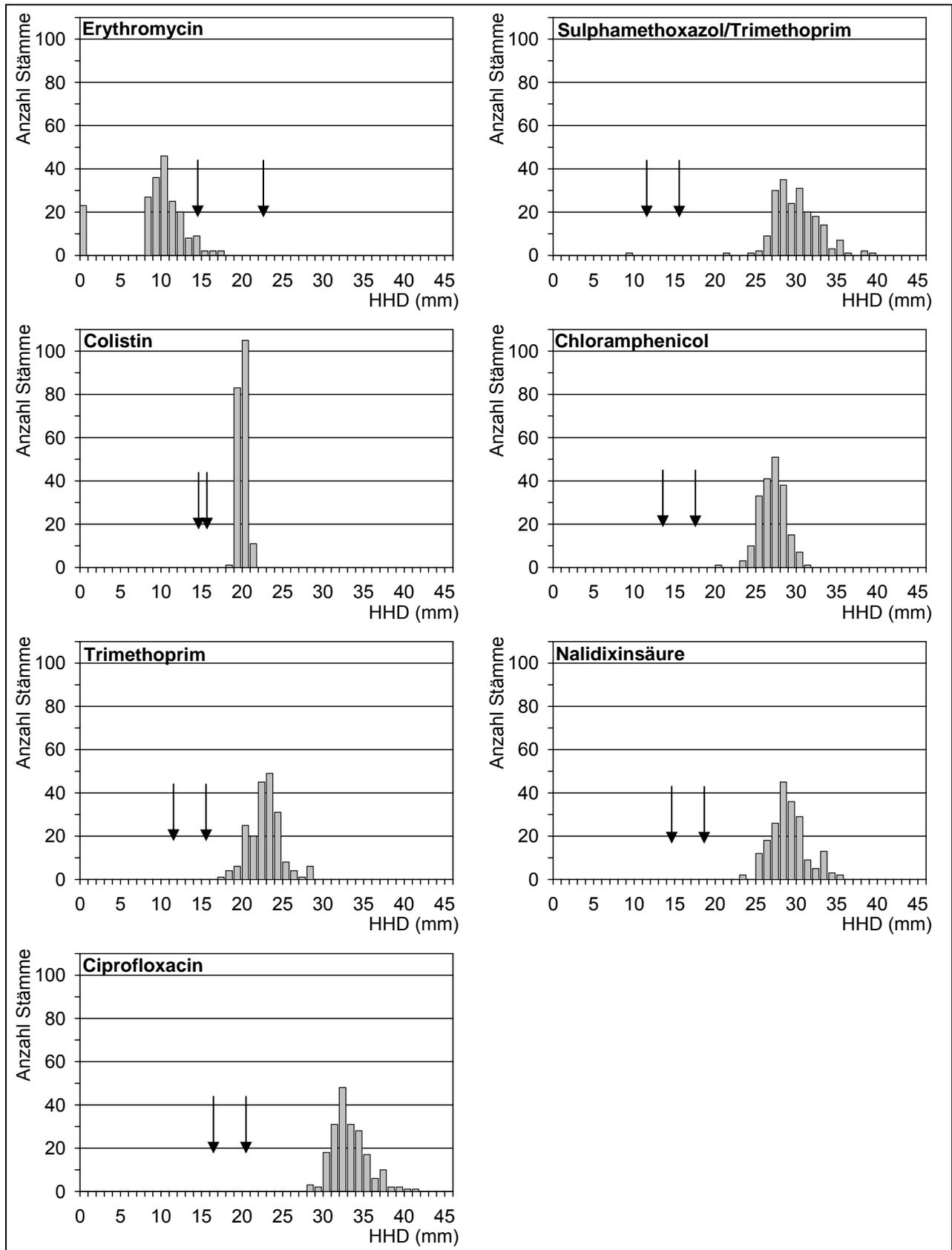


Abbildung 5b: Verteilung der Hemmhofdurchmesser für die mittels Agardiffusionsverfahren getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe bei 200 *Y. enterocolitica*-Stämmen (Bioserotyp 4/O:3); Pfeile zeigen die Grenzwerte an, die in Tabelle 15 angegeben sind

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der resistenten und intermediären untersuchten *Y. enteocolitica*-Stämme mit Angabe ihrer Herkunft dargestellt.

Insgesamt waren 196 (98,0 %) der 200 untersuchten Stämme gegen **Ampicillin** resistent. Von den 60 untersuchten Stämmen aus Schweinefleischprodukten (d.h. Fleischstücke, Hackfleisch, Innereien, Zunge) waren alle 60 (100,0 %) resistent, ebenso wie 79 (98,8 %) von 80 Stämmen aus Schwein (d.h. Schweinekot, Schweinetonsillen) und 57 (95,5 %) von 60 Stämmen aus humanen Stuhlproben. Jeweils ein Stamm aus einer humanen Stuhlprobe sowie ein Stamm aus einer Schweinetonsille wurden als intermediär bewertet.

Gegenüber **Erythromycin** wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. Hier wurden insgesamt 185 (92,5 %) von 200 Stämmen als resistent ermittelt. Beim Schwein wurde mit 76 (95%) von 80 Stämmen die höchste Prozentzahl resistenter Yersinien gefunden, gefolgt von 56 (93,3 %) resistenten Stämmen bei 60 untersuchten aus Schweinefleischprodukten sowie 53 (88,3 %) von 60 Stämmen aus humanen Stuhlproben. Die meisten intermediären Yersinien wurden mit 7 (11,7 %) resistenten von 60 untersuchten Stämmen aus humanen Stuhlproben isoliert. Bei Schweinefleischprodukten waren 4 (6,7 %) von 60 Stämmen intermediär, bei Schwein waren es 4 (5,0 %) von 80.

Gegen **Streptomycin** waren insgesamt 14 (7,0 %) der 200 untersuchten Stämme resistent. Von den 80 untersuchten Stämmen aus Schwein waren 7 (8,8 %) resistent, des Weiteren waren 4 (6,7 %) von 60 Stämmen aus Schweinefleischprodukten und 3 (5,0 %) von 60 Stämmen aus humanen Stuhlproben resistent.

Gegenüber **Sulphamethoxazol** waren insgesamt 4 (2 %) Stämme von 200 resistent. 2 (3,3 %) von 60 Stämmen humaner Herkunft waren resistent, außerdem 1 (1,7 %) von 60 aus Schweinefleischprodukten sowie 1 (1,3 %) von 80 Stämmen aus Schwein. 14 (7,0 %) Stämme der 200 untersuchten wurden als intermediär gegen Sulphamethoxazol bewertet.

Bei den Schweinefleischprodukten wurde mit 7 (11,7 %) von 60 Stämmen die höchste Prozentzahl intermediärer Yersinien gefunden, gefolgt von 3 (5,0 %) intermediären Stämmen bei 60 untersuchten humanen Stuhlproben sowie 4 (5,0 %) von 80 Stämmen aus Schwein.

Gegenüber **Sulphamethoxazol/Trimethoprim** war nur ein Stamm resistent, diese Yersinie stammte aus einer menschlichen Stuhlprobe und war die einzige, die sowohl gegen Sulphamethoxazol, Sulphamethoxazol/Trimethoprim und Streptomycin **Multiresistenzen** aufwies.

Tabelle 19: Ergebnisse der im Agardiffusionstest untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme des Bioserotyps 4/O:3 mit Angabe der Stammherkunft

Antimikrobieller Wirkstoff	Mensch Stuhl		Schwein Kot		Schwein Tonsillen		Fleisch Stücke		Hackfleisch		Innereien		Zunge	
	N= 60		N= 17		N= 63		N= 19		N= 22		N= 14		N= 5	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
Ampicillin	1	57	0	17	1	62	0	19	0	22	0	14	0	5
Amox/Clav	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefotaxim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aztreonam	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chloramphenicol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colistin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erythromycin	7	53	0	17	4	59	1	18	2	20	0	14	1	4
Gentamicin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Streptomycin	0	3	0	1	0	6	0	0	0	2	0	2	0	0
Nalidixinsäure	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tetracyclin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulphamethoxazol	3	2	1	0	3	1	2	1	2	0	2	0	1	0
Sulpha/Trim	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trimethoprim	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N= Anzahl untersuchte Stämme; I= intermediär, R= resistent

Amox/Clav= Amoxicillin/Clavulansäure, Sulpha/Trim= Sulphamethoxazol/Trimethoprim

4.2 Vergleich der mittels Agardiffusionsmethode ermittelten Ergebnisse der *Y. enterocolitica*-Stämme humaner und porciner Herkunft

Prozentual gesehen, wurden sowohl bei den 60 untersuchten humanen (Stuhl) als auch bei den insgesamt 140 porcinen Stämmen (d.h. Fleischstücke, Hackfleisch, Innereien, Zunge, Tonsillen, Kot) ähnliche Resultate ermittelt.

Aus Tabelle 20 ist ersichtlich, dass die porcinen Stämme im Gegensatz zu den humanen nur geringfügig häufiger Resistenzen gegenüber Ampicillin (99,3 % vs. 95,0 %), Erythromycin (94,3 % vs. 88,3 %) und Streptomycin (7,9 % vs. 5,0 %) zeigten. Gegenüber Sulphamethoxazol waren 3,3 % der humanen Yersinien resistent, wohingegen nur bei 1,4 % der porcinen Stämme Resistenzen auftraten. Gegen den Kombinationswirkstoff Sulphamethoxazol/Trimethoprim wurde nur ein einziger Stamm ermittelt. Diese Yersinie war humanen Ursprungs und multiresistent. Entsprechende Angaben für intermediäre Stämme sind ebenfalls der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Ergebnisvergleich humaner und porciner *Y. enterocolitica*-Stämme aus der Agardiffusionsmethode

Antimikrobieller Wirkstoff	Humane Yersinien N= 60				Porcine Yersinien N= 140			
	intermediär		resistent		intermediär		resistent	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ampicillin	1	1,7	57	95,0	1	0,7	139	99,3
Erythromycin	7	11,7	53	88,3	8	5,7	132	94,3
Streptomycin	0	0	3	5,0	0	0	11	7,9
Sulfamethoxazol	3	5,0	2	3,3	11	7,9	2	1,4
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	0	0	1	1,7	0	0	0	0

N= Anzahl der untersuchten Stämme

4.3 Ergebnisse der Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Mit Hilfe des Bouillon-Mikrodilutionsverfahren wurde bei 110 *Y. enterocolitica*-Stämmen die MHK bestimmt. 44 dieser Stämme wurden in der Agardiffusion als resistent oder intermediär ermittelt, während bei 11 Stämmen die Auswertung von Sulphamethoxazol fraglich war. 55 Stämme, ebenfalls in der Agardiffusionsmethode getestet, wurden als repräsentative Probe hinzugezogen. Die im Handel erhältlichen, mit lyophilisierten antimikrobiellen Wirkstoffen versehenen MTP wurden vom Nationalen Veterinärinstitut Schweden bezogen. Sie beinhalteten die antimikrobiellen Wirkstoffe Ampicillin, Cefotaxim, Ceftiofur, Chloramphenicol, Florfenicol, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Sulphamethoxazol und Trimethoprim. Gegenüber Florfenicol wurden keine resistenten Yersinien nachgewiesen, jedoch reichten die Verdünnungsstufen in den vorgefertigten MTP nicht aus, um eine Aussage darüber zu treffen, ob die Stämme intermediär oder empfindlich waren. Deshalb wurde dieser antimikrobielle Wirkstoff nicht bewertet. Die mittels Bouillon-Mikrodilution ermittelten MHK-Ergebnisse aller 110 *Y. enterocolitica*-Stämme sind in Tabelle 21 dargestellt.

Einheitliche Ergebnisse wurden bei Ciprofloxacin (0,03-0,06 µg/ml), Nalidixinsäure (\leq 1-4 µg/ml), Gentamicin (1-2 µg/ml), Ceftiofur (\leq 0,12-0,5 µg/ml), Kanamycin (\leq 2-8 µg/ml), Trimethoprim (0,5-4 µg/ml), Chloramphenicol (\leq 1-8 µg/ml) und Cefotaxim (\leq 0,06-0,25 µg/ml) gefunden. Gegenüber diesen Wirkstoffen waren alle 110 Stämme (100,0 %) sensibel. Bei Ampicillin war kein Stamm sensibel, gegenüber Streptomycin, Tetracyclin und Sulphamethoxazol traten neben empfindlichen auch resistente bzw. intermediäre Stämme auf.

Tabelle 21: Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilution ermittelten MHK-Werte bei 110 *Y. enterocolitica*-Stämmen (4/O:3)

Antimikrobieller Wirkstoff	Breakpoint (µg/ml)			Anzahl	Stämme	MHK (µg/ml)	S	I	R
	S	I	R						
Ampicillin	<8	16	>32	S	0	16 ≥ 32	0	0	0
				I	3		0	3	0
				R	107		0	0	107
Ciprofloxacin	<1		>2	S	110	0,03-0,06	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Nalidixinsäure	<16		>32	S	110	≤ 1-4	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Gentamicin	<4	8	>16	S	110	1-2	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Ceftiofur	<2	4	>8	S	110	≤ 0,12-0,5	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Streptomycin	<8		>16	S	93	4-8 0 16-≥ 256	93	0	0
				I	0		0	0	0
				R	17		0	0	17
Tetracyclin	<4	8	>16	S	109	1-4 8	109	0	0
				I	1		0	1	0
				R	0		0	0	0
Kanamycin	<16	32	>64	S	110	≤ 2-8	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Sulphamethoxazol	<256		>512	S	109	≤ 16-64 ≥ 2048	109	0	0
				I	0		0	0	0
				R	1		0	0	1
Trimethoprim	<8		>16	S	110	0,5-4	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Chloramphenicol	<8	16	>32	S	110	≤ 1-8	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0
Cefotaxim	<8		>32	S	110	≤ 0,06-0,25	110	0	0
				I	0		0	0	0
				R	0		0	0	0

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilution für die resistenten und intermediären *Y. enterocolitica*-Stämme nach ihrer Herkunft getrennt dargestellt.

Insgesamt waren 107 (97,3 %) von 110 Stämmen mit MHK-Werten ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ resistent gegen **Ampicillin**. Aus 31 humanen Stämmen waren 30 (96,8 %), von 39 Stämmen aus Schwein waren 38 (97,4 %) und aus 40 Schweinefleischprodukten waren 39 (97,5 %) Stämme resistent. Jeweils ein *Y. enterocolitica*-Stamm aus humanem Stuhl (3,2%), aus Schwein (2,6%) und aus Schweinefleischprodukten (2,5%) wurde als intermediär gegen Ampicillin ermittelt.

17 (15,5 %) der 110 untersuchten Stämme waren gegen **Streptomycin** (MHK 16 bis ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) resistent. Der größte prozentuale Anteil resistenter Stämme war mit 8 (20,5 %) von 39 Stämmen beim Schwein zu finden, gefolgt von 4 (12,9 %) von 31 Stämmen aus humanen Stuhlproben und 5 (12,5 %) von 40 Yersinien-Stämmen aus Schweinefleischprodukten. Keiner der untersuchten Stämme wurde als intermediär gegen Streptomycin gewertet.

Gegenüber **Sulphamethoxazol** wurde nur 1 (3,2 %) der 31 humanen Stämmen als resistent (MHK > 2048 $\mu\text{g/ml}$) ermittelt. Dieser Stamm zeigte als einziger in der gesamten Untersuchung **Multiresistenzen** gegen Sulphamethoxazol und Streptomycin. Derselbe Stamm wurde zuvor in der Agardiffusionsmethode als multiresistent gegen Sulphamethoxazol, Sulphamethoxazol/Trimethoprim und Streptomycin ermittelt.

Lediglich eine Yersinie, welche aus einer Schweinetonsille isoliert wurde, wurde als intermediär gegen **Tetracyclin** bewertet.

Tabelle 22: Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilution ermittelten resistenten und intermediären *Y. enterocolitica*-Stämme des Bioserotyps 4/O:3 mit Angabe ihrer Herkunft

Antimikrobielle Wirkstoffe	Mensch Stuhl N= 31		Schwein Kot N= 3		Schwein Tonsillen N= 36		Fleisch- Stücke N= 14		Hackfleisch N= 12		Innereien N= 10		Zunge N= 4	
	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R	I	R
	Ampicillin	1	30	0	3	1	35	1	13	0	12	0	10	0
Streptomycin	0	4	0	1	0	7	0	1	0	2	0	2	0	0
Tetracyclin	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfamethox	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N= Anzahl untersuchte Stämme, I= intermediäre Stämme, R= resistente Stämme

4.4 Vergleich der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode ermittelten Ergebnisse der *Y. enterocolitica*-Stämme humaner und porciner Herkunft

Insgesamt waren die Unterschiede bei den ermittelten Resistenzen der 31 humanen (Stuhl) und 79 porcinen Stämme (d.h. Fleischstücke, Hackfleisch, Innereien, Zunge, Tonsillen, Kot) gering.

Anhand Tabelle 23 ist festzustellen, dass die porcinen Stämme gegenüber den humanen nur geringgradig häufiger Resistenzen gegen Ampicillin (97,5 % vs. 96,7 %) und Streptomycin (16,5 % vs. 12,9 %) zeigten. Bei dem Wirkstoff Sulphamethoxazol wurde nur 1 resistenter Stamm gefunden, welcher aus humanem Probenmaterial stammte und zusätzlich gegen Ampicillin und Streptomycin Multiresistenzen zeigte. Bei Tetracyclin wurde kein resistenter Stamm gefunden, nur 1 Stamm konnte als intermediär beurteilt werden und war porciner Herkunft.

Tabelle 23: Ergebnisvergleich der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten Stämme, humaner und porciner Herkunft

Antimikrobieller Wirkstoff	Humane Yersinien N= 31				Porcine Yersinien N= 79			
	intermediär		reistent		intermediär		reistent	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ampicillin	1	3,2	30	96,7	2	2,5	77	97,5
Streptomycin	0	0	4	12,9	0	0	13	16,5
Tetracyclin	0	0	0	0	1	1,3	0	0
Sulphamethoxazol	0	0	1	3,2	0	0	0	0

N= Anzahl der untersuchten Stämme

4.5 Ergebnisse der Agardiffusion im Vergleich mit der Bouillon-Mikrodilution

Die antimikrobiellen Wirkstoffe Cefotaxim, Gentamicin, Chloramphenicol, Trimethoprim, Nalidixinsäure und Ciprofloxacin lieferten in beiden Methoden die gleichen Ergebnisse. Bei Ampicillin, Sulphamethoxazol, Streptomycin und Tetracyclin wurden teilweise unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Diese werden im Folgenden erläutert.

Ampicillin: Zusammenfassend ist zu sagen, dass bei der Untersuchung auf Ampicillin im Vergleich der beiden Methoden zweimal größtmögliche Fehler („very major error“) und dreimal geringfügige Fehler („minor error“) aufgetreten sind. In der Agardiffusion waren 2 Stämme empfindlich, die in der Mikrodilution als resistent beurteilt wurden. Dieses Ergebnis bezeichnet man als größtmögliche Fehler. Zwei Stämme waren mittels Agardiffusion intermediär. In der Mikrodilution war einer dieser Stämme ebenfalls intermediär, der andere jedoch resistent. Diese Diskrepanz wird als geringfügiger Fehler bezeichnet. Bei diesem Ergebnis ist zu bemerken, dass die ermittelten HDD in beiden Fällen 14 mm betragen. Wenn der HDD um nur einen mm kleiner gewesen wäre, also 13 mm, wären beide Stämme, aufgrund der Grenzwerte (Tabelle 14), in der Agardiffusion als resistent eingestuft worden. 2 der mittels

Agardiffusion als resistent ermittelten Stämme wurden in der Mikrodilution als intermediär beurteilt. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse für Ampicillin aus Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution im Vergleich dargestellt.

HHD in mm									
20									
19									1
18									
17									1
16									
15									
14							1		1
13								1	1
12								1	2
11								2	3
10								4	30
9									17
8							2	4	31
7									
6									
5									
4									
3									
2									
1									
0								2	6
	≤ 0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	> 32
MHK in µg/ml									

Abbildung 6: 110 *Y. enterocolitica*-Stämme (Bioserotyp 4/O:3) gegenüber Ampicillin. Grenzwerte gemäß CLSI (grün= „sensibel“, blau= „intermediär“, rot= „resistent“; MHK= Minimale Hemmkonzentration, HHD= Hemmhofdurchmesser)

Streptomycin: Bei Untersuchung von Streptomycin mittels beider Verfahren traten viermal größtmögliche Fehler und einmal ein großer Fehler („major error“) auf. Diese Fehlerquote ist im Vergleich zu Sulphamethoxazol niedriger, jedoch ist die Auswirkung der größtmöglichen Fehler im Falle einer Therapie deutlich problematischer. 4 *Y. enterocolitica*-Stämme wurden mittels Agardiffusion als sensibel bewertet, mittels Mikrodilutionsverfahren waren diese 4 Stämme resistent. 14 Stämme wurden mittels Agardiffusionsmethode als resistent ermittelt; mittels Bouillon-Mikrodilution waren 13 dieser Stämme ebenfalls resistent während 1 Stamm als sensibel bewertet wurde. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse von Streptomycin aus Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution im Vergleich.

HHD in mm								
22			1					
21			1					
20			3					
19			6					
18			23	1				
17		1	25	1				
16			22	2				
15			10					
14								
13								
12								
11								
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
0			1					13
	≤ 2	4	8	16	32	64	128	≥ 256
MHK in µg/ml								

Abbildung 7: 110 *Y. enterocolitica*-Stämme (Bioserotyp 4/O:3) gegenüber Streptomycin. Grenzwerte gemäß CA-SFM. (grün= „sensibel“, schraffiert= „intermediär“ in Agardiffusion und „sensibel“ in Mikrodilution, rot= „resistent“; MHK= Minimale Hemmkonzentration, HHD= Hemmhofdurchmesser)

Sulphamethoxazol: Insgesamt betrachtet traten bei 3 Stämmen große Fehler und bei 14 Stämmen geringfügige Fehler auf. Diese Fehlerquote ist als relativ hoch zu bewerten. In Abbildung 8 sind für Sulphamethoxazol die Ergebnisse aus Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution im Vergleich dargestellt.

HHD in mm								
30		1						
29								
28		1	1					
27	2	1						
26	3							
25	3		2					
24	6		1					
23	4							
22	9							
21	9							
20	17			1				
19	11							
18	12			1				
17	4							
16	2							
15	9							
14	1							
13	4							
12								
11		1						
10								
9								
8								
7								
6								
5								
4								
3								
2								
1								
0	1	1		1				1
	≤ 16	32	64	128	256	512	1024	≥ 2048
MHK in µg/ml								

Abbildung 8: 110 *Y. enterocolitica*-Stämme (Bioserotyp 4/O:3) gegenüber Sulphamethoxazol. Grenzwerte gemäß CLSI. (grün= „sensibel“, rot= „resistent“; schraffiert= „intermediär“ in Agardiffusion und „sensibel“ in Mikrodilution; MHK= Minimale Hemmkonzentration, HHD= Hemmhofdurchmesser)

Alle 11 Stämme, die in der Agardiffusion als fraglich empfindlich eingestuft wurden, waren mittels Mikrodilution sensibel. Von den 4 mittels Agardiffusionstest resistenten Stämmen war mittels Mikrodilution nur einer resistent, die anderen 3 waren empfindlich. 14 Stämme wurden mittels Agardiffusion als intermediär bewertet, allerdings war bei 3 dieser Stämme das Ablesen des HHD nicht eindeutig und es war fraglich, ob die 3 Stämme intermediär oder empfindlich seien. Alle 14 Stämme wurden auf Grund der ermittelten MHK-Werte als sensibel eingestuft.

Tetracyclin: Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse für Tetracyclin aus Agardiffusion und Bouillon-Mikrodilution im Vergleich. Nur ein Stamm, welcher mittels Agardiffusion als empfindlich beurteilt wurde, war mittels Mikrodilution intermediär („minor error“).

HHD in mm								
34		1						
33			1					
32		2	1					
31		5	3					
30		4	5					
29		3	11					
28		12	12					
27		11	15	1				
26		6	5					
25		2	5	1				
24			1	1				
23								
22								
21			1		1			
20								
19								
18								
17								
16								
15								
14								
13								
12								
≤11								
	≤ 0,5	1	2	4	8	16	32	64
MHK in µg/ml								

Abbildung 9: 110 *Y. enterocolitica*-Stämme (Bioserotyp 4/O:3) gegenüber Tetracyclin. Grenzwerte gemäß CLSI. (grün= „sensibel“, blau= „intermediär“, rot= „resistent“; MHK= Minimale Hemmkonzentration, HHD= Hemmhofdurchmesser)

5. DISKUSSION

Weltweit befassen sich Studien mit der *in-vitro* Resistenztestung von *Y. enterocolitica* des Bioserotyps 4/O:3, welcher in Europa bei humanen Yersiniosen am häufigsten isoliert wird. In Deutschland wurde bisher nur eine Resistenzbestimmung von *Y. enterocolitica*-Stämmen veröffentlicht (STOCK und WIEDEMANN 1999). Bei solchen Untersuchungen werden entweder die Agardiffusions- oder Mikrodilutionsmethode als häufigste Verfahren angewandt. In der vorliegenden Untersuchung sollten neben der Empfindlichkeitsbestimmung von *Y. enterocolitica*-Stämmen des Bioserotyps 4/O:3 diese beiden Methoden im Vergleich bewertet werden. Nach derzeitigen Erkenntnissen können Yersinien zwar über Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden, jedoch scheint eine Bedrohung durch resistente oder multiresistente Stämme nicht gegeben zu sein. Dies sollte in vorliegender Studie überprüft werden, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

Insgesamt betrachtet waren die untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme vom Bioserotyp 4/O:3 mittels Agardiffusions- und Bouillon-Mikrodilutionsverfahren gegenüber den verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffen in fast allen Fällen sensibel. 100,0 % der Stämme waren gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Cefotaxim, Ceftiofur, Aztreonam, Chloramphenicol, Colistin, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin und Trimethoprim empfindlich. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten anderer europäischer Länder überein (HORNSTEIN et al. 1985, ALZUGARAY et al. 1995, STOCK und WIEDEMANN 1999, RASTAWICKI et al. 2000, sowie PRATS et al. 2000). Über die Empfindlichkeitsbestimmung bei *Y. enterocolitica* Bioserotyp 4/O:3 gegenüber den Wirkstoffen Ceftiofur und Florfenicol sind in der Literatur bisher noch keine Ergebnisse veröffentlicht worden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass beide antimikrobiellen Wirkstoffe nur für die Veterinärmedizin zugelassen sind.

Mittels Agardiffusionsverfahren wurden in dieser Studie 200 *Y. enterocolitica*-Stämme (4/O:3) auf 15 antimikrobielle Wirkstoffe untersucht. 98,0 % der Stämme waren gegen **Ampicillin** resistent. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die meisten

Y. enterocolitica des Serotyps O:3, chromosomal kodierte β -Laktamasen besitzen und somit intrinsisch resistent gegen Ampicillin sind (AARESTRUP et al 1998). Vergleichbare Ergebnisse erhielten Studien aus Europa, Kanada und den USA (HAMMERBERG et al. 1977, JUHLIN and WINBLAD 1981, KWAGA and IVERSEN 1990, LYONS et al. 1991, PHAM et al. 1991,1995, PRESTON et al. 1994, ALZUGARAY et al. 1995, HARIHARAN et al. 1995, AARESTRUP et al. 1998, PRATS et al. 2000, RASTAWICKI et al. 2000, ABDEL-HAQ et al. 2006, BAUMGARTNER et al. 2007). Die ermittelte Resistenzlage gegen **Erythromycin** ist mit 92,5 %, ebenso wie bei Ampicillin, deutlich hoch; allerdings muss man hier berücksichtigen, dass Erythromycin fast ausschließlich bei grampositiven Bakterien wirksam ist. HAMMERBERG et al. (1977), KWAGA and IVERSEN (1990), PRESTON et al. (1994), STOLK-ENGELAAR et al. (1995) sowie STOCK und WIEDEMANN (1999) ermittelten 100,0 % Resistenzen gegen Erythromycin, was mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmen würde, wenn man die intermediären Yersinien zu den resistenten zählen würde. 7,0 % der mittels Agardiffusion untersuchten Stämme waren gegen **Streptomycin** resistent. Nach der in der Literatur erwarteten Unempfindlichkeiten gegenüber Ampicillin und Erythromycin, wies Streptomycin die höchsten Resistenzraten auf. Ähnliche Streptomycin-Ergebnisse berichteten Studien aus Spanien, Kanada, Dänemark und der Schweiz (PÉREZ-TRALLERO et al. 1988b, HARIHARAN et al. 1995, AARESTRUP et al. 1998, BAUMGARTNER et al. 2006). In Spanien ermittelten PRATS et al. (2000) von 1985-1987 mit 72,0 % einen deutlich höheren Anteil an Streptomycin-resistenten *Y. enterocolitica* (4/O:3), welcher von 1995-1998 auf sogar 90,0 % anstieg. In ihrer Studie gaben sie keine mögliche Erklärung für den beobachteten Anstieg. Mittels Agardiffusionstest waren 2,0 % der untersuchten Stämme gegenüber **Sulphamethoxazol** resistent. Dies stellt ein vergleichsweise niedriges Resultat dar. Dennoch scheint es ein nicht selten beschriebenes Ergebnis zu sein, welches bei den meisten durchgeführten Empfindlichkeitsbestimmungen erzielt wurde (PÉREZ-TRALLERO et al. 1988b, PRESTON et al. 1994, AARESTRUP et al. 1998, PRATS et al. 2000, RASTAWICKI et al. 2000, BAUMGARTNER et al. 2006). Gegenüber dem Kombinationswirkstoff **Cotrimoxazol** (Sulphamethoxazol/Trimethoprim) wurde in dieser Studie lediglich ein resistenter *Yersinia*-Stamm nachgewiesen. Dieser wurde aus einer humanen Stuhlprobe isoliert und war als einziger multiresistent. Er zeigte

neben einer Unempfindlichkeit gegen Sulphametoxazol, Cotrimoxazol und Streptomycin auch Resistenzen gegen Ampicillin und Erythromycin. Das gleichzeitige Vorkommen von Sulfonamid- und Streptomycin-Resistenzen wurde zuvor in Spanien sowohl von SORIANO und VEGA (1982) bei 17,0 % der O:3 Stämme, als auch von PÉREZ-TRALLERO et al. (1988a) bei 46,0 % der 68 untersuchten O:3 Stämmen (29 Stämme waren porciner Herkunft) sowie von PRATS et al. (2000) bei 90,0 % von 20 getesteten O:3 Stämmen beschrieben.

Das gleichzeitige Auftreten von Sulfonamid- und Streptomycin-Resistenzen deutet auf das Vorliegen einer Coresistenz hin. Während SORIANO und VEGA (1982) sowie PÉREZ-TRALLERO et al. (1988a) von einer Resistenzentstehung in Plasmiden ausgehen, vermuten PRATS et al. (2000) eher das Vorhandensein eines Integrons. Bei der Resistenz gegen Sulfonamide handelt es sich um eine Kreuzresistenz. Dies wird damit begründet, dass bei der separaten Testung von Sulfonamiden alle Sulfonamide als kreuzresistent angesehen werden können. Während das Testergebnis für jeden einzelnen Sulfonamid-Wirkstoff nicht auf das Ergebnis für die Testung einer Sulfonamid/Trimethoprim-Kombination übertragbar ist, kann ein Bakterienstamm, der bei der Überprüfung des Kombinationswirkstoffes Sulfonamid/Trimethoprim als resistent ermittelt wurde, auch als resistent gegenüber den beiden Einzelsubstanzen betrachtet werden (WERCKENTHIN et al. 2005). Die Tatsache, dass dieser multiresistente Yersinien-Stamm vom Menschen isoliert wurde und dass Sulfonamide ebenso wie Streptomycine als Therapeutika bei Yersiniosen empfohlen werden, legt die Vermutung nahe, dass diese Resistenz *in-vivo*, im Laufe einer Therapie, entstanden ist. Das vergleichsweise niedrige Resistenzergebnis gegenüber Cotrimoxazol deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen aus Kanada und der Schweiz (PRESTON et al. 1994, BAUMGARTNER et al. 2007). In Spanien wiesen PRATS et al. (2000) mit einem Anstieg von 28,0 % (1985-1987) auf 70,0 % (1995-1998) deutlich höhere Resistenzen gegen den gleichen Wirkstoff nach. Dagegen konnten in Polen bei 114 Stämmen, die mittels Agardiffusion untersucht wurden, keine Resistenzen ermittelt werden. Lediglich 1,8 % der Stämme wurden als intermediär beurteilt.

Auch wenn die prozentualen Ergebnisse der humanen und porcinen *Y. enterocolitica* sehr ähnlich sind, kann man bei genauerer Betrachtung feststellen, dass die etwas höheren Resistenzraten gegenüber Ampicillin, Erythromycin und Streptomycin porciner Herkunft waren. Bei den Resistenzen gegenüber Sulphamethoxazol und Cotrimoxazol waren die humanen Stämme häufiger vertreten. Die im Agardiffusionstest gegen Erythromycin, Sulphamethoxazol und Ampicillin ermittelten intermediären Stämme lieferten mit respektiven 7,5 %, 7,0 % und 1,0 % Stämmen ein relativ niedriges Ergebnis. In der Literatur sind kaum Angaben über intermediär beurteilte Wirkstoffe bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 zu finden. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Wirkstoffe zu den resistenten hinzugerechnet werden, denn als intermediär ermittelte Chemotherapeutika sollten nicht für eine Behandlung empfohlen werden, da *in-vivo* mit einem Therapieversagen gerechnet werden muss. Zählt man die in dieser Studie ermittelten intermediären *Y. enterocolitica*-Stämme zu den resistenten dazu, so ergibt sich ein ähnliches Ergebnis wie bei den oben beschriebenen Resistenzen. 1,0 % der mittels Agardiffusionsverfahren untersuchten Yersinien waren für Ampicillin sensibel. Dieses Ergebnis bestätigt, wie schon zuvor beschrieben, dass nur die meisten und nicht alle *Y. enterocolitica* des Serotyps O:3 über β -Laktamasen verfügen. Ähnliche Ergebnisse wurden in Dänemark, Kanada und in den USA veröffentlicht (PRESTON et al. 1994, HARIHARAN et al. 1995, AARESTRUP et al. 1998, ABDEL-HAQ et al. 2006).

Die mittels Bouillon-Mikrodilution und Agardiffusion ermittelten Ergebnisse weisen eine große Übereinstimmung auf. Von den 110 in der Mikrodilution untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämmen waren alle gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Cefotaxim, Ceftiofur, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin und Trimethoprim empfindlich. In keiner der bisher veröffentlichten Studien über die Empfindlichkeitsbestimmung von *Y. enterocolitica* 4/O:3 wurden Resistenzen gegenüber Ciprofloxacin nachgewiesen. Es ist somit der einzige antimikrobielle Wirkstoff, gegen welchen bisher alle Stämme empfindlich waren. Dieses ist von besonderer Bedeutung, da Ciprofloxacin als Mittel der Wahl für die Behandlung von Yersiniosen gilt, insbesondere bei der Therapie der reaktiven Arthritis. In Studien aus Deutschland, den Niederlanden, Spanien und den USA,

wurden bei Verwendung der Mikrodilutionsmethode ähnliche Ergebnisse ermittelt (STOLK-ENGELAAR et al. 1995, STOCK und WIEDEMANN 1999, ABDEL-HAQ et al. 2006). Bei der Empfindlichkeitsbestimmung von *Y. enterocolitica* 4/O:3 konnten mittels Mikrodilutionsverfahren weder in Deutschland, den Niederlanden, noch in Österreich Resistenzen gegen Chloramphenicol ermittelt werden. Dagegen waren in den USA 1,0 % der von ABDEL-HAQ et al. (2006) untersuchten humanen Stämme gegen Chloramphenicol resistent. In Spanien wurden von PRATS et al. (2000) mit 20,0 % (1985-1987) und 60,0 % (1995-1998) deutlich höhere Resistenzraten gegen Chloramphenicol ermittelt. Eine mögliche Erklärung wurde von ihnen nicht gegeben. Keiner der 110 untersuchten *Yersinia*-Stämme war gegen Florfenicol resistent, jedoch kann keine weitere Aussage darüber getroffen werden, ob die Stämme sensibel oder intermediär waren, da die hierfür nötigen Verdünnungsstufen in der MTP nicht ausreichend waren.

Wie zuvor im Agardiffusionstest, wurden mittels Mikrodilution mit 97,3 % resistenter Stämme, ähnlich hohe **Ampicillin**-Resistenzen ermittelt. Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen Studien gefunden. Ein bemerkenswertes Ergebnis lieferte die Empfindlichkeitsbestimmung der 110 *Y. enterocolitica*-Stämme gegenüber **Streptomycin**. Mittels Mikrodilutionsverfahren waren 15,5 % Stämme resistent. In einer österreichischen Studie (MAYRHOFER 2003) konnten mittels Mikrodilution keine Streptomycin-Resistenzen nachgewiesen werden. Dagegen wurden in Spanien hohe Resistenzraten humaner Yersinien gegen Streptomycin nachgewiesen. 1985-1987 waren 72,0 % und 1985-1987 sogar 90,0 % der Stämme Streptomycin-resistent. Vergleicht man das in der vorliegenden Studie ermittelte prozentuale Ergebnis der Mikrodilution mit dem der Agardiffusion, so wurden mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode mehr als doppelt so viele Streptomycin-Resistenzen ermittelt. Dieses Resultat lässt auf eine deutlich höhere Sensitivität des Mikrodilutionsverfahrens schließen. Von den 15,5 % Streptomycin-resistenten Yersinien stammten 23,5 % aus humanen Stuhlproben und 76,5 % wurden aus porcinem Probenmaterial isoliert. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Schweine die Hauptinfektionsquelle für menschliche *Y. enterocolitica*-Infektionen darstellen. Nur einer der 110 untersuchten Stämme war gegen **Sulphamethoxazol** resistent und stammte aus einer humanen Stuhlprobe. Dieser Stamm zeigte als

einzigsten Multiresistenzen gegen Sulphamethoxazol und Streptomycin sowie Ampicillin. Im Gegensatz zur Agardiffusionsmethode, bei der 100,0 % der Stämme gegenüber **Tetracyclin** empfindlich waren, wurde mit der Bouillon-Mikrodilution 1 intermediärer Stamm (0,9 %) ermittelt. Dieser stammte aus einer Schweinetonsille. Weder in Deutschland noch in Österreich (STOCK und WIEDEMANN 1999, MAYRHOFER et al. 2004) wurden bei *Y. enterocolitica* 4/O:3 mittels Mikrodilutionsverfahren Tetracyclin-Resistenzen nachgewiesen. Dieses Ergebnis kann eventuell auf die geringere Anzahl untersuchter *Y. enterocolitica*-Stämme zurückgeführt werden. In Kanada wurde von PRESTON et al. (1994) eine prozentuale Zunahme an Tetracyclin-resistenten Stämmen humaner Herkunft von 0,4 % (1985) auf 2,0 % (1990) beobachtet. Untersuchungen aus Großbritannien (LYONS et al. 1991) ergaben sogar, dass mittels Agardilutionsverfahren 100,0 % der 73 untersuchten humanen *Y. enterocolitica*-Stämme gegen Tetracyclin und Trimethoprim resistent waren. Diese erhebliche Ergebnis-Diskrepanz führen LYONS et al. (1991) auf die Verwendung unterschiedlicher Grenzwerte in Großbritannien zurück. Die Ergebnisse aus anderen sowie aus der vorliegenden Studie sind insofern bemerkenswert, als dass Tetracyclin-Resistenzen am häufigsten bei *Enterobacteriaceae* vorkommen und somit diese antimikrobielle Resistenz am ehesten erwartet worden wäre. Tetracyclin-Resistenzen stellen außerdem die in der Natur am häufigsten vorkommenden antibakteriellen Resistenzen dar (PRATS et al. 2000). Die wesentlichen Resistenzmechanismen der Bakterien gegenüber Tetracyclinen bestehen in der Ausschleusung der Substanz aus der Bakterienzelle. Diese Effluxbedingte Resistenzen kommen häufiger bei gramnegativen als bei grampositiven Bakterien vor (HÖLZEL 2006).

Anders als die Vermutungen von PÉREZ-TRALLERO et al. (1988a), die die ungünstige Resistenzsituation bei *Y. enterocolitica* auf den Gebrauch von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin zurückführen, kann diese Hypothese mit der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Für Deutschland liegen keine Zahlen über den mengenmäßigen Chemotherapeutikaverbrauch in der Schweineproduktion vor, aber es ist davon auszugehen dass, wie die Zahlen aus Dänemark für das Jahr 2005 zeigen (DANMAP 2005), auch in Deutschland der überwiegende Einsatz von antibakteriellen Wirkstoffen in der Schweineproduktion

erfolgt. Diese Vermutung liegt allein aus dem Grund nahe, dass von den insgesamt 240 Millionen Schweinen, die in Europa produziert werden, mit 41,5 Millionen der größte Teil aus Deutschland stammt (N.N. 2005). Dabei wurden im Jahr 2005 in Deutschland in der Veterinärmedizin am häufigsten Tetracycline eingesetzt, gefolgt von β -Laktamen, Sulfonamiden, Makroliden und Aminoglykosiden (N.N. 2005). Der Einsatz antimikrobieller Substanzen korreliert demzufolge nicht mit den in dieser Studie erhaltenen Resistenzhäufigkeiten von porcinen *Y. enterocolitica*-Stämmen.

Insgesamt betrachtet zeigen die Ergebnisse dieser Studie ein sehr geringes Vorkommen resistenter Yersinien, sowohl bei Stämmen humaner sowie porciner Herkunft. *Y. enterocolitica*-Stämme 4/O:3 sind gegen die meisten antibakteriellen Wirkstoffe empfindlich und weisen nur geringe Resistenzen gegen einzelne Chemotherapeutika auf. Diese Studie zeigt, dass bei *Y. enterocolitica* 4/O:3, die im süddeutschen Raum isoliert wurden, die Resistenzsituation zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht problematisch ist und mit den Ergebnissen anderer, weltweit durchgeführten Untersuchungen übereinstimmt. Als Erklärung für das verminderte Vorkommen resistenter Yersinien vermuten AHMEDY et al. (1985) deren geringe Fähigkeit, als Rezeptor für Resistenzfaktoren zu agieren. So stellten schon VIDON und DELMAS (1981) fest, dass Resistenzplasmide bei *Y. enterocolitica* im Vergleich zu anderen Lebensmittel-Stämmen, z.B. *E. coli* und Salmonellen, selten vorkommen. Dabei handelte es sich bei den von ihnen untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämmen überwiegend um den Biotyp1, welcher vermehrt in der Umwelt vorkommt. Das geringe Vorkommen resistenter *Y. enterocolitica* ist, so vermuten ROBINS-BROWNE et al. (1986), eventuell darauf zurückzuführen, dass das Virulenzplasmid, welches bei den pathogenen Serotypen vorkommt, einen Einfluss auf das Resistenzverhalten dieser Stämme hat. Nach ROBINS-BROWNE et al. (1986) weisen *Y. enterocolitica*-Stämme, die das Virulenz-plasmid besitzen, eine höhere Affinität zu Antibiotika auf. Dagegen konnte bei anderen Untersuchungen (ALZUGARAY et al. 1995, FUNK et al. 2000) kein Zusammenhang zwischen dem Resistenzmuster und dem Plasmidvorkommen festgestellt werden.

Die Resultate dieser Studie zeigen, dass Chinolone, Fencicole, Gentamicin, Sulfonamide, sowie deren Kombination mit Trimethoprim, Tetracycline, Cefotaxim

sowie die gegen gramnegative Bakterien wirkenden antimikrobiellen Substanzen Aztreonam und Colistin, *in-vitro* am wirksamsten gegen *Y. enterocolitica* mit dem in Europa am häufigsten vorkommenden pathogenen Bioserotyps 4/O:3 sind. Aus diesen Gründen können die oben genannten Substanzen, wie es auch von anderen Autoren empfohlen wird (COVER und ABER 1989, STOLK-ENGELAAR et al. 1995, BOTTONE 1997, BOCKEMÜHL und ROGGENTIN 2004), für eine Therapie herangezogen werden.

Bei dem Vergleich der Agardiffusions- und Bouillon-Mikrodilutionsmethode sind insgesamt 6 mal größtmögliche Fehler, 4 mal große Fehler und 18 mal geringfügige Fehler aufgetreten. Dieser Fehleranteil ist als relativ hoch zu bewerten und zeigt, dass die Bestimmung der MHK ein verlässlicheres Ergebnis liefert. Mittels Agardiffusionstest ist lediglich eine qualitative Aussage darüber möglich, ob der untersuchte Erreger gegenüber dem getesteten antimikrobiellen Wirkstoff „empfindlich“, „resistent“ oder „intermediär“ ist. Dagegen kann bei der Mikrodilution neben der Erregereinstufung in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“ anhand der ermittelten MHK-Werten eine direkte Aussage über den Grad der Empfindlichkeit des Erregers getroffen werden. Somit erhält der behandelnde Arzt oder Tierarzt ein quantitatives Ergebnis der Empfindlichkeitsbestimmung; dies ist für eine effektive Therapie besonders wichtig. In Hinblick auf eine möglichst optimale Auswahl des am besten geeigneten Wirkstoffes, liefert ein quantitatives Testergebnis in Form von MHK-Werten dem behandelnden Arzt die größte Aussagekraft. Des Weiteren ist es mit Hilfe der MHK-Bestimmung aufgrund der unterschiedlich vorhandenen Konzentrationsbereiche möglich, bei genauer Dokumentation, Veränderungen in der Empfindlichkeit des Erregers zu erkennen. Dies ist vor allem im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen von Bedeutung, da eine Abnahme der Empfindlichkeit frühstmöglich erkannt werden kann.

Im Vergleich zur Mikrodilution ist der Agardiffusionstest kostengünstiger, jedoch ist er mit einer weitaus größeren Anzahl von Fehlern behaftet. So können unterschiedliche Inokulumdichten, ungleichmäßige Schichtdicken des Agars, das Alter der Agarplatten und der Testblättchen, sowie die Prädiffusionszeit das Testergebnis beeinflussen (STOCK et al. 2001). Zudem ist nach eigenen Erfahrungen das Ablesen der HHD

wesentlich zeitintensiver als das Ablesen der MHK-Werte. Da die MHK-Werte im Vergleich zu den HHD-Werten die verlässlicheren Werte darstellen und die Mikrodilution quantitative Ergebnisse liefert, ist die Empfindlichkeitsbestimmung mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode zu bevorzugen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin hat zu einer Selektion und Anreicherung antibakteriell resistenter Mikroorganismen geführt. Die Bedeutung tierischer Lebensmittel bei der Übertragung von Bakterien auf den Menschen wurde bereits des öfteren beschrieben. In Europa sind die meisten *Y. enterocolitica*-Stämme, die bei humanen Gastroenteritiden isoliert werden, vom Bioserotyp 4/O:3. Für menschliche Infektionen stellen symptomlos infizierte Schweine das wichtigste Erregerreservoir dar, dabei gilt Schweinefleisch als wichtigste Kontaminationsquelle.

In der Literatur wurde bisher nur über eine Empfindlichkeitsbestimmung von *Y. enterocolitica* 4/O:3 in Deutschland berichtet. Aus diesem Grund befasste sich diese Studie mit dem Resistenzverhalten dieser Bakterien unter Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden. Mittels Agardiffusionsverfahren wurden 200 Stämme (60 humane und 140 porcine) auf die antimikrobiellen Wirkstoffe Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefotaxim, Aztreonam, Chloramphenicol, Colistin, Erythromycin, Gentamicin, Streptomycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Sulphamethoxazol, Sulphamethoxazol/Trimethoprim und Trimethoprim getestet. Im Anschluss wurden 110 der gleichen Stämme (31 humane und 79 porcine) mittels Bouillon-Mikrodilutionsverfahren untersucht. Die im Handel erhältlichen Mikrotiterplatten wurden vom Nationalen Veterinärinstitut Schwedens bezogen und enthielten die antimikrobiellen Wirkstoffe Ampicillin, Cefotaxim, Ceftiofur, Chloramphenicol, Florfenicol, Gentamicin, Kanamycin, Streptomycin, Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim.

Mittels Agardiffusionstest wurden gegen fünf Wirkstoffe Resistenzen ermittelt. 98,0 % der untersuchten Yersinien waren gegen Ampicillin, 92,5 % gegen Erythromycin, 7,0 % gegen Streptomycin, 2,0 % gegen Sulphamethoxazol und nur 1 Stamm (0,5 %) war gegen den Kombinationswirkstoff Sulphamethoxazol/Trimethoprim resistent. Mittels Mikrodilutionsverfahren wurden bei drei von 13 getesteten Wirkstoffen Resistenzen ermittelt. So waren 97,2 % gegen Ampicillin, 15,5 % gegen Streptomycin sowie 1 Stamm (0,9 %), aus einer humanen Stuhlprobe, gegen

Sulphamethoxazol resistent. Dieser Stamm war sowohl mittels Agardiffusions- als auch mittels Mikrodilutionsverfahren multiresistent. Es konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Resistenzergebnissen humaner und porciner Stämme festgestellt werden. Von den 110 Yersinien waren die Ergebnisse von 82 Stämmen, mittels Agardiffusions- und Bouillon-Mikrodilutionsverfahren, übereinstimmend. Bei 28 *Y. enterocolitica*-Stämmen wurden unterschiedliche Resultate ermittelt. In 6 Fällen handelte es sich um größtmögliche Fehler, 4 mal sind große und 18 mal geringfügige Fehler aufgetreten. Dabei ist bei dem Vergleich der Ergebnisse der MHK-Wert als der verlässlichere anzusehen. Aus diesem zuletzt genannten Grund und da die Mikrodilution im Gegensatz zur Agardiffusion quantitative Ergebnisse liefert, was für eine effektive Therapie von Bedeutung ist, sollten Empfindlichkeitsbestimmungen mittels Mikrodilution durchgeführt werden.

Insgesamt betrachtet, zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass *Y. enterocolitica*-Stämme 4/O:3 gegenüber den meisten antibakteriellen Wirkstoffen empfindlich sind und nur vereinzelt Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe aufweisen. Des Weiteren ist zu sagen, dass bei *Y. enterocolitica*-Stämmen 4/O:3, die im süddeutschen Raum isoliert wurden, die Resistenzsituation zum derzeitigen Zeitpunkt nicht problematisch ist und mit den Ergebnissen anderer weltweit durchgeführten Untersuchungen übereinstimmt.

7. SUMMARY

Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from different origins by means of disc diffusion method and broth dilution method

The use of antimicrobial agents in human and veterinary medicine has led to the selection and accumulation of antibacterial resistant microorganisms. The significance of food with animal origin for the transmission of bacteria to humans has been described. In Europe most of the *Y. enterocolitica* strains isolated from human gastroenteritis are belonging to bioserotype 4/O:3. For human infections, asymptomatic pigs are the most important pathogen reservoir and pork the most important contamination source.

In this study, human and porcine *Y. enterocolitica* strains have been examined using two different methods. In a disc diffusion method, a total of 200 strains (60 human and 140 porcine) were tested for 15 different antimicrobial agents: ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxim, aztreonam, chloramphenicol, colistin, erythromycin, gentamicin, streptomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracyclin, sulphamethoxazol, sulphamethoxazol/trimethoprim and trimethoprim. After that, 110 of the same strains (31 human and 79 porcine) were examined by means of the broth microdilution technique. The microtitre plates available at the market were obtained from the National Veterinary Institute of Sweden and contained 13 different antimicrobial agents: ampicillin, cefotaxim, ceftiofur, chloramphenicol, florfenicol, gentamicin, kanamycin, streptomycin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracyclin, sulfamethoxazol and trimethoprim.

With the disc diffusion method, resistance to five active agents were obtained. 98,0 % of the examined *Y. enterocolitica* strains were resistant to ampicillin, 92,5 % showed resistance to erythromycin, 7,0 % to streptomycin, 2,0 % to sulphamethoxazol and only one strain, isolated from a human was resistant to the combined agent sulphamethoxazol/trimethoprim. By means of the broth microdilution method, resistance was obtained for 3 of 13 agents. 97,2 % were resistant to ampicillin, 15,5 % to streptomycin and 1 strain to sulphamethoxazol. Only one strain,

isolated from a human was proven multiresistant by the disc diffusion method as well as by broth microdilution technique. No essential difference could be detected between the resistance results of human and porcine strains. For 82 of the 110 strains examined, the results from disc diffusion and broth microdilution coincided. For 28 *Y. enterocolitica*-strains, different results were obtained. In 6 cases it was about the „very major error“, 4 were „major errors“ and 18 times „minor errors.“ Comparing the two methods, the MIC-results have to be considered more reliable. Because of this reason and because microdilution, in contrast to disc diffusion provides quantitative results – which is important for an effective therapy-susceptibility tests should be carried out by means of microdilution.

All in all, the present study demonstrates that strains of *Y. enterocolitica* 4/O:3 are highly susceptible to most of the tested antibacterial agents and only occasionally show resistance to a few antimicrobial agents. Furthermore, it can be stated that the resistance of *Y. enterocolitica* 4/O:3 strain isolated in the southern Germany, is at the moment, not yet problematic and corresponds to the results of other, worldwide investigations.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AARESTRUP F. M., H. C. WEGENER (1999)

The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*

Microbes. Infect.; 1, 639-644

AARESTRUP F. M., F. BAGGER, N. E. JENSEN, M. MADSEN, A. MEYLING, H. WEGENER (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)

APMIS; 106, 745-770

ABDEL-HAQ N. M., R. PAPADOPOULOS, B. I. ASMAR, W. J. BROWN (2006)

Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* recovered from children over a 12-year period

Int. J. Antimicrob. Ag.; 27, 449-452

AHMEDY A., D. J. M. VIDON, C. L. DELMAS, M.-C. LETT (1985)

Antimicrobial susceptibilities of food-isolated Strains of *Yersinia enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* and *Y. kristensenii*

Antimicrob. Agents Ch.; 28, 351-353

ALEKSIC S., J. BOCKEMÜHL (1990)

Mikrobiologie und Epidemiologie der Yersiniosen

Immun. Infekt.; 18, 178-185

ALZUGARAY R., H. M. A. GONZALEZ, E. LANDERAS, M. C. MENDOZA (1995)

Yersinia enterocolitica O:3 Antimicrobial resistance patterns, virulence profiles and plasmids

New Microbiol.; 18, 215-222

BAGGER F., M. MADSEN, J. CHRISTENSEN, F. M. AARESTRUP (1997)

Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms

Prev. Vet. Med.; 31, 95-112

BAGGER F., F. M. AARESTRUP, M. MADSEN, H. C. WEGENER (1999)

Glykopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from broilers and pigs following discontinued use of avoparcin

Microb. Drug Resist.; 5, 53-56

- BANGSOW T., R. HUCH., D. MALE, S. MÜLLER (2002)
Polymerase-Kettenreaktion
In: SCHIMPF (Hrsg.): Gentechnische Methoden
Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg, 147-167
- BARTON M. D. (2000)
Antibiotic use in animal feed and its impact on human health
Nutr. Res. Rev.; 13, 279-299
- BAUER, A. W., W. M. M. KIRBY, J.C. SHERRIS, M. TURCK (1966)
Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disc method.
Am. J. Clin. Pathol.; 45, 493-496
- BAUMGARTNER A., M. KÜFFER, D. SUTER, T. JEMMI, P. ROHNER (2007)
Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients,
pigs and retail pork in Switzerland
Int. J. Food Microbiol.; 115, 110-114
- BEZANSON G. S., R. KHAKHRIA, E. BOLLEGRAAF (1983)
Nosocomial outbreak caused by antibiotic-resistant strains of *Salmonella*
Typhimurium acquired from dairy cattle
Can. Med. Assoc. J.; 128, 426-427
- BOCKEMÜHL J., P. ROGGENTIN (2004)
Enterale Yersiniosen, Klinische Bedeutung, Epidemiologie, Diagnostik und
Prävention
Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz; 47, 685-691
- BOTTONE E.J. (1997):
Yersinia enterocolitica: The charisma continues
Crit. Rev. Microbiol.; 10, 257-276
- BOTTONE E.J. (1999):
Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates
Microbes Infect.; 1, 323-333
- BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY (BSAC)
http://www.bsac.org.uk/susceptibility_testing/guide_to_antimicrobial_susceptibility_testing.cfm
Abrufdatum: 10.10.2006
- BUTT H. L., D. L. GORDON, T. LEE-ARCHER, A. MORITZ, W. H. MERRELL (1991)
Relationship between clinical and milk isolates of *Yersinia enterocolitica*
Pathology; 23, 153-157

BVL (2007)

Jahresbericht 2005 zum Nationalen Rückstandskontrollplan

Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft

(http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_493978/DE/01_Lebensmittel/01_Sicherheit_Kontrollen/04_NRKP/01_berichte_nrkp/nrkp_bericht_2005.html)

Abrufdatum: 03.03.2007

CALL DOUGLAS R., M. K. BAKKO, M. J. KRUG, M. C. ROBERTS (2003)

Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays

Antimicrob. Agents Ch.; 47, 3290-3295

CLEVEN B. E., M. PALKA-SANTINI, J. GIELEN, S. MEEMBOR, M. KRÖNKE, O. KRUT (2006)

Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray

J. Clin. Microbiol.; 44, 2389-2397

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) (2002)

Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstest von Bakterien tierischer Herkunft; empfohlener Standard- Zweite Ausgabe. NCCLS-Dokument M31-A2 (ISBN 1-56238-000-0).

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA

COMITÉ DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (CA-SFM)

<http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2>

Abrufdatum: 10.10.2006

COQUE T. M., J. F. TOMAYKO, S. C. RICKE, P. C. OKGYUSEN, B. E. MURRAY (1996)

Vancomycin-resistant *Enterococci* from nosocomial, community, and animal sources in the United States

Antimicrob. Agents Ch.; 40, 2605-2609

COVER T. L., R. C. ABER (1989)

Yersinia enterocolitica

New Engl. J. Med.; 321,16-24

DE BOER E., J.F.M. NOUWS (1991):

Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*

Int. J. Food Microbiol.; 12, 375-378

ENDTZ H. P., G. J. RUIJS, B. VAN KLINGEREN, W. H. JANSEN, T. VAN DER REYDEN, R. P. MOUTON (1991)

Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluorquinolones in veterinary medicine
J. Antimicrob. Chemoth.; 27, 199-208

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICAL PRODUCTS (EMA) (1999)

Antibiotic Resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment, by the committee for veterinary medicinal products

(<http://eudra.org/vetdocs/PDFs/General/034299en.pdf>)

Abrufdatum: 10.01.2007

FREDRIKSSON-AHOMAA M, M. BUCHER, C. HANK, A. STOLLE, H. KORKEALA (2001)

High prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 on pig offal in southern Germany: a slaughtering technique problem
Syst. Appl. Microbiol.; 24, 457-463

FREDRIKSSON-AHOMAA M, S. HIELM, H. KORKEALA (1999)

High prevalence of *yadA*-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at retail level

J. Food Protect.; 62, 123-127

FREDRIKSSON-AHOMAA M., A. STOLLE, H. KORKEALA (2006):

Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections

FEMS Immunol. Med. Mic.; 47, 315-329

FREI A., D. GOLDENBERGER, M. TEUBER (2001)

Antimicrobial susceptibility of intestinal bacteria from Swiss poultry flocks before the ban of antimicrobial growth promoters

Syst. Appl. Microbiol.; 24, 116-121

GRIMM V., S. EZAKI, M. SUSAN, C. KNABBE, R. D. SCHMID, T. BACHMANN (2004)

Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance

J. Clin. Microbiol.; 42, 3766-3774

HAMMERBERG S., S. SORGER, M.I. MARKS (1977)

Antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O:3

Antimicrob. Agents Ch.; 11, 566-568

HARIHARAN H., J. S. GILES, S. B. HEANEY, S. M. LECLERC, R. D. SCHURMAN (1995)

Isolation, serotypes, and virulence-associated properties of *Yersinia enterocolitica* from the tonsils of slaughter hogs

Can. J. Vet. Res.; 59, 161-166

- HEESEMAN J. (1990)
Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden
Immun. Infekt.; 18, 186-191
- HEESEMAN J., KARCH H. (1995)
Diagnostik von Yersiniosen und Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)
Internist; 36, 102-105
- HÖLZEL C.S. (2006)
Antibiotikaresistente Bakterien und Resistenzgene in Schweinegülle
Vet. med. Diss. LMU-München
- HOOBKAMP-KORSTANJE J. A. A., J. DE KONING (1990)
Klinik, Diagnostik und Therapie von *Yersinia-enterocolitica*-Infektionen
Immun. Infekt.; 18, 192-197
- HOOBKAMP-KORSTANJE J. A. A., H. MOESKER, G. A. W BRUYN (2000)
Ciprofloxacin v placebo for treatment of *Yersinia enterocolitica* triggered reactive arthritis
Ann. Rheum. Dis.; 59, 914-917
- HORNSTEIN M. J., A. M. JUPEAU, M. R. SCAVIZZI, A. M. PHILIPPON, P. A. D. GRIMONT (1985)
In vitro susceptibilities of 126 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* to 21 β -lactam antibiotics
Antimicrob. Agents Ch.; 27, 806-811
- HULETZKY A., R. GIROUX, V. ROSSBACH, M. GAGNON, M. VAILLANTCOURT, M. BERNIER, F. GAGNON, K. TRUCHON, M. BASTIEN, F. J. PICARD, A. VAN BELKUM, M. OUELLETTE, P. H. ROY und M. G. BERGERON (2004)
New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of *Staphylococci*
J. Clin. Microbiol.; 42, 1875-1884
- JONES T. F., S. C. BUCKINGHAM, C. A. BOPP, E. RIBOT, W. SCHAFFNER (2003)
From pig to pacifier: chitterling- associated yersiniosis outbreak among black infants
Emerg. Infect. Dis.; 9, 1007-1009
- JUHLIN I., S. WINBLAD (1981)
Susceptibility to mecillinam and other antibiotics of 28 O-serotypes of *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; 8, 291-297

KAPPERUD G. (1991)

Yersinia enterocolitica in food hygiene
Int. J. Food Microbiol.; 12, 53-66

KEHRENBURG C. (2002)

Molekulare Grundlagen der Resistenz gegenüber Sulfonamiden, Streptomycin und Chloramphenicol bei Bakterien der Genera *Pasteurella* und *Mannheimia* unter besonderer Berücksichtigung der Identifizierung von Resistenzclustern
Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover

KLARE I., D. BADSTUBNER, C. KONSTABEL, G. BOHME, H. CLAUS, W. WITTE (1999)

Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant *enterococci* isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry
Microb. Drug Resist.; 5, 45-52

KOLBERT, M., P.M. SHAH (2002)

Diffusion oder Dilution: Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung im Routinelabor
Laboratoriums Medizin; 26, 420-424

KROKER R., R. SCHERKL, F. R. UNGEMACH (2002)

Sulfonamide
In: H.-H. FREY, W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin 2. Aufl.
Enke, Stuttgart, S. 379

KWAGA J. K. P., D. E. AGBONLAHOR, A. A. ADESIYUN, L. H. LOMBIN (1986)

The sensitivity to antimicrobial agents of species of *Yersinia* isolated from cattle and pigs in Nigeria
Vet. Microbiol.; 12, 383-388

KWAGA J., J. O. IVERSEN (1990)

In vitro antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from slaughtered pigs and pork products
Antimicrob. Agents Ch.; 34, 2423-2425

LINTON A. H., A. J. HEDGES, P. M. BENNETT (1988)

Monitoring for the development of antimicrobial resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms
J. Appl. Bacteriol.; 64, 311-327

LYONS M. M., M.B. PRENTICE, D. COPE, R.A. SWANN (1991)

Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in the British Isles
Uneyama T, Maruyama T, Tsubokura M (eds): Current Investigations of the Microbiology of *Yersinia*
Contrib. Microbiol. Immunol.; 12, 251-254

- MÄKI-IKOLA O, J. HEESEMANN, A. TOIVANEN, K. GRANFORS (1997)
High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany
Rheumatol. Int.; 16, 227-229
- MAYRHOFER S. (2003)
Antibiotikaresistenz bei *Listeria*-, *Yersinia*- und *Escherichia coli*-Isolaten aus Lebensmitteln
Vet. Med. Diss., Veterinärmedizinische Universität Wien
- MAYRHOFER S., P. PAULSEN, F. J. M. SMULDERS, F. HILBERT (2004)
Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry
Int. J. Food Microbiol.; 97, 23-29
- McDERMOTT P F, R D WALKER, D G WHITE (2003)
Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance
Int. J. Toxicol.; 22, 135-143
- MØLBAK K., D. L. BAGGESEN, F. M. AARESTRUP, J. M. EBBESEN, J. ENGBERG, K. FRYDENDHAL, P. GERNER-SMIDT, A. M. PETERSEN, H. C. WEGENER (1999)
An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT 104
New Engl. J. Med.; 341, 1420-1425
- NIKOLICH M. P., G. HONG, N. B. SHOEMAKER, A. A. SALYERS (1994)
Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock
Appl. Environ. Microb.; 60, 3255-3260
- N.N. (1984)
Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB
Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L 06.00-19: Bestimmung der aeroben Keimzahl bei +30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen
Tropfplattenverfahren
- N.N. (2005)
Tierarzneimittelmarkt Deutschland/ Antibiotikaeinsatz in Deutschland
Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (BfT)
(<http://www.bft-online.de>)
Abrufdatum: 18.02.2007
- N.N. (2007a)
Food Law News- EU- 2005
Commission Press Release (IP/05/1687), 22 December 2005
Growth promoters- Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect
(http://europa.eu.int/comm/health/ph/others/antimicrob_resist/am_02_en.pdf)
Abrufdatum: 16.02.2007

N.N. (2007b)

European Commission, Health and consumer protection directorate-general
On a generic approach to the safety assessment of micro-organisms used in
feed/food and feed/food production

(http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf)

Abrufdatum: 10.01.2007

ODENHOLT-TORNQVIST I., E. LÖWDIN, O. CARL (1991)

Pharmacodynamic Effects of Subinhibitory Concentrations of β -Lactam
Antibiotics In Vitro

Antimicrob. Agents Ch.; 35, 1834-1839

OHMAE K., S. YONEZAWA, N. TERAOKA (1981)

R plasmid with carbapenem resistance from *Escherichia coli* of porcine origin

Antimicrob. Agents Ch.; 19, 86-90

PAPADOPOULOU C., D. DIMITRIOU, S. LEVIDIOTOU, H. GESSOLI, A.
PANAGIOU, S. GOLEGOU, G. ANTONIADES (1997)

Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used
antibiotics: Is there a health hazard for consumers?

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.; 20, 35-40

PÉREZ-TRALLERO E., C. ZIGORRAGA, G. CILLA, P. IDIGORAS, C. LÓPEZ
LOPATEGUI, L. SOLAUN (1988a)

Animal origin of the antibiotic resistance of human pathogenic *Yersinia
enterocolitica*

Scand. J. Infect. Dis.; 20, 573

PÉREZ-TRALLERO E., G. C. EGUILUZ, M. U. EGAÑA (1988)

Chloramphenicol resistance in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*
serotype O:3 biotype 4

J. Antimicrob. Chemoth.; 21, 506-508

PÉREZ-TRALLERO E., C. ZIGORRAGA (1995)

Resistance to antimicrobial agents as a public health problem: importance of
the use of antibiotics in animals

Int. J. Antimicrob. Ag.; 6, 59-63

PERRETTEN V. (2003)

Use of antimicrobials in food-producing animals in Switzerland and the
European Union (EU)

Mitt. Lebensm. Hyg.; 94, 155-163

PERRETTEN V., L. VORLET-FAWER, P. SLICKERS, R. ERICHT, P. KUHNERT, J.
FREY (2005)

Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive
bacteria

J. Clin. Microbiol.; 43, 2291-2302

- PHAM J. N., S. M. BELL, M. J. HARDY, L. MARTIN, A. GUIYOULE, E. CARNIEL (1995)
Susceptibility to β -lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world
J. Med. Microbiol.; 43, 9-13
- PHAM J. N., S. M. BELL, J. Y. M. LANZARONE (1991)
Biotype and antibiotic sensitivity of 100 clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*
J. Antimicrob. Chemoth.; 28, 13-18
- PRATS G., B. MIRELIS, T. LLOVET, C. MUÑOZ, E. MIRÓ, F. NAVARRO (2000)
Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona
Antimicrob. Agents Ch.; 44, 1140-1145
- PRESTON M. A.; S. BROWN, A. A. BORCZYK, G. RILEY, C. KRISHNAN (1994)
Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolated in Canada from 1972 to 1990
Antimicrob. Agents Ch.; 38, 2121-2124
- RAOULT D., P. E. FOURNIER, M. DRANCOURT (2004)
What does the future hold for clinical microbiology
Nat. Rev. Microbiol.; 2, 151-159
- RASTAWICKI. W., R. GIERCZYNSKI, M. JAGIELSKI, S. KALUZEWSKI, J. JELJASZEWICZ (2000)
Susceptibility of Polish clinical strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 to antibiotics
Int. J. Antimicrob. Ag.; 13, 297-300
- ROBERT KOCH INSTITUT (2002)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2002
- ROBERT KOCH INSTITUT (2003)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2003
- ROBERT KOCH INSTITUT (2004)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2004
- ROBERT KOCH INSTITUT (2005)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005
- ROBERT KOCH INSTITUT (2007)
Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten
Epidemiologisches Bulletin Nr. 3, 20-21

- ROBINS-BROWNE R. M., J. K. PRPIC; R. B. DAVEY (1986)
Influence of the virulence plasmid and the Congo red reaction on the antimicrobial susceptibility of *Yersinia* species
J. Antimicrob. Chemoth.; 17, 553-557
- ROCKSIN, A. (2005)
Untersuchung zur Implementierung des Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen
Vet. med. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover
- ROLAIN J. M., M. N. MALLET, P.E. FOURNIER, D. RAOULT (2004)
Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing
J. Antimicrob. Chemoth.; 54, 538-541
- SCHWARZ S., E. CHASLUS-DANCLA (2001)
Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanism of resistance
Vet. Res.; 32, 201-225
- SCHWARZ S., C. KEHRENBURG (2000)
Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene und Übertragungswege.
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle; 7, 55-60
- SCHWARZ S., C. KEHRENBURG, T. R. WALSH (2001)
Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production
Int. J. Antimicrob. Ag.; 17, 431-437
- SCHWARZ S., C. WERCKENTHIN (2001)
Risiken des Antibiotika-Einsatzes in Veterinärmedizin und landwirtschaftlicher Tierproduktion
Chemotherapie Journal; 10. Jahrgang, Heft 6, 197-202
- SCHWARZ S., A. BÖTTNER, M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFER, A. RICHTER, W. TRAEDE, K.-H. WALDMANN, J. WALLMANN, C. WERCKENTHIN (2003)
Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., Heft 9/10;116, 353-361
- SHAH P. M. (2005)
The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline?
Clin. Microbiol. Infec.; 11, 36-42
- SMITH C. (2007)
Transposons: cut-and-paste gene delivery
Nat. Methods; 4, 183-186

- SORIANO F., J. VEGA (1982)
The susceptibility of *Yersinia* to eleven antimicrobials
J. Antimicrob. Chemoth.; 10, 543-547
- SPIKA J. S., S. H. WATERMAN, G. W. HOO, M. E. St LOUIS, R. E. PACER, S. M. JAMES, M. L. BISSETT, L. W. MAYER, J. Y. CHIU, B. HALL, et al. (1987)
Chloramphenicol-resistant *Salmonella newport* traced through hamburger to dairy farms. A major persisting source of human salmonellosis in California.
New. Engl. J. Med.; 316, 565-570
- SPRAGUE L.D., H. NEUBAUER (2005)
Yersinia aleksiciae sp. nov.
Int. J. Syst. Evol. Micr.; 55, 831-835
- STEARNS R. L.; T. MARTINSKY, M. SCHENA (2003)
Trends in microarray analysis
Nat. Med.; 9, 140-145
- STOCK I., B. WIEDEMANN (1999)
An in-vitro study of the antimicrobial susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and the definition of a database
J. Antimicrob. Chemoth.; 43, 37-45
- STOCK I., P. HEISIG and B. WIEDEMANN (1999)
Expression of β -lactamases in *Yersinia enterocolitica* strains of biovars 2, 4 and 5
J. Med. Microbiol.; 48, 1023-1027
- STOCK I., K. MACHKA, A. RODLOFF; B. WIEDEMANN (2001)
Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit der Mikrodilution
Chemotherapie Journal; Heft 3, 78-98
- STOKSTAD E. L. R., T. H. JUKES, J. PIERCE, A. C. PAGE, A. L. FRANKLIN (1949)
The multiple nature of the animal protein factor
J. Biol. Chem.; 180, 647-654
- STOLK-ENGELAAR V. M., J. F. G. M. MEIS, J. A. MULDER, F. L. A. LOEFFEN, J. A. HOOBKAMP-KORSTANJE (1995)
In-vitro antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolates from stools of patients in The Netherlands from 1982-1991
J. Antimicrob. Chemoth.; 36, 839-843
- STOLK-ENGELAAR V.M., J.A. HOOBKAMP-KORSANTJE (1996)
Clinical presentation and diagnosis of gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica* in 261 Dutch patients
Scand. J. Infect. Dis.; 28, 571-575

- STOLLE A. (1989)
Die hygienischen Rahmenbedingungen während des Schlachtvorganges
Prakt. Tierarzt, 12, 5-15
- SUNDSFJORD A., G. S. SIMONSEN, B. C. HALDORSEN, H. HAAHEIM, S. HJELMEVOLL, P. LITTAUER und K. H. DAHL (2004)
Genetic methods for detection of antimicrobial resistance
APMIS; 112: 815-837
- SVA (2006)
National Veterinary Institute of Sweden
VetMIC™
(<http://www.sva.se>)
Abrufdatum: 12.06.2006
- TACKET C. O., J. P. NARAIN; R. SATTIN, J. P. LOFGREN, C. Jr. KONIGSBERG, R. C. RENDTORFF, A. RAUSA, B. R. DAVIS, M. L. COHEN (1984)
A multistate outbreak of infections caused by *Yersinia enterocolitica* transmitted by pasteurized milk
JAMA; 251, 483-486
- TACKET C. O., J. BALLARD, N. HARRIS, J. ALLARD, C. NOLAN, T. QUAN, M. L. COHEN (1985)
An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd)
Am. J. Epidemiol.; 121, 705-711
- TEUBER M. (1999)
Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens
Cell. Mol. Life. Sci.; 56, 755-763
- TROLLDENIER H., F. R. UNGEMACH (1999)
Chemotherapeutika
In: WIESNER E., R. RIBBECK (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin 4. Aufl., Enke, Stuttgart, S. 256
- TROLLDENIER H. (1999)
Resistenz
In: WIESNER E., R. RIBBECK (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin 4. Aufl., Enke, Stuttgart, S. 1234
- UNGEMACH F. R. (1999)
Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin: Konsequenzen und rationaler Umgang
Tierärztl. Praxis; 27 (G), 335-340

- VAN DEN BOGAARD A. E. und E. E. STOBBERINGH (1999)
Antibiotic usage in animals
Impact on bacterial resistance and public health
Drugs; 58, 589-607
- VAN DEN BOGAARD A. E. und E. E. STOBBERINGH (2000)
Epidemiology of resistance to antibiotics; links between animals and humans
Int. J. Antimicrob. Ag.; 14, 327-335
- VARALDO P. E. (2002)
Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic
J. Antimicrob. Chemoth.; 50, 1-4
- VETIDATA (2007)
www.vetidata.de
Abrufdatum: 18.02.2007
- VIDON D. J. M. und C. L. DELMAS (1981)
Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in eastern France
Appl. Environ. Microb.; 41, 355-359
- WALLMANN J., K. SCHRÖTER, L. H. WIELER, R. KROKER (2003)
Antibiotikaempfindlichkeit ausgewählter pathogener Bakterien von erkrankten
Lebensmittel liefernden Tieren in Deutschland
Ergebnisse aus der Modellstudie 2001 des nationalen Resistenzmonitorings
Tierärztl. Prax;31 (G):122-131
- WERCKENTHIN C. (2004)
„Wirkungsmechanismen antibakterieller Stoffe und Resistenzentwicklung“
Skriptum zum Wahlpflicht-Seminar, LMU-München, Sommersemester 2004
- WERCKENTHIN C., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, K. HARTMANN, M. KASKE, C.
KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T.
KÜHN, G. LUHOFER, A. RICHTER, B. SCHULZ, S. SCHWARZ, C. SIGGE, W.
TRAEDER, K. H. WALDMANN, J. WALLMANN (2005)
Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der
Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die
Empfindlichkeitsprüfung
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Heft 11/12;118, 471-480
- WITTE W. (2000)
Ecological impact of antibiotic use in animals an different complex microflora:
environment
Int. J. Antimicrob. Ag.; 14, 321-325
- WOODFORD N. und A. SUNDSFJORD (2005)
Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?
J. Antimicrob. Chemoth.; 56, 259-261

ZHANG Y., A. TOIVANEN, P. TOIVANEN (1997)

Experimental *Yersinia*-triggered reactive arthritis: effects of a 3-week course of ciprofloxacin

Br. J. Rheumatol.; 36, 541-546

Richtlinien und Verordnungen

98/179/EG:

Entscheidung der Kommission vom 23. Februar 1998 mit Durchführungsvorschriften für die amtlichen Probenahmen zur Kontrolle von lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände

(ABl. Nr. L65 vom 5.3.1998 S. 31)

([http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/oj/1998/l_065/l_06519980305de00310034.pdf)

[lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/oj/1998/l_065/l_06519980305de00310034.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/oj/1998/l_065/l_06519980305de00310034.pdf))

Abrufdatum: 27.03.2007

97/747/EG:

Entscheidung der Kommission vom 27. Oktober 1997 über Umfang und Häufigkeit der in der Richtlinie 96/23/EG des Rates vorgesehenen Probenahmen zum Zweck der Untersuchung in Bezug auf bestimmte Stoffe und ihre Rückstände in bestimmten tierischen Erzeugnissen

([http://eur-](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=de&type doc=Decision&an doc=1997&nu doc=747)

[lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=de&type doc=Decision&an doc=1997&nu doc=747](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=de&type doc=Decision&an doc=1997&nu doc=747))

Abrufdatum: 27.03.2007

96/23/EG:

Richtlinie des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG

(<http://europa.eu/scadplus/leg/de/lvb/l12033b.htm>)

Abrufdatum: 27.03.2007

(EWG) Nr. 2377/90:

Verordnung des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs

(http://www.vetion.de/gesetze/Gesetzestexte/2377_90.htm?mainPage=1)

Abrufdatum: 27.03.2007

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	In Deutschland für die orale Verabreichung zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe bei Lebensmittel liefernden Tieren	4
Tabelle 2	Nur in der Veterinärmedizin zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe sowie ihre Zugehörigkeit zu einer Wirkstoffgruppe	5
Tabelle 3	Veterinärmedizinischer Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in Deutschland	6
Tabelle 4	Veterinärmedizinischer Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe in unterschiedlichen EU-Staaten	7
Tabelle 5	Als Leistungsförderer in der EU zugelassene antimikrobielle Wirkstoffe	11
Tabelle 6	Zeitintervalle zwischen der Entdeckung antimikrobieller Wirkstoffe, dem Beginn ihres klinischen Einsatzes und Auftreten erster Resistenzen	12
Tabelle 7	Beispiele unterschiedlicher Resistenzmechanismen gegen antibakterielle Wirkstoffe sowie Lokalisation der Resistenzgene auf verschiedenen genetischen Elementen bei gramnegativen Bakterien	19
Tabelle 8	Höchstmengenüberschreitungen antibakterieller Wirkstoffe bei Rindern, Schweinen und Geflügel für das Jahr 2005	24
Tabelle 9	Häufigkeiten gemeldeter <i>Y. enterocolitica</i> -, <i>Campylobacter</i> - und <i>Salmonella</i> -Erkrankungen in Deutschland	35
Tabelle 10	Ergebnisse resistenter <i>Y. enterocolitica</i> des Serotyps O:3 aus weltweit durchgeführten Empfindlichkeitsbestimmungen	38
Tabelle 11	Herkunft und Anzahl der im Resistenztest untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> Stämme, Bioserotyp 4/O:3	50
Tabelle 12	Belegung der im Agardiffusionstest verwendeten Testblättchen	51
Tabelle 13	Belegung der antimikrobiellen Wirkstoffe für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode	52
Tabelle 14	Durchschnittliche Ergebnisse der photometrischen Dichtebestimmung sowie der Keimzählung mittels Tropfplattenverfahren	56
Tabelle 15	Hemmhofbewertungsschlüssel für <i>Enterobacteriaceae</i>	58

Tabelle 16	Hemmhofbewertungsschlüssel für Qualitätskontrollstämmen	60
Tabelle 17	Minimale Hemmstoffkonzentration-Bewertungsschlüssel für <i>Enterobacteriaceae</i>	62
Tabelle 18	Minimale Hemmstoffkonzentration für den Qualitätskontrollstamm <i>E. coli</i> DSM® 1103 bei Verwendung von MH-Bouillon	62
Tabelle 19	Ergebnisse der im Agardiffusionstest untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme des Bioserotyps 4/O:3 mit Angabe der Stammherkunft	68
Tabelle 20	Ergebnisvergleich humaner und porciner <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme aus der Agardiffusionsmethode	69
Tabelle 21	Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilution ermittelten MHK-Werte bei 110 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen (4/O:3)	71
Tabelle 22	Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilution ermittelten resistenten und intermediären <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme des Bioserotyps 4/O:3 mit Angabe ihrer Herkunft	73
Tabelle 23	Ergebnisvergleich der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten Stämme, humaner und porciner Herkunft	74
Anhang		
Tabelle I	Referenzstämmen für Agardiffusions- und Mikrodilutionsmethode	113
Tabelle II	Herkunft der untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3)	113
Tabelle III	Ergebnisse der mittels Agardiffusionsmethode untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) auf 15 antimikrobielle Wirkstoffe	114
Tabelle IV	Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) auf 13 antimikrobielle Wirkstoffe	117

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Korrelation von HHD-Werten und MHK-Werten (nach SCHWARZ et al. 2003)	45
Abbildung 2	Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben, zur Einstellung der Bakteriendichte auf 10^8 KBE/ml	55
Abbildung 3	Durchführung der Agardiffusionsmethode	59
Abbildung 4	Prozentuale Ergebnisverteilung der mittels Agardiffusionsmethode verwendeten antimikrobiellen Wirkstoffe mit Angabe sensibler, intermediärer und resistenter <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme	63
Abbildung 5a/b	Verteilung der Hemmhofdurchmesser für die mittels Agardiffusionsverfahren getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe bei 200 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämmen (4/O:3)	65/66
Abbildung 6	110 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) gegenüber Ampicillin	75
Abbildung 7	110 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) gegenüber Streptomycin	76
Abbildung 8	110 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) gegenüber Sulphamethoxazol	77
Abbildung 9	110 <i>Y. enterocolitica</i> -Stämme (4/O:3) gegenüber Tetracyclin	78

11. ANHANG

Medien und Lösungen

Blutagarplatten (BAP)

Columbia Agar mit Schafblut plus, gebrauchsfertig. OXOID

Mueller-Hinton Agar (MH-Agar) OXOID

Mueller-Hinton-Agar 38 g

Aqua bidest. 1000 ml

Das Medium autoklavieren, auf 52°C abkühlen lassen, 4 mm hohe Platten giessen und bei 4°C aufbewahren.

Plate-Count-Agar (PC-Agar) MERCK

Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar 22,5 g

Aqua bidest. 1000 ml

Das Medium autoklavieren, auf 52°C abkühlen lassen, ca. 4 mm hohe Platten giessen und bei 4°C aufbewahren.

Mueller-Hinton Bouillon (MH-Bouillon) OXOID

Mueller-Hinton Bouillon 21 g

Aqua bidest. 1000 ml

Das Medium zu 5 bzw. 9 ml in Reagenzläser abfüllen, autoklavieren, und bei 4°C aufbewahren.

Calciumchlorid-Stammlösung (10 mg/ml)

CaCl₂ x 6H₂O 3,68 g

Aqua bidest. 100 ml

Durch Membranfiltration sterilisieren und bei 4°C aufbewahren.

Magnesiumchlorid-Stammlösung (10 mg/ml)

MgCl₂ x 6H₂O 8,36 g

Aqua bidest. 100 ml

Durch Membranfiltration sterilisieren und bei 4°C aufbewahren.

Kationenadjustierte Mueller-Hinton Bouillon (CAMHB)

Magnesiumchlorid-Stammlösung 0,6 ml

Calciumchlorid-Stammlösung 1,9 ml

Mueller-Hinton Bouillon, gebrauchsfertig 1000 ml

Die beiden Zusätze der gebrauchsfertigen Lösung unter sterilen Bedingungen zufügen, gut mischen, jeweils 10 ml in sterile Reagenzgläser abfüllen und bei 4°C aufbewahren.

Physiologische Kochsalzlösung (0,85%)

NaCl 8,5 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

Jeweils 10 ml der Lösung in Reagenzgläser abfüllen, autoklavieren, und bei 4°C aufbewahren.

Peptonwasser ohne Agar

MERCK

Pepton aus Fleisch pankreatisch verdaut 1 g

Natriumchlorid 8,5 g

Aqua bidest. ad 1000 ml

Mischen, je 9 ml in Reagenzgläser abfüllen, autoklavieren und bei 4°C aufbewahren.

ChemikalienAntimikrobiell haltige Testblättchen

OXOID

(Amp 10µg, Amc 30(20/10) µg, Ctx 30 µg,

Azt 30 µg, Chl 30 µg, Col 25 µg, Eryt 15 µg,

Gen 10 µg, S 10 µg, Na 30 µg, Cip 5 µg,

Te 30 µg, Su 25 µg, Su/T 25(1,25/23,75) µg, T 5 µg)

Antimikrobiell haltige Mikrotiterplatten (MTP)

VetMIC™ GN-mo (version3)

SVA

(Nationales Veterinärinstitut Schwedens)

Allgemeine MaterialienMcFarland Standard 0,5

BIO MÉRIEUX

Sterile Wattetupfer

GREINER BIO ONE

Dispenser

OXOID

Bio Photometer 6131

EPPENDORF

Küvetten

UVette®

EPPENDORF

Waagen

Analysenwaage CP3202S-OCE

SARTORIUS

Analysenwaage AC210S

SARTORIUS

Magnetrührer mit Heizplatte

Magnetrührwerk MR 2002

HEIDOLPH

Typ RCT Janke und Kunkel

IK LABORTECHNIK

Pipetten

Research 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl

EPPENDORF

Pipettenspitzen

ep T.I.P.S. Standardtips 100 µl, 1000 µl, 5000 µl

EPPENDORF

ep T.I.P.S. filter PCR clean 10 µl, 100 µl, 1000 µl

EPPENDORF

Glaspipetten

Silberbrand-Eterna, Klasse B, 5 ml, 10 ml

BENDER & HOBEIN

Dispensierhilfe

Dispensette ® 0-10 ml

BRAND

Reagenzgläser

SCHOTT

Vortex-Mixer

JANKE & KUNKEL

Wattestopfen

STERI-Wattestopfen Nr. 14

SCHUBERT

Messzylinder 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml

BRAND

Aufbewahrungsgefäße

Erlenmeyerkolben 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml

MERCK

Petrischalen

WALDECK

Ösen

Platinum/Iridium-Ösen 90/10

BENDER & HOBEIN

Brutschränke

Typ B 6060, Typ B 6200

HERAEUS INSTRUMENTS

Autoklav

Hochdruckdampf-Sterilisator Typ 112

KSG STERILISATOREN GmbH

Sterilbank

HeraSafe

KENDRO

Kühlschränke

Kühl-Gefrier-Kombination Typ „Premium“

LIEBHERR

Mikrobank

Microbank® (PRO-LAB DIAGNOSTICS, PL 160) zur Aufbewahrung von Keimen

Tabelle I: Referenzstämme für Agardiffusions- und Mikrodilutionsmethode

Nr.	Stamm
a	<i>E. coli</i> DSM 1103
b	<i>S. aureus</i> DSM 1104

Tabelle II: Herkunft der untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme (4/0:3)

Nr.	Herkunft	Nr.	Herkunft	Nr.	Herkunft	Nr.	Herkunft
1	Msch Kot	51	Schwein	101	Schw Tons	151	Schw Tons
2	Msch Kot	52	Schw Flstck	102	Schw Tons	152	Schw Tons
3	Msch Kot	53	Schw Flstck	103	Schw Tons	153	Schw Tons
4	Msch Kot	54	Schw Leber	104	Schw Tons	154	Schw Tons
5	Msch Kot	55	Ferkel	105	Schw Kot	155	Schw Tons
6	Schw Tons	56	Msch Kot	106	Schw Tons	156	Schw Kot
7	Schw Tons	57	Msch Kot	107	Schwein	157	Schw Kot
8	Schw Tons	58	Msch Kot	108	Schw Leber	158	Schw Kot
9	Schw Tons	59	Msch Kot	109	Schw Flstck	159	Schw Tons
10	Schw Kot	60	Msch Kot	110	Schw Schlegel	160	Schw Tons
11	Schw Kopffl	61	Hackfl	111	Msch Kot	161	Msch Kot
12	Schw Schlegel	62	Hackfl	112	Msch Kot	162	Msch Kot
13	Schw Schlegel	63	Hackfl	113	Msch Kot	163	Msch Kot
14	Hackfl	64	Hackfl	114	Msch Kot	164	Msch Kot
15	Schw Schinken	65	Hackfl	115	Msch Kot	165	Msch Kot
16	Msch Kot	66	Hackfl	116	Msch Kot	166	Msch Kot
17	Msch Kot	67	Schw Kopffl	117	Msch Kot	167	Schw Herz
18	Msch Kot	68	Schw Speck	118	Msch Kot	168	Schw Lunge
19	Msch Kot	69	Hackfl	119	Msch Kot	169	Schw Zunge
20	Msch Kot	70	Hackfl	120	Msch Kot	170	Schw Herz
21	Schw Tons	71	Schw Tons	121	Schw Tons	171	Schw Herz
22	Schw Kot	72	Schw Kot	122	Schw Tons	172	Schw Zunge
23	Schw Kot	73	Schw Kot	123	Schw Tons	173	Schw Lunge
24	Schw Tons	74	Schw Tons	124	Schw Tons	174	Schw Leber
25	Schw Tons	75	Schw Kot	125	Schw Tons	175	Schw Tons
26	Hackfl	76	Schw Tons	126	Schw Tons	176	Schw Tons
27	Hackfl	77	Schw Tons	127	Schw Tons	177	Schw Tons
28	Hackfl	78	Schw Tons	128	Schw Tons	178	Schw Tons
29	Hackfl	79	Schw Tons	129	Schw Tons	179	Schw Tons
30	Schw Kopffl	80	Schw Tons	130	Schw Tons	180	Schw Tons
31	Msch Kot	81	Schw Tons	131	Schw Herz	181	Schw Tons
32	Msch Kot	82	Schw Kot	132	Schw Zunge	182	Msch Kot
33	Msch Kot	83	Schw Kot	133	Schw Niere	183	Msch Kot
34	Msch Kot	84	Schw Tons	134	Schw Herz	184	Msch Kot
35	Msch Kot	85	Schw Tons	135	Schw Herz	185	Msch Kot
36	Schw Kot	86	Msch Kot	136	Schw Zunge	186	Msch Kot
37	Schw Kot	87	Msch Kot	137	Hackfl	187	Msch Kot
38	Schw Tons	88	Msch Kot	138	Hackfl	188	Schw Tons
39	Schw Tons	89	Msch Kot	139	Hackfl	189	Schw Tons
40	Schw Kot	90	Msch Kot	140	Schw Speck	190	Schw Tons
41	Schw Tons	91	Hackfl	141	Hackfl	191	Schw Tons
42	Schw Tons	92	Hackfl	142	Hackfl	192	Schw Tons
43	Schw Tons	93	Hackfl	143	Msch Kot	193	Schw Tons
44	Schw Tons	94	Hackfl	144	Msch Kot	194	Schw Tons
45	Ferkel	95	Schwein	145	Msch Kot	195	Schw Tons
46	Schwein	96	Msch Kot	146	Msch Kot	196	Schw Kot
47	Schw Schlegel	97	Msch Kot	147	Msch Kot	197	Schw Kot
48	Schw Leber	98	Msch Kot	148	Msch Kot	198	Schw Tons
49	Schw Niere	99	Msch Kot	149	Msch Kot	199	Schw Tons
50	Schw Zunge	100	Msch Kot	150	Msch Kot	200	Schw Tons

Nr.= Laufende Nummer der *Y. enterocolitica*-Stämme

Msch= Mensch, Schw= Schwein, Tons= Tonsillen, Kopffl= Kopffleisch, Hackfl= Hackfleisch, Flstck= Fleischstücke

Tabelle III: Ergebnisse der mittels Agardiffusionsmethode untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme (4/O:3) auf 15 antimikrobielle Wirkstoffe

(Nr.= laufende Nummer der untersuchten Stämme, a= *E. coli* DSM 1103, b= *S. aureus* DSM 1104. Amc= Amoxicilin/Clavulansäure, Amp= Ampicillin, Azt= Aztreonam, Ctx= Cefotaxim, Su= Sulphamethoxazol, Gen= Gentamicin, Sm= Streptomycin, Te= Tetracyclin, Eryt= Erythromycin, Su/T= Sulphamethoxazol/Trimethoprim, Col= Colistin, Chl= Chloramphenicol, T= Trimethoprim, Na= Nalidixinsäure, Cip= Ciprofloxacin; Zahlen hinter den antimikrobiellen Wirkstoffen geben die verwendeten Konzentrationen in µg an; S= sensibel, I= intermediär, R= resistent)

Nr.	Amc 30	Amp 10	Azt 30	Ctx 30	Su 25	Gen 10	Sm 10	Te 30	Eryt 15	Su/T 25	Col 25	Chl 30	T 5	Na 30	Cip 5
a	24 S	23 S	36 S	35 S	24 S	25 S	19 S	19 S	8 R	30 S	15 S	28 S	28 S	26 S	34 S
b	38 S	36 S	0 R	34 S	24 S	27 S	23 S	30 S	30 S	33 S	9 R	25 S	29 S	15 I	29 S
1	28 S	10 R	34 S	42 S	25 S	23 S	18 S	32 S	14 I	34 S	21 S	30 S	28 S	33 S	40 S
2	26 S	19 S	36 S	42 S	27 S	25 S	19 S	30 S	14 I	35 S	19 S	30 S	26 S	34 S	38 S
3	28 S	17 S	37 S	40 S	24 S	23 S	0 R	30 S	15 I	34 S	20 S	27 S	23 S	33 S	35 S
a	23 S	19 S	33 S	33 S	19 S	23 S	20 S	21 S	10 R	30 S	15 S	25 S	27 S	24 S	30 S
b	37 S	37 S	0 R	33 S	25 S	25 S	22 S	30 S	29 S	31 S	8 R	27 S	28 S	25 S	27 S
4	24 S	10 R	34 S	40 S	30 S	23 S	19 S	30 S	12 R	35 S	19 S	28 S	23 S	33 S	36 S
5	23 S	10 R	36 S	44 S	20 S	24 S	20 S	34 S	17 I	33 S	20 S	28 S	22 S	33 S	39 S
6	24 S	10 R	34 S	40 S	30 S	24 S	0 R	32 S	12 R	33 S	20 S	28 S	23 S	34 S	38 S
7	21 S	10 R	34 S	40 S	28 S	23 S	20 S	32 S	16 I	36 S	19 S	28 S	24 S	33 S	37 S
8	22 S	10 R	34 S	40 S	22 S	22 S	18 S	31 S	14 I	35 S	20 S	29 S	25 S	33 S	36 S
9	21 S	10 R	36 S	40 S	26 S	22 S	18 S	31 S	14 I	35 S	20 S	29 S	25 S	33 S	39 S
10	23 S	10 R	36 S	44 S	24 S	24 S	22 S	33 S	13 R	35 S	20 S	28 S	23 S	33 S	37 S
11	23 S	12 R	34 S	40 S	21 S	24 S	20 S	31 S	11 R	33 S	19 S	27 S	21 S	32 S	37 S
a	24 S	21 S	33 S	33 S	20 S	23 S	19 S	19 S	8 R	28 S	15 S	26 S	28 S	24 S	29 S
b	37 S	35 S	0 R	33 S	23 S	25 S	21 S	29 S	29 S	32 S	8 R	26 S	28 S	17 I	26 S
12	22 S	8 R	34 S	38 S	26 S	23 S	24 S	31 S	12 R	30 S	19 S	30 S	25 S	33 S	37 S
13	25 S	8 R	36 S	40 S	25 S	23 S	19 S	32 S	13 R	35 S	19 S	28 S	24 S	33 S	37 S
14	25 S	8 R	34 S	40 S	27 S	23 S	19 S	31 S	11 R	33 S	19 S	28 S	23 S	33 S	36 S
15	23 S	8 R	36 S	40 S	24 S	23 S	19 S	30 S	11 R	33 S	19 S	30 S	26 S	32 S	35 S
16	22 S	8 R	36 S	40 S	24 S	23 S	18 S	29 S	17 I	32 S	20 S	31 S	24 S	35 S	41 S
17	23 S	8 R	36 S	40 S	20 S	23 S	18 S	29 S	13 R	35 S	20 S	30 S	24 S	33 S	40 S
18	24 S	8 R	34 S	39 S	25 S	20 S	17 S	31 S	13 R	33 S	19 S	29 S	23 S	34 S	37 S
19	23 S	8 R	36 S	40 S	20 S	22 S	18 S	31 S	13 R	31 S	19 S	30 S	24 S	31 S	35 S
a	25 S	23 S	33 S	34 S	20 S	20 S	18 S	26 S	10 R	30 S	15 S	25 S	28 S	24 S	29 S
b	38 S	38 S	0 R	32 S	25 S	24 S	19 S	30 S	30 S	32 S	0 R	26 S	28 S	11 R	31 S
20	31 S	8 R	34 S	38 S	20 S	22 S	17 S	30 S	12 R	30 S	19 S	25 S	20 S	30 S	34 S
21	25 S	10 R	36 S	42 S	17 S	21 S	17 S	26 S	10 R	30 S	19 S	26 S	22 S	28 S	33 S
22	24 S	8 R	36 S	40 S	19 S	21 S	18 S	28 S	10 R	29 S	19 S	26 S	22 S	30 S	32 S
23	24 S	10 R	36 S	42 S	18 S	22 S	17 S	32 S	0 R	27 S	19 S	25 S	21 S	28 S	32 S
24	24 S	8 R	36 S	40 S	20 S	21 S	17 S	31 S	10 R	31 S	19 S	25 S	22 S	29 S	34 S
25	23 S	8 R	36 S	40 S	22 S	22 S	18 S	30 S	8 R	30 S	19 S	26 S	23 S	28 S	32 S
26	21 S	8 R	34 S	38 S	20 S	20 S	17 S	30 S	14 I	28 S	19 S	24 S	19 S	28 S	33 S
27	24 S	8 R	34 S	40 S	22 S	22 S	17 S	30 S	10 R	28 S	19 S	28 S	21 S	26 S	33 S
a	25 S	23 S	33 S	33 S	21 S	21 S	17 S	26 S	11 R	29 S	16 S	25 S	28 S	25 S	26 S
b	37 S	33 S	0 R	30 S	25 S	29 S	18 S	26 S	28 S	32 S	0 R	25 S	28 S	8 R	32 S
28	28 S	8 R	36 S	40 S	18 S	23 S	18 S	30 S	12 R	31 S	21 S	29 S	24 S	35 S	37 S
29	24 S	8 R	36 S	41 S	27 S	21 S	17 S	28 S	8 R	30 S	20 S	28 S	21 S	29 S	30 S
30	23 S	10 R	36 S	42 S	18 S	21 S	17 S	28 S	13 R	32 S	20 S	28 S	20 S	27 S	32 S
31	23 S	0 R	36 S	44 S	22 S	21 S	15 S	27 S	8 R	29 S	20 S	26 S	23 S	25 S	30 S
32	23 S	8 R	35 S	40 S	20 S	21 S	16 S	29 S	9 R	30 S	19 S	25 S	22 S	27 S	33 S
33	31 S	14 I	36 S	42 S	21 S	21 S	16 S	28 S	10 R	28 S	19 S	26 S	20 S	25 S	30 S
34	25 S	10 R	34 S	39 S	22 S	20 S	15 S	25 S	10 R	28 S	19 S	27 S	23 S	30 S	34 S
35	23 S	8 R	34 S	40 S	23 S	21 S	16 S	28 S	13 R	28 S	19 S	27 S	22 S	28 S	31 S
a	25 S	22 S	32 S	34 S	20 S	20 S	17 S	26 S	10 R	30 S	16 S	25 S	28 S	24 S	30 S
b	37 S	36 S	0 R	32 S	26 S	27 S	18 S	28 S	29 S	33 S	0 R	25 S	27 S	12 R	29 S
36	24 S	10 R	35 S	40 S	22 S	22 S	17 S	29 S	0 R	21 S	20 S	28 S	23 S	23 S	32 S
37	23 S	10 R	32 S	37 S	20 S	21 S	16 S	28 S	11 R	26 S	20 S	28 S	22 S	31 S	34 S
38	24 S	14 I	36 S	38 S	28 S	20 S	15 S	21 S	0 R	28 S	20 S	24 S	23 S	28 S	31 S
39	21 S	10 R	33 S	39 S	24 S	20 S	16 S	26 S	0 R	27 S	19 S	26 S	21 S	29 S	32 S
40	22 S	10 R	36 S	41 S	25 S	20 S	17 S	28 S	0 R	25 S	20 S	26 S	20 S	30 S	33 S
41	21 S	12 R	35 S	41 S	24 S	20 S	16 S	27 S	0 R	28 S	20 S	25 S	20 S	29 S	35 S
42	21 S	10 R	34 S	38 S	26 S	21 S	18 S	25 S	10 R	27 S	20 S	27 S	23 S	30 S	34 S
43	20 S	10 R	35 S	39 S	21 S	22 S	17 S	27 S	0 R	26 S	19 S	24 S	20 S	32 S	37 S
a	24 S	22 S	32 S	33 S	21 S	21 S	17 S	23 S	10 R	30 S	17 S	27 S	30 S	25 S	31 S
b	38 S	37 S	0 R	31 S	25 S	26 S	19 S	30 S	27 S	33 S	0 R	27 S	30 S	13 R	32 S
44	23 S	8 R	34 S	38 S	22 S	21 S	15 S	30 S	0 R	30 S	20 S	25 S	24 S	29 S	33 S
45	23 S	10 R	35 S	41 S	27 S	20 S	16 S	25 S	0 R	32 S	20 S	25 S	22 S	25 S	32 S

Nr.	Amc 30	Amp 10	Azt 30	Ctx 30	Su 25	Gen 10	Sm 10	Te 30	Eryt 15	Su/T 25	Col 25	Chl 30	T 5	Na 30	Cip 5																	
46	21	S	10	R	34	S	39	S	25	S	20	S	17	S	25	S	30	S														
47	22	S	10	R	35	S	41	S	23	S	21	S	17	S	28	S	29	S	28	S												
48	22	S	10	R	34	S	38	S	25	S	20	S	15	S	24	S	0	R	26	S	20	S	26	S	21	S	27	S	25	S	30	S
49	21	S	8	R	35	S	38	S	18	S	21	S	17	S	25	S	0	R	27	S	20	S	25	S	22	S	28	S	31	S		
50	22	S	10	R	35	S	39	S	21	S	20	S	16	S	28	S	0	R	24	S	20	S	25	S	23	S	28	S	34	S		
51	22	S	10	R	34	S	39	S	0	R	21	S	16	S	26	S	0	R	29	S	20	S	27	S	24	S	26	S	29	S		
a	23	S	22	S	33	S	32	S	21	S	21	S	17	S	26	S	11	R	29	S	17	S	26	S	30	S	25	S	32	S		
b	38	S	36	S	0	R	32	S	24	S	25	S	19	S	30	S	28	S	33	S	0	R	25	S	28	S	12	R	31	S		
52	22	S	8	R	35	S	41	S	19	S	22	S	18	S	27	S	0	R	28	S	20	S	27	S	23	S	28	S	33	S		
53	21	S	10	R	34	S	39	S	13	I	21	S	16	S	27	S	9	R	27	S	19	S	26	S	21	S	28	S	32	S		
54	24	S	0	R	34	S	40	S	26	S	21	S	18	S	26	S	8	R	27	S	19	S	27	S	24	S	28	S	32	S		
55	21	S	10	R	34	S	39	S	13	I	22	S	18	S	28	S	9	R	27	S	19	S	27	S	23	S	26	S	32	S		
56	21	S	10	R	34	S	37	S	0	R	21	S	16	S	26	S	10	R	9	R	19	S	23	S	20	S	26	S	30	S		
57	21	S	10	R	34	S	39	S	17	S	20	S	17	S	25	S	9	R	27	S	19	S	26	S	24	S	28	S	33	S		
58	22	S	10	R	34	S	38	S	16	S	20	S	16	S	25	S	10	R	29	S	20	S	27	S	23	S	28	S	32	S		
59	20	S	8	R	33	S	38	S	15	I	20	S	15	S	21	S	9	R	27	S	19	S	26	S	20	S	30	S	34	S		
a	24	S	22	S	32	S	31	S	20	S	20	S	17	S	23	S	10	R	30	S	16	S	26	S	29	S	25	S	30	S		
b	38	S	36	S	0	R	31	S	23	S	24	S	18	S	29	S	27	S	32	S	0	R	25	S	28	S	12	R	30	S		
60	23	S	8	R	35	S	40	S	22	S	21	S	17	S	28	S	12	R	31	S	19	S	25	S	23	S	27	S	34	S		
61	23	S	8	R	35	S	38	S	20	S	21	S	17	S	28	S	10	R	27	S	19	S	25	S	23	S	25	S	29	S		
62	22	S	8	R	35	S	40	S	20	S	21	S	17	S	28	S	9	R	27	S	19	S	25	S	24	S	27	S	34	S		
63	22	S	8	R	35	S	40	S	19	S	22	S	17	S	27	S	8	R	27	S	19	S	24	S	22	S	27	S	31	S		
64	20	S	8	R	36	S	40	S	18	S	21	S	16	S	25	S	11	R	27	S	20	S	25	S	18	S	28	S	31	S		
65	22	S	11	R	34	S	38	S	18	S	20	S	16	S	27	S	11	R	28	S	20	S	27	S	21	S	28	S	35	S		
66	22	S	9	R	34	S	40	S	20	S	21	S	17	S	25	S	9	R	26	S	19	S	24	S	23	S	26	S	30	S		
67	22	S	9	R	35	S	40	S	20	S	21	S	17	S	27	S	10	R	26	S	19	S	24	S	21	S	26	S	31	S		
68	23	S	10	R	36	S	40	S	18	S	22	S	17	S	27	S	8	R	28	S	20	S	24	S	19	S	27	S	32	S		
69	21	S	8	R	36	S	40	S	15	S	22	S	0	R	28	S	10	R	27	S	19	S	24	S	18	S	25	S	31	S		
a	25	S	22	S	33	S	34	S	22	S	22	S	18	S	25	S	11	R	31	S	17	S	26	S	31	S	25	S	33	S		
b	38	S	37	S	0	R	32	S	28	S	25	S	19	S	30	S	27	S	33	S	0	R	27	S	29	S	12	R	31	S		
70	25	S	8	R	37	S	42	S	22	S	22	S	0	R	28	S	10	R	31	S	20	S	28	S	24	S	30	S	31	S		
71	23	S	10	R	38	S	40	S	21	S	21	S	17	S	28	S	11	R	30	S	20	S	30	S	24	S	32	S	33	S		
72	24	S	8	R	37	S	42	S	20	S	22	S	18	S	27	S	10	R	30	S	20	S	26	S	23	S	29	S	34	S		
73	24	S	8	R	36	S	40	S	20	S	21	S	15	S	28	S	8	R	30	S	20	S	27	S	24	S	28	S	34	S		
74	24	S	10	R	37	S	42	S	21	S	21	S	17	S	27	S	11	R	30	S	21	S	27	S	22	S	28	S	33	S		
75	24	S	10	R	36	S	42	S	21	S	21	S	16	S	26	S	12	R	28	S	20	S	27	S	22	S	26	S	31	S		
76	22	S	8	R	36	S	40	S	24	S	20	S	15	S	27	S	8	R	29	S	20	S	27	S	22	S	27	S	31	S		
77	23	S	0	R	35	S	41	S	0	R	21	S	15	S	28	S	10	R	25	S	20	S	25	S	22	S	25	S	31	S		
78	24	S	10	R	37	S	42	S	17	S	20	S	0	R	26	S	8	R	27	S	20	S	27	S	20	S	27	S	32	S		
79	23	S	8	R	38	S	42	S	19	S	22	S	16	S	26	S	8	R	27	S	21	S	27	S	19	S	26	S	31	S		
a	24	S	23	S	32	S	33	S	21	S	21	S	18	S	24	S	12	R	30	S	17	S	25	S	30	S	25	S	32	S		
b	38	S	36	S	0	R	31	S	23	S	26	S	19	S	31	S	28	S	32	S	0	R	26	S	29	S	11	R	31	S		
80	23	S	10	R	36	S	40	S	18	S	20	S	0	R	27	S	9	R	31	S	21	S	28	S	20	S	28	S	32	S		
81	22	S	10	R	36	S	42	S	19	S	21	S	0	R	30	S	8	R	31	S	20	S	27	S	21	S	28	S	32	S		
82	22	S	10	R	36	S	40	S	20	S	20	S	16	S	29	S	11	R	30	S	20	S	28	S	22	S	26	S	31	S		
83	22	S	8	R	36	S	42	S	18	S	21	S	0	R	31	S	11	R	29	S	21	S	28	S	22	S	27	S	34	S		
84	21	S	8	R	36	S	40	S	18	S	21	S	17	S	30	S	10	R	27	S	20	S	28	S	21	S	25	S	30	S		
85	23	S	12	R	36	S	42	S	21	S	21	S	16	S	30	S	10	R	31	S	20	S	26	S	22	S	26	S	33	S		
86	21	S	8	R	36	S	42	S	19	S	21	S	16	S	27	S	10	R	31	S	20	S	27	S	23	S	27	S	33	S		
87	22	S	8	R	36	S	40	S	18	S	20	S	15	S	27	S	10	R	26	S	20	S	25	S	22	S	28	S	31	S		
88	20	S	8	R	36	S	41	S	19	S	21	S	16	S	28	S	12	R	27	S	19	S	28	S	23	S	26	S	31	S		
89	21	S	8	R	36	S	40	S	0	R	20	S	15	S	27	S	10	R	26	S	19	S	27	S	23	S	29	S	33	S		
a	23	S	21	S	32	S	32	S	19	S	20	S	17	S	24	S	11	R	30	S	16	S	24	S	30	S	24	S	32	S		
b	38	S	36	S	0	R	33	S	25	S	24	S	18	S	31	S	26	S	33	S	0	R	25	S	29	S	12	R	31	S		
90	21	S	8	R	35	S	40	S	17	S	21	S	16	S	29	S	10	R	32	S	20	S	25	S	20	S	27	S	32	S		
91	22	S	0	R	38	S	40	S	19	S	21	S	16	S	26	S	9	R	27	S	19	S	26	S	24	S	28	S	28	S		
92	22	S	8	R	37	S	40	S	22	S	21	S	17	S	27	S	8	R	27	S	20	S	25	S	22	S	28	S	30	S		
93	21	S	9	R	37	S	39	S	18	S	21	S	18	S	25	S	8	R	28	S	19	S	23	S	18	S	29	S	31	S		
94	19	S	13	R	35	S	40	S	15	I	23	S	21	S	24	S	11	R	29	S	19	S	23	S	25	S	25	S	28	S		
95	21	S	8	R	38	S	40	S	18	S	20	S	15	S	25	S	8	R	27	S	20	S	27	S	21	S	25	S	30	S		
96	29	S	10	R	39	S	40	S	19	S	22	S	19	S	28	S	11	R	29	S	20	S	27	S	23	S	28	S	32	S		
97	23	S	10	R	37	S	40	S	18	S	21	S	16	S	27	S	11	R	28	S	20	S	25	S	21	S	29	S	30	S		
98	33	S	9	R	35	S	41	S	21	S	21	S	16	S	26	S	10	R	29	S	21	S	27	S	22	S	27	S	30	S		
99	23	S	9	R	37	S	40	S	20	S	22	S	18	S	26	S	9	R	29	S	20	S	26	S	22	S	28	S	33	S		
a	23	S	21	S	31	S	31	S	20																							

Nr.	Amc 30	Amp 10	Azt 30	Ctx 30	Su 25	Gen 10	Sm 10	Te 30	Eryt 15	Su/T 25	Col 25	Chl 30	T 5	Na 30	Cip 5																	
b	37	S	36	S	0	R	31	S	26	S	25	S	19	S	31	S	28	S	34	S	0	R	27	S	30	S	11	R	32	S		
110	25	S	12	R	40	S	40	S	22	S	22	S	18	S	30	S	20	S	31	S	20	S	28	S	24	S	30	S	29	S	35	S
111	25	S	11	R	39	S	43	S	16	S	22	S	18	S	31	S	10	R	28	S	20	S	27	S	20	S	29	S	32	S		
112	23	S	11	R	38	S	41	S	18	S	22	S	18	S	30	S	10	R	31	S	20	S	26	S	20	S	29	S	32	S		
113	26	S	9	R	35	S	39	S	21	S	22	S	18	S	29	S	0	R	31	S	20	S	28	S	23	S	27	S	32	S		
114	23	S	10	R	40	S	40	S	21	S	22	S	18	S	28	S	9	R	32	S	19	S	26	S	25	S	28	S	34	S		
115	24	S	10	R	38	S	39	S	19	S	22	S	17	S	28	S	9	R	30	S	19	S	27	S	23	S	27	S	32	S		
116	23	S	9	R	34	S	39	S	16	S	22	S	18	S	28	S	10	R	29	S	20	S	27	S	19	S	28	S	31	S		
117	23	S	8	R	37	S	39	S	16	S	20	S	17	S	28	S	12	R	30	S	19	S	27	S	23	S	26	S	31	S		
118	23	S	8	R	36	S	40	S	17	S	21	S	17	S	27	S	11	R	29	S	21	S	29	S	23	S	28	S	35	S		
119	24	S	8	R	36	S	40	S	20	S	22	S	18	S	29	S	11	R	31	S	20	S	29	S	23	S	23	S	31	S		
a	24	S	21	S	31	S	31	S	11	I	21	S	18	S	24	S	10	R	30	S	16	S	25	S	30	S	25	S	30	S		
b	36	S	37	S	0	R	29	S	25	S	25	S	19	S	29	S	26	S	33	S	0	R	25	S	30	S	13	R	30	S		
120	22	S	8	R	39	S	41	S	21	S	21	S	17	S	29	S	9	R	33	S	20	S	28	S	24	S	30	S	32	S		
121	20	S	8	R	37	S	40	S	20	S	20	S	16	S	26	S	11	R	27	S	19	S	27	S	21	S	26	S	32	S		
122	20	S	8	R	37	S	41	S	22	S	20	S	16	S	27	S	12	R	27	S	20	S	28	S	23	S	27	S	33	S		
123	20	S	0	R	37	S	40	S	18	S	21	S	16	S	29	S	8	R	32	S	20	S	27	S	22	S	27	S	32	S		
124	21	S	8	R	37	S	40	S	19	S	21	S	17	S	28	S	9	R	28	S	19	S	27	S	22	S	26	S	32	S		
125	21	S	8	R	35	S	40	S	20	S	20	S	16	S	27	S	11	R	32	S	20	S	27	S	23	S	29	S	33	S		
126	20	S	10	R	36	S	40	S	19	S	20	S	16	S	28	S	9	R	30	S	20	S	27	S	24	S	26	S	30	S		
127	20	S	0	R	34	S	40	S	18	S	20	S	15	S	28	S	0	R	27	S	20	S	26	S	20	S	29	S	35	S		
128	22	S	8	R	37	S	40	S	19	S	20	S	15	S	27	S	9	R	28	S	20	S	26	S	22	S	27	S	32	S		
129	21	S	8	R	34	S	40	S	18	S	20	S	15	S	28	S	9	R	28	S	20	S	27	S	22	S	29	S	31	S		
130	19	S	0	R	34	S	38	S	17	S	21	S	16	S	26	S	10	R	27	S	19	S	26	S	24	S	28	S	32	S		
131	20	S	0	R	34	S	41	S	18	S	20	S	16	S	29	S	9	R	28	S	20	S	25	S	26	S	30	S	34	S		
132	18	S	8	R	36	S	39	S	15	I	20	S	15	S	28	S	11	R	27	S	21	S	29	S	27	S	29	S	36	S		
133	20	S	9	R	37	S	40	S	13	I	20	S	0	R	28	S	9	R	26	S	20	S	27	S	24	S	27	S	33	S		
134	20	S	8	R	34	S	40	S	15	I	20	S	15	S	27	S	0	R	27	S	19	S	26	S	21	S	27	S	34	S		
a	23	S	22	S	31	S	32	S	21	S	20	S	17	S	23	S	10	R	30	S	16	S	26	S	30	S	25	S	32	S		
b	35	S	36	S	0	R	30	S	26	S	27	S	20	S	30	S	26	S	33	S	0	R	25	S	29	S	11	R	30	S		
135	24	S	0	R	40	S	42	S	22	S	22	S	18	S	27	S	9	R	33	S	20	S	26	S	20	S	33	S	34	S		
136	24	S	10	R	39	S	41	S	19	S	21	S	17	S	29	S	9	R	28	S	19	S	27	S	20	S	30	S	33	S		
137	24	S	11	R	38	S	41	S	22	S	21	S	16	S	29	S	14	I	33	S	20	S	27	S	23	S	27	S	36	S		
138	22	S	8	R	39	S	38	S	15	I	20	S	16	S	25	S	11	R	39	S	19	S	25	S	22	S	29	S	32	S		
139	24	S	10	R	39	S	41	S	17	S	21	S	18	S	27	S	9	R	30	S	19	S	29	S	21	S	30	S	33	S		
140	23	S	10	R	37	S	40	S	22	S	21	S	17	S	29	S	8	R	31	S	20	S	26	S	22	S	26	S	31	S		
141	23	S	9	R	37	S	39	S	20	S	21	S	17	S	28	S	9	R	29	S	19	S	26	S	21	S	27	S	30	S		
142	22	S	9	R	40	S	42	S	22	S	21	S	16	S	29	S	10	R	31	S	20	S	27	S	25	S	30	S	36	S		
143	22	S	9	R	39	S	39	S	11	I	20	S	16	S	28	S	11	R	26	S	20	S	25	S	20	S	29	S	34	S		
144	23	S	10	R	37	S	40	S	17	S	21	S	17	S	27	S	10	R	29	S	19	S	25	S	22	S	28	S	35	S		
145	22	S	9	R	38	S	40	S	20	S	21	S	17	S	30	S	10	R	30	S	19	S	25	S	20	S	30	S	31	S		
146	21	S	8	R	40	S	41	S	20	S	21	S	17	S	29	S	8	R	32	S	20	S	28	S	22	S	28	S	31	S		
147	24	S	10	R	39	S	40	S	18	S	21	S	17	S	27	S	9	R	31	S	19	S	27	S	23	S	30	S	34	S		
148	21	S	8	R	38	S	39	S	20	S	21	S	17	S	29	S	9	R	28	S	19	S	26	S	23	S	30	S	33	S		
149	22	S	9	R	36	S	40	S	18	S	20	S	16	S	27	S	9	R	30	S	19	S	27	S	23	S	29	S	32	S		
a	22	S	21	S	30	S	31	S	19	S	20	S	17	S	23	S	10	R	29	S	15	S	24	S	28	S	25	S	30	S		
b	36	S	37	S	0	R	30	S	27	S	25	S	18	S	29	S	27	S	33	S	0	R	25	S	30	S	10	R	30	S		
150	25	S	0	R	40	S	41	S	23	S	20	S	16	S	30	S	8	R	33	S	20	S	27	S	22	S	29	S	33	S		
151	25	S	8	R	38	S	39	S	23	S	20	S	16	S	29	S	8	R	32	S	19	S	25	S	23	S	30	S	32	S		
152	22	S	9	R	37	S	38	S	15	I	20	S	16	S	27	S	0	R	29	S	19	S	24	S	20	S	28	S	32	S		
153	22	S	9	R	36	S	39	S	16	S	20	S	16	S	28	S	0	R	28	S	19	S	25	S	22	S	28	S	31	S		
154	21	S	10	R	36	S	39	S	20	S	21	S	18	S	26	S	0	R	32	S	19	S	25	S	23	S	27	S	30	S		
155	20	S	10	R	40	S	40	S	20	S	21	S	18	S	28	S	8	R	30	S	19	S	26	S	22	S	29	S	32	S		
156	21	S	10	R	38	S	40	S	19	S	20	S	16	S	28	S	9	R	29	S	19	S	26	S	24	S	28	S	32	S		
157	20	S	10	R	39	S	41	S	20	S	21	S	17	S	27	S	8	R	32	S	20	S	28	S	23	S	28	S	30	S		
158	21	S	9	R	40	S	41	S	21	S	21	S	18	S	27	S	8	R	33	S	20	S	26	S	24	S	28	S	33	S		
159	21	S	10	R	38	S	40	S	17	S	20	S	15	S	27	S	9	R	30	S	19	S	27	S	22	S	30	S	34	S		
160	22	S	9	R	38	S	40	S	23	S	20	S	16	S	29	S	12	R	30	S	20	S	28	S	28	S	30	S	34	S		
161	22	S	10	R	37	S	41	S	20	S	20	S	15	S	28	S	0	R	32	S	19	S	27	S	20	S	30	S	32	S		
162	20	S	9	R	38	S	40	S	20	S	20	S	15	S	28	S	8	R	33	S	18	S	28	S	25	S	29	S	33	S		
a	23	S	22	S	32	S	32	S	19	S	20	S	17	S	23	S	11	R	30	S	16	S	24	S	29	S	25	S	31	S		
b	37	S	36	S	0	R	30	S	25	S	23	S	18	S	28	S	27	S	34	S	0	R	26	S	30	S	11	R	29	S		
163	24	S	10	R	36	S	42	S	20	S	20	S	16	S	29	S	10	R	31	S	20	S	27	S	22	S	31	S	35	S		
164	24	S	10	R	34	S	40	S	18	S																						

Nr.	Amc 30	Amp 10	Azt 30	Ctx 30	Su 25	Gen 10	Sm 10	Te 30	Eryt 15	Su/T 25	Col 25	Chl 30	T 5	Na 30	Cip 5															
a	23	S	22	S	32	S	33	S	20	S	20	S	17	S	23	S	10	R	29	S	16	S	25	S	29	S	25	S	32	S
b	36	S	36	S	0	R	33	S	27	S	26	S	31	S	29	S	34	S	0	R	26	S	30	S	12	R	31	S	31	S
178	24	S	0	R	36	S	40	S	24	S	19	S	17	S	30	S	10	R	34	S	19	S	29	S	22	S	31	S	34	S
179	21	S	0	R	38	S	41	S	23	S	21	S	17	S	29	S	10	R	29	S	19	S	27	S	24	S	29	S	33	S
180	22	S	8	R	34	S	39	S	21	S	20	S	16	S	28	S	10	R	30	S	20	S	29	S	26	S	29	S	34	S
181	23	S	8	R	34	S	39	S	20	S	20	S	15	S	27	S	10	R	38	S	19	S	28	S	23	S	28	S	32	S
182	24	S	8	R	34	S	40	S	15	I	20	S	17	S	28	S	9	R	38	S	19	S	28	S	24	S	31	S	35	S
183	23	S	8	R	38	S	40	S	19	S	21	S	17	S	27	S	14	I	29	S	20	S	28	S	24	S	29	S	34	S
184	23	S	8	R	40	S	41	S	26	S	27	S	18	S	32	S	12	R	33	S	20	S	29	S	23	S	30	S	34	S
185	24	S	9	R	36	S	40	S	22	S	20	S	16	S	29	S	12	R	33	S	20	S	27	S	23	S	29	S	35	S
186	24	S	9	R	38	S	40	S	22	S	20	S	16	S	28	S	11	R	30	S	19	S	26	S	25	S	30	S	34	S
187	23	S	9	R	38	S	42	S	24	S	20	S	0	R	28	S	8	R	30	S	20	S	29	S	22	S	30	S	35	S
188	21	S	9	R	41	S	42	S	21	S	21	S	19	S	29	S	16	I	32	S	19	S	26	S	20	S	31	S	37	S
189	21	S	8	R	36	S	42	S	23	S	20	S	18	S	29	S	12	R	32	S	20	S	28	S	22	S	32	S	37	S
190	19	S	8	R	34	S	40	S	20	S	19	S	17	S	28	S	12	R	32	S	20	S	26	S	17	S	29	S	34	S
191	20	S	0	R	36	S	41	S	24	S	20	S	18	S	29	S	9	R	31	S	20	S	28	S	23	S	31	S	35	S
192	20	S	13	R	36	S	39	S	20	S	21	S	0	R	27	S	9	R	28	S	20	S	26	S	22	S	30	S	33	S
a	24	S	20	S	33	S	32	S	18	S	20	S	17	S	22	S	11	R	30	S	16	S	23	S	30	S	27	S	30	S
b	37	S	35	S	0	R	28	S	25	S	25	S	18	S	31	S	28	S	33	S	0	R	25	S	30	S	12	R	28	S
193	23	S	0	R	30	S	39	S	14	I	21	S	0	R	27	S	10	R	27	S	20	S	26	S	24	S	28	S	32	S
194	24	S	0	R	33	S	39	S	20	S	21	S	18	S	27	S	0	R	28	S	20	S	25	S	22	S	28	S	31	S
195	24	S	0	R	34	S	38	S	17	S	22	S	18	S	26	S	11	R	28	S	20	S	25	S	20	S	28	S	32	S
196	22	S	0	R	34	S	38	S	20	S	21	S	17	S	25	S	12	R	28	S	20	S	27	S	22	S	26	S	30	S
197	24	S	8	R	35	S	39	S	22	S	22	S	19	S	28	S	12	R	28	S	19	S	26	S	22	S	27	S	32	S
198	22	S	8	R	34	S	37	S	18	S	20	S	17	S	26	S	13	R	29	S	20	S	26	S	21	S	28	S	32	S
199	24	S	8	R	37	S	40	S	19	S	20	S	17	S	27	S	10	R	29	S	20	S	26	S	20	S	28	S	31	S
200	23	S	0	R	32	S	39	S	20	S	22	S	18	S	27	S	11	R	31	S	20	S	28	S	22	S	29	S	31	S

Tabelle IV: Ergebnisse der mittels Bouillon-Mikrodilutionsmethode untersuchten *Y. enterocolitica*-Stämme (4/O:3) auf 13 antimikrobielle Wirkstoffe
 (Nr.= laufende Nummer der untersuchten Stämme, a= *E. coli* DSM 1103. Amp= Ampicillin, Cip= Ciprofloxacin, Na= Nalidixinsäure, Gen= Gentamicin, Ce= Ceftiofur, Sm= Streptomycin, Te= Tetracyclin, Ff= Florfenicol, Kan= Kanamycin, Su= Sulphamethoxazol, T= Trimethoprim, Chl= Chloramphenicol, Ctx= Cefotaxim. S= sensibel, I= intermediär, R= resistent, n.a.= nicht auswertbar)

	Amp	Cip	Na	Gen	Ce	Sm	Te	Ff	Kan	Su	T	Chl	Amp													
a	4	S	0,06	S	4	S	1	S	0,5	S	8	n.a.	1	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	<0,25	S	4	S	0,12	S
1	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	1	S	<1	S	0,12	S
2	>32	R	0,06	S	2	S	1	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	1	S	2	S	0,12	S
3	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	>256	R	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
5	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
6	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	>256	R	2	S	<4	n.a.	8	S	32	S	2	S	4	S	0,12	S
7	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	32	S	2	S	4	S	0,12	S
8	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
9	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,25	S
10	>32	R	0,06	S	2	S	1	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,25	S
a	4	S	0,06	S	2	S	1	S	0,5	S	8	n.a.	1	S	<4	n.a.	4	S	32	S	<0,25	S	4	S	0,12	S
14	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
16	>32	R	0,06	S	4	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	2	S	0,25	S
18	>32	R	0,03	S	2	S	1	S	<0,12	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	0,5	S	4	S	0,12	S
19	>32	R	0,03	S	2	S	2	S	<0,12	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
24	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
25	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	16	R	2	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	4	S	<0,06	S
26	32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	8	S	128	S	2	S	4	S	0,12	S
30	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	16	R	1	S	<4	n.a.	4	S	128	S	2	S	4	S	0,25	S
33	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	<0,12	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
35	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
37	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
38	16	I	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	8	I	<4	n.a.	8	S	64	S	2	S	4	S	0,12	S
39	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
40	32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	4	S	8	S	<0,06	S
41	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	4	S	<4	n.a.	8	S	64	S	4	S	8	S	0,25	S
42	>32	R	0,06	S	2	S	1	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,25	S
43	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
45	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,5	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	32	S	2	S	4	S	0,12	S
46	32	R	0,06	S	<1	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	8	S	64	S	4	S	8	S	0,12	S
47	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
48	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	4	S	<4	n.a.	8	S	64	S	4	S	8	S	0,12	S
49	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
51	>32	R	0,06	S	2	S	1	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
52	16	I	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
53	>32	R	0,03	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	8	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
54	>32	R	0,03	S	<1	S	2	S	0,25	S	8	S	1	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	2	S	0,12	S
55	>32	R	0,06	S	2	S	2	S	0,25	S	8	S	2	S	<4	n.a.	4	S	<16	S	2	S	4	S	0,12	S
56</																										

	Amp	Cip	Na	Gen	Ce	Sm	Te	Ff	Kan	Su	T	Chl	Amp
65	32	R 0,03	S 4	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
66	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
68	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 1	S 2	S 0,12
69	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
70	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
71	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 2	S 0,12
74	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
77	32	R 0,06	S 2	S 1	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S 128	S 2	S 2	S 0,12
78	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
80	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
81	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
82	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
83	>32	R 0,03	S <1	S 2	S 0,25	S >256	R 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S <0,06
85	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S <0,06
86	>32	R 0,06	S 2	S 2	S <0,12	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S <0,06
87	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
89	>32	R 0,06	S 2	S 1	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S 32	S 2	S 4	S 0,12
91	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
92	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
a	4	S 0,06	S 4	S 1	S 0,25	S 4	n.a. 1	S <4	n.a. <2	S <16	S <25	S 4	S 0,06
93	>32	R 0,06	S 4	S 2	S 0,25	S 8	S 4	S <4	n.a. 8	S <16	S 4	S 8	S 0,12
94	32	R 0,03	S 2	S 2	S 0,5	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 8	S 0,12
95	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
98	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S <0,06
99	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 8	S 0,12
100	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
101	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
102	>32	R 0,03	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 1	S 2	S 0,12
104	>32	R 0,03	S 2	S 2	S 0,5	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
105	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
107	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 4	S 8	S 0,12
108	>32	R 0,03	S <1	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S <0,06
109	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
110	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
111	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S <0,06
112	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
118	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
121	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
122	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S <0,06
124	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
132	>32	R 0,06	S 4	S 2	S 0,5	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
133	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 2	S 0,12
134	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 4	S 8	S 0,12
135	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
136	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
137	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,5	S 16	R 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
138	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
140	>32	R 0,06	S 4	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
143	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 16	R 2	S <4	n.a. 8	S 32	S 2	S 4	S 0,12
146	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,12
148	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 2	S 0,25
149	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 0,5	S 4	S 0,12
152	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
166	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
167	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
169	>32	R 0,03	S <1	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 1	S 2	S <0,06
170	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
172	>32	R 0,03	S <1	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
174	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
176	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S <0,06
179	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
180	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
182	16	I 0,03	S <1	S 1	S 0,5	S 4	S 2	S <4	n.a. <2	S <16	S 1	S 4	S 0,12
183	>32	R 0,03	S <1	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 1	S 2	S 0,12
187	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 2	S 0,12
188	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 4	S 4	S 0,12
190	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,5	S 8	S 2	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 4	S 0,12
191	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
192	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,5	S 256	R 1	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
193	32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S >256	R 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
198	>32	R 0,03	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 1	S <4	n.a. 8	S <16	S 2	S 2	S 0,12
199	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12
200	>32	R 0,06	S 2	S 2	S 0,25	S 8	S 2	S <4	n.a. 4	S <16	S 2	S 4	S 0,12

10. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Vor allem **Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. A. Stolle** für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme am Institut und die jederzeit gewährte Unterstützung und motivierenden Worte bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Frau Dr. M. Fredriksson-Ahomaa** für die Möglichkeit zur Mitarbeit in ihrem Forschungsprojekt und die stets kompetente und überaus hilfsbereite Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin **Frau Dr. C. Werckenthin und Frau A. Gey** (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU-München) für die kompetente und freundliche Hilfe bei der Einweisung in die Bouillon-Mikrodilutionsmethode.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei **Frau I. Fitzek, Frau H. Dietz, Frau U. Demuth, Frau S. Holzmann, Frau U. Scheffler** für die Geduld, die nette Atmosphäre und die jederzeit gewährte Hilfe im Bereich der Mikrobiologie.

Ebenso möchte ich allen anderen **Mitarbeitern des Instituts** danken.

Ganz besonders möchte ich **Frau A. Scheideler** für die allzeit bereite Hilfe, die Geduld, die wertvollen Ratschläge und ihre stets aufmunternden Worte, sowie für die rasche Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Frau G. Cafaro, Frau J. Raczynski, Frau B. Grötzbach und Frau K. Romeiser danke ich ganz herzlich für die jederzeit gewährte Hilfe und Aufmunterung.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen **Eltern** für ihre Unterstützung und bei meiner **Schwester** Claudia für ihre Geduld und die Erstellung zweier Abbildungen bedanken.

11. LEBENS LAUF

Name	Cornelia Sabine Meyer
Geburtsdatum	28.Mai 1976
Geburtsort	Montevideo
Eltern	Claus Hinrich Meyer Karen Inga Meyer (geb. Thies)

Ausbildung

1983-1993	Grundschule und Gymnasium Deutsche Schule Montevideo
1994-1996	Gymnasium Deutsche Schule Lissabon
1996-1997	Unterschiedliche Praktika
1997-2000	Staatl. Berufsfachschule für MTA-V in Oberschleißheim
10/2000-2/2006	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
3/2006	Approbation

Berufliche Tätigkeit

4/2006	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München
seit 10/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technologie und Hygiene der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München