

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

**Untersuchungen zur Eignung einer Multiplex-Polymerase-  
Kettenreaktion zum Nachweis einer systemischen Infektion bei  
Pferden**

von Cathrin Rathgeber

aus Koblenz

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Angefertigt in der Curetis AG

Mentor: Dr. Sandra Barth

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard Straubinger

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

**Tag der Promotion:** 06. Februar 2016

# Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung .....	9
II	Literaturübersicht .....	12
1	Bakterielle Pathogene der Pferde .....	12
1.1	Gramnegative Bakterien .....	12
1.1.1	Enterobacteriaceae .....	12
1.1.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	12
1.1.1.2	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> .....	13
1.1.1.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	14
1.1.1.4	<i>Proteus</i> spp. ....	15
1.1.1.5	<i>Enterobacter-cloacae</i> -Komplex .....	15
1.1.2	Andere gramnegative Bakterienarten .....	15
1.1.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
1.1.2.2	<i>Actinobacillus equuli</i> .....	16
1.2	Grampositive Bakterienarten .....	17
1.2.1	Streptococcaceae .....	17
1.2.1.1	<i>Streptococcus</i> spp. ....	17
1.2.1.2	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> .....	18
1.2.1.3	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> .....	19
1.2.1.4	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> .....	20
1.2.1.5	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	20
1.2.2	Staphylococcaceae .....	20
1.2.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.2.2.2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	22
1.2.3	Andere grampositive Bakterienarten .....	22
1.2.3.1	<i>Rhodococcus equi</i> .....	22

---

1.2.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	24
1.3	Grampositive anaerobe Bakterienarten .....	24
1.3.1	<i>Clostridium</i> spp. ....	24
1.3.1.1	<i>Clostridium perfringens</i> .....	24
1.3.1.2	<i>Clostridium difficile</i> .....	26
2	Infektion und Entzündungsreaktionen .....	27
2.1	Vereinfachte Darstellung der Pathogenese einer Infektionsabwehr .....	27
2.2	SIRS.....	28
2.3	Sepsis.....	30
2.4	Unterschied zwischen Sepsis und Bakteriämie.....	31
3	Mikrobiologischer Nachweis .....	32
3.1	Blutkultur.....	32
3.1.1	Auswertung mit mehreren Blutkultursets.....	32
3.1.2	Kontaminationen .....	33
3.1.3	Entnahmeevolumen und Transport .....	35
4	Molekulardiagnostischer Nachweis .....	35
4.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	35
III	Material und Methoden.....	38
1	Probanden.....	38
2	Teilnahmekriterien.....	38
3	Mappen für Kliniken/Praxen .....	39
4	Blutentnahme .....	39
5	Blutproben für die PCR.....	40
5.1	Stabilisieren der Blutproben für die PCR .....	40
5.2	Aufbewahrung und Transport der Blutproben für die PCR .....	40
6	Sekundärproben.....	40

---

6.1	Aufbewahrung und Transport der Sekundärproben .....	41
7	Blutkulturflaschen .....	41
7.1	Verarbeitung der Blutkulturflaschen .....	41
7.2	Blutkulturproben.....	42
8	Aufreinigung der Probe .....	42
9	Primer.....	44
9.1	Primerdesign .....	44
9.1.1	Datenbanksuche mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) .....	44
9.1.2	Multiples Sequenzalignment .....	45
9.2	Herstellung der Primermischungen für die Multiplex-PCR.....	46
10	PCR .....	47
10.1	Pipettierschema für die Multiplex-PCR.....	47
10.2	PCR-Programm .....	48
11	Auswertung der PCR .....	48
11.1	Bioanalyzer .....	48
12	Datenspeicherung .....	49
IV	Vortests .....	51
1	Kultur.....	51
1.1	Verarbeitung der Bakterienisolate.....	51
2	Lagerungstest.....	51
3	Positivkontrollen mit Singelplex-PCR.....	53
4	Positivkontrollen mit Multiplex-PCR.....	53
5	Positivkontrolle des Universal-Primers .....	54
6	Sensitivität.....	54
7	Kreuzreaktionstest .....	55
V	Ergebnisse .....	56

---

1	Ergebnisse der Vortests .....	56
1.1	Lagerungstest .....	56
1.2	Positivkontrollen für die Singleplex-PCR.....	57
1.3	Positivkontrollen für die Multiplex-PCR.....	58
1.4	Positivkontrolle des Universal-Primer .....	59
1.5	Nachweisgrenze .....	59
2	Probanden.....	60
3	Geschlechter .....	61
4	Kriterien für die Teilnahme an der Studie.....	61
5	Vorbehandlung.....	62
6	Proben der Kontrollgruppen .....	63
7	Untersuchungsergebnisse aller Studienproben.....	65
8	Vergleich der Untersuchungsergebnisse von PCR-Blutanalysen und Blutkulturen.....	77
9	Überprüfung der Primer-Spezifität .....	78
10	Bakterielle Erreger der positiven PCR-Blutproben .....	79
10.1	Anzahl der detektierten Erreger pro positiver PCR-Blutprobe .....	80
11	Positive Blutkulturen.....	81
12	Bakterielle Erreger der positiven Sekundärproben .....	83
12.1	Anzahl der detektierten Erreger pro positiver Sekundärprobe .....	84
13	Gegenüberstellung der PCR-Blutanalysen und der Blutkulturen .....	84
14	Gegenüberstellung der PCR-Blutanalysen und der Blutkulturen bei vorbehandelten Pferden .....	86
15	Gegenüberstellung von Blut- und Sekundärproben .....	89
16	Vorkommen von <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	90
17	Nachtests der postkulturell entnommenen Blutkulturproben.....	90
18	Signalhöhen bei der Auswertung der PCR-Proben .....	92
VI	Diskussion .....	94

---

1	Gegenüberstellung der PCR- und Blutkulturergebnisse .....	94
2	Auswahl der Erreger.....	96
3	Vor- und Nachteile der Oxoid-Signal-Blutkultur .....	97
4	Auswirkung der Vorbehandlung auf die Blutkultur oder PCR-Analyse .....	99
5	Gründe für falsch-positive oder negative Ergebnisse der Blutkultur .....	100
6	Unterscheidung zwischen Kontaminationen und echten Signalen im Falle der PCR .....	102
7	Blutuntersuchungen der Kontrollgruppen.....	103
8	Sekundärproben als Hilfe für die Auswertung der Blutproben .....	104
9	Der Unterschied zwischen dem Immunsystem adulter Pferde und Fohlen.....	105
10	Sagt die PCR-Signalthöhe etwas über den Krankheitszustand des Pferdes aus? .....	107
11	Schlussfolgerung .....	109
VII	Zusammenfassung .....	111
VIII	Summary .....	113
IX	Tabellen.....	115
X	Anhänge .....	131
XI	Abkürzungsverzeichnis.....	135
XII	Tabellenverzeichnis.....	138
XIII	Abbildungsverzeichnis .....	140
XIV	Literaturverzeichnis .....	141
XV	Danksagung.....	155



# I Einleitung

Sepsis ist eine komplexe, systemisch inflammatorische Reaktion des Organismus auf Bakterien und deren Toxine, Viren oder Pilze (Bone et al. 1992; Bone et al. 1997b; Robertson et al. 2006). Im Bereich der Pferdemedizin sind besonders Fohlen betroffen. Dies wird in der Fohlensaison durch gehäufte Todesfälle deutlich. Aufgrund der Tatsache, dass Sepsis bei unter sieben Tagen alten Fohlen die häufigste Todesursache darstellt (Cohen 1994; Hollis et al. 2008), ist die rechtzeitige Diagnose dieser Sepsisfälle und ihre adäquate Therapie für eine höhere Überlebenschance von Bedeutung (Goehring et al. 2011).

Die Diagnose Sepsis ist oftmals schwierig zu stellen, da der kulturelle Erregernachweis langwierig ist und es durch eine geringe Anzahl zirkulierender Erreger zu einem falsch-negativen Ergebnis kommen kann (Gramm et al. 1995; Pusterla et al. 2009). Die lange Zeit bis zum Erregernachweis, dem Ergebnis des Resistenztests und dem daraus resultierenden späten Therapiebeginn mit einem adäquaten Antibiotikum ist sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin ein Grund für die hohe Sterberate.

Im Bereich der Humanmedizin liegen im Gegensatz zur Veterinärmedizin hierfür genaue Daten vor, die das Problem der hohen Sterberate bei Sepsis anschaulich machen (deutsche Sepsis Hilfe e.V.; Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.). In Deutschland erkranken pro Jahr 79.000 Menschen an Sepsis und 75.000 Menschen an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock (Engel et al. 2007). Damit stellt die Sepsis mit 154.000 Erkrankten die siebthäufigste Diagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen dar (Hagel et al. 2011). In den USA wurde zwischen 1979 und 2000 ein Anstieg von 8,7 % der Sepsis-Inzidenzfälle festgestellt. Sepsis ist der zweithäufigste Grund für Todesfälle auf Intensivstationen und die allgemein zehnthäufigste Todesursache in den USA (Martin et al. 2003). Gründe für die steigende Anzahl an diagnostizierten Sepsisfällen sind zum einen die Entwicklung in der Diagnostik, der häufige Einsatz invasiver Untersuchungs- und Behandlungsmethoden und das vermehrte Vorkommen resistenter Keime. Die häufig immunologisch geschwächten Patienten und das zunehmend höhere Alter der Bevölkerung tragen zusätzlich dazu bei (Balk 2000).

Die Diagnose einer Sepsis beruht in der Humanmedizin zum einen auf klinisch-chemischen Parametern, sogenannten Biomarkern, zum anderen auf kulturbasierten Nachweisen mittels

Blutkulturen (Gruhler 2008). Die Blutkultur, als etablierte Methode, gilt für die Sepsisdiagnostik als Goldstandard. Auch in der Veterinärmedizin ist der Nachweis eines Erregers in einer Blutkultur ein nützliches diagnostisches Verfahren (Taylor et al. 2001). Jedoch ist das Anlegen einer Blutkultur aufgrund der langen Wartezeit bis zum Ergebnis in der Praxis nicht üblich. Durch den Verzicht auf den kulturbasierten Nachweis kann vielen Pferden, besonders Fohlen, nicht geholfen werden, denn ungefähr ein Drittel aller neonatalen Todesfälle werden einer bakteriellen Infektion zugeschrieben (Goehring et al. 2011).

Bei Fohlen bis zum 12. Lebenstag ist eine Häufung von Erkrankungs- und Todesfälle erkennbar. Die Verlustquote ist in den ersten 24 Lebensstunden am höchsten. Bei adulten Pferden tritt Sepsis häufig im Zusammenhang mit Koliken oder Infektionen durch gramnegative Bakterien auf (van Deventer et al. 1988; Auer and Stick 2006).

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine DNA-basierte molekulardiagnostische Methode, bei der durch gezielte Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte auch geringe DNA-Mengen analysiert werden können (Rudolph et al. 1993; Dierkes et al. 2009; Yuan et al. 2009). Eine Beschleunigung des Nachweises ist die Multiplex-PCR. Anstatt vieler einzelner Reaktionsansätze werden hierbei mehrere Erregernachweise parallel in einem Reaktionsansatz geführt (Anthony et al. 2000). Dadurch verkürzt sich nochmals die Zeit bis zum Vorliegen der Ergebnisse (Dierkes et al. 2009). Für einen positiven Erregernachweis ist bei einer PCR das Vorhandensein von Mikroorganismen bzw. deren DNA nötig. Ihre Vermehrungsfähigkeit spielt hierbei im Gegensatz zur Blutkultur keine Rolle. Eine PCR-Untersuchung reflektiert nur das Vorhandensein der mikrobiellen DNA. Das bedeutet, dass diese Technik jegliche DNA von lebenden, toten und zum Teil durch Antibiotika geschädigten Mikroorganismen detektiert (Peters et al. 2004; Paolucci et al. 2010). Da keine Unterscheidung zwischen inaktiven und aktiven Mikroorganismen mehr möglich ist, wird die Interpretation erschwert (Sarookhani et al. 2010; Lucignano et al. 2011). Ein großer Vorteil des molekulardiagnostischen Verfahrens ist der deutlich geringere Zeitaufwand. Der Zeitaufwand in dieser Studie betrug vier bis sechs Stunden. Auch in den Studien von Tsalik et al. (2010) und Lucignano et al. (2011) konnte eine deutliche Zeitreduktion bis zum Ergebnis durch die Verwendung einer PCR-Untersuchung gezeigt werden. Die Sensitivität der PCR ist besser als die der Blutkultur. Geringe Mengen an DNA führen schon zu einem positiven Ergebnis. In einer Studie von Reier-Nilsen et al. (2009) wurde ein Detektionslimit von  $10^3$  bis

$10^4$  CFU/ml ermittelt. In einer Studie von Al-Khatib (Al-Khatib and Carr) wird die PCR als Detektionsmethode für geringe Mengen an DNA beschrieben. Eine Einschränkung ist das notwendige Wissen über die Basensequenz der zu amplifizierenden DNA. Diese DNA-Sequenzen, zumindest einzelne Abschnitte des Genoms der gesuchten Mikroorganismen, müssen bekannt sein, um die für den Nachweis notwendigen Primer zu entwickeln.

Ziel der Arbeit war ein Vergleich der molekular diagnostischen Methode Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der in der Laboranalytik gebräuchlichen Blutkultur, dem sogenannten „Goldstandard“. Dazu wurde Blut von Pferden mit Verdacht auf eine systemische Infektion verwendet. Eine speziell entwickelte Multiplex-PCR wurde mit der als Goldstandard geltenden Blutkultur verglichen. Hiermit soll die Vergleichbarkeit der Methoden überprüft werden und eine grundsätzliche Eignung eines molekular diagnostischen Nachweises für den tierärztlichen Einsatz untersucht werden. Außerdem sollen die Auswirkungen auf die Behandlung bzw. Prognose für septische Tiere beschrieben werden.

Mit Hilfe dieser Diagnostikmethode könnte bei sepsisverdächtigen Pferden die gezielte Therapie mit einer antimikrobiell wirksamen Substanz begonnen werden. Dies würde sich positiv auf die Überlebensrate auswirken (Hollis et al. 2008) und gleichzeitig auch der zunehmenden Problematik der Resistenzentwicklung in der Veterinärmedizin entgegenwirken.

## II Literaturübersicht

### 1 Bakterielle Pathogene der Pferde

Es gibt eine Vielzahl von Mikroorganismen, die bei Pferden und Fohlen vorkommen. Meistens verursachen diese Erreger keine Sepsis, sondern sind Auslöser der entsprechenden Erkrankung. Jedoch treten viele Erreger auch im Zusammenhang mit einer Sepsis auf. Von einer Sepsis sind hauptsächlich Fohlen betroffen (Hirsh et al. 1993; Stewart et al. 2002; Corley et al. 2007; Pusterla et al. 2009; Goehring et al. 2011).

Die häufigste Bakterienart, die mit einer Sepsis assoziiert wird, ist laut einer Studie von Pusterla et al. (2009) zufolge *Escherichia coli*. Auch Corley et al. (2007) hat in seiner Studie *Escherichia coli* mit 44 % als den am häufigsten isolierten Organismus bezeichnet. Jedoch wurden auch andere Mikroorganismen wie Aktinobazillen, Klebsiellen, Enterokokken, Proteus, Salmonellen, Pasteurellen, Pseudomonaden, Streptokokken, Staphylokokken, Corynebakterien und Clostridien isoliert (Corley et al. 2007; Pusterla et al. 2009).

Im Folgenden werden mit Sepsis assoziierte bakterielle Erreger auf Grundlage der vorhandenen Literatur beschrieben.

#### 1.1 Gramnegative Bakterien

##### 1.1.1 Enterobacteriaceae

###### 1.1.1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia (E.) coli* sind gramnegative, säurebildende, stäbchenförmige Bakterien, die sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen. Sie gehören zur Familie der Enterobacteriaceae. Die Spezies *E. coli* umfasst sowohl fakultativ pathogene, als auch obligat pathogene Stämme, welche sich durch ihre Virulenzfaktoren von den apathogenen Stämmen unterscheiden (Hirsh et al. 1993; Hahn et al. 2009; Allocati et al. 2013). Die fakultativ pathogenen Stämme von *E. coli* sind ein Bestandteil der natürlichen Darmflora des kaudalen Dünndarms und des Dickdarms bei Mensch und Tier.

*E. coli* ist bei Pferden ein Teil der natürlichen Darmflora. Die Isolate, die bei septischen Fohlen im Gewebe und Blut gefunden wurden, unterscheiden sich durch eine höhere Serumresistenz von denen, die aus dem Kot klinisch gesunder Pferde stammen (Hirsh et al.

1993). *E. coli* ist eine häufige Ursache einer Omphalitis (Ortega et al. 2007), dominiert in Proben von Nabel- und Wundinfektionen und ist außerdem in Rektalproben zu finden (Rodich et al. 2009). Bei Fohlen stellt *E. coli* den am häufigsten isolierten Erreger in Zusammenhang mit einer Sepsis dar (Reef et al. 1989; Marsh et al. 2001; Stewart et al. 2002). Bei Stuten bewirken die Bakterien eine Plazentitis und eine Pyometra oder Endometritis. Wenn es bei der Stute schon perinatal zu Symptomen einer Plazentitis kommt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Fohlen infizieren wird, sehr hoch (Parry et al. 2011).

#### **1.1.1.2 *Salmonella enterica* ssp. *enterica***

*Salmonella* (*S.*) *enterica* ssp. *enterica* sind gramnegative stäbchenförmige, fakultativ anaerobe Bakterien. Sie gehören der Familie der Enterobacteriaceae an (Rolle and Mayr 2007; Hahn et al. 2009). Sie sind in zwei Arten, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, eingeteilt. *Salmonella enterica* wird in sechs Subspezies aufgeteilt, die sich wiederum in eine große Anzahl an Serovaren aufschlüsseln (Weese et al. 2001; Tindall et al. 2005). Die am häufigsten isolierten Serovaren in Pferden sind *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Newport*, *S. Krefeld*, *S. Agona* (Weese et al. 2001), *S. Enteritidis* und *S. Abortus equi* (Wenkoff 1973). Salmonellen gehören zu den Zoonoseerregern. Zu den tierischen Wirten zählen wild lebende Tiere, Nutz- und Haustiere, Amphibien und Reptilien. Salmonellen zählen weltweit zu den wichtigsten Krankheitserregern bei Mensch und Tier (Alley et al. 2002; Krawiec et al. 2015) und können bei Pferden zu ernsthaften Erkrankungen führen (Owen et al. 1979; Weese et al. 2001; Ward et al. 2005). Faktoren die einen Ausbruch einer Salmonellose begünstigen sind alle für das Pferd mit Stress assoziierten Tätigkeiten. Außerdem kann ein starker Wurmbefall oder auch die Entwurmung, eine Änderung der Fütterung sowie antimikrobielle Therapie zu einem Ausbruch führen. Zusätzlich sind Pferde mit gastrointestinalen Erkrankungen wie Diarrhö, Einklemmung des großen Kolons oder Kolik prädisponiert eine Salmonellose zu entwickeln (Wenkoff 1973; Weese et al. 2001; Ward et al. 2005). Eine Infektion mit Salmonellen reicht von klinisch gesunden Überträgern bis hin zu einer fatalen Septikämie. Der fehlende bakterielle Nachweis von Salmonellen ist kein sicherer Beweis für eine Abwesenheit von Salmonellen (Owen et al. 1979). Die häufigsten klinischen Erscheinungen sind Diarrhö, Fieber, sowie eine Leukopenie der eine Leukozytose folgt, begleitet von einer Neutrophilie (Wenkoff 1973). Sepsis, welche als extraintestinale Manifestation bekannt ist, kommt vor allem bei Fohlen und immunschwachen Tieren vor (Hahn et al. 2009). Bryans et

al. (1961) stellte fest, dass Fohlen unter vier Monaten im Gegensatz zu älteren Fohlen heftige klinische Veränderungen, wie Fieber, übelriechender Durchfall, Dehydratation und Tod aufwiesen. Infizierte Stuten blieben meist asymptomatisch oder zeigten milde klinische Veränderungen wie Anorexie, weichen Kot oder geringgradig erhöhte Temperatur.

### 1.1.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, stäbchenförmige Bakterien, die der Familie der Enterobacteriaceae angehören. *Klebsiella pneumoniae* ist ein Bestandteil des menschlichen Magen-Darm-Traktes und gehört bei Tieren ebenfalls zur Normalflora. *Klebsiella pneumoniae* ist in drei Subspezies aufgeteilt. *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae* ssp. *rhinoscleromatis*. Als pathogener Keim beim Tier, besonders bei Pferden, hat jedoch nur *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* eine Bedeutung. *Klebsiella pneumoniae* wird häufig bei Genitalinfektionen, Erkrankungen der Atmungsorgane oder in Wunden nachgewiesen (Viala et al. 2004). Klebsiellen sind eine wichtige Ursache für Endometritis und Infertilität bei der Stute (Gibbs et al. 1985; Samper et al. 2006). Durch eine Infektion kann es auch zu einem bakteriellen Abort kommen, der meist sporadisch, fast nie seuchenhaft von statten geht. *Klebsiella pneumoniae* ist einer von mehreren Aborterregern, welcher meist in der Umgebung oder im distalen Genitaltrakt gesunder Stuten vorkommt und durch eine aufsteigende Infektion zum Abort führt (Timoney et al. 1983; Hong et al. 1993; Aurich 2005). Hengste spielen bei der Übertragung von *Klebsiella pneumoniae* eine große Rolle. Oft ist der Erreger Bestandteil der normalen Präputialflora (Platt et al. 1976), was den Hengst zu einem symptomlosen Träger werden lässt. Bakterielle Bronchopneumonien können vor allem bei Fohlen durch *Klebsiella pneumoniae* ausgelöst werden. Es handelt sich meistens um Mischinfektionen mit gramnegativen und grampositiven Erregern. Aufgrund des beim Fohlen noch nicht komplett ausgebildeten Immunsystems, stellt die Lunge eine gute Eintrittspforte für staubgebundene Bakterien dar. Auch bei der Fohlensepsis ist die Lunge eines der betroffenen Organe. Fohlen und junge Pferde zeigen ein plötzliches Auftreten respiratorischer Symptome wie Dyspnoe, Zyanose, Hypoxämie, Tachypnoe oder respiratorische Azidose (Lakritz et al. 1993; Kolm et al. 2010). Auch bei adulten Pferden kann *Klebsiella pneumoniae*, aufgrund einer gestörten Abwehr oder durch virale Vorschädigung, ins Lungengewebe eindringen und eine Pneumonie verursachen. Weitere prädisponierende Faktoren sind lange Transporte,

intensive Trainingseinheiten, Stress durch andere Faktoren, schlechter Ernährungszustand, schlechtes Stallklima oder eine Allgemeinanästhesie (Wilkins 2003; Dietz et al. 2006; Reuss et al. 2015).

#### **1.1.1.4 *Proteus* spp.**

*Proteus* spp. sind gramnegative, Urease bildende, schwärmende Bakterien, welche ebenfalls zur Familie der Enterobacteriaceae gehören. Sie kommen als Fäulniserreger im Erdboden, Abwasser und auf Tierkadavern vor (Hahn et al. 2009). *Proteus vulgaris* gehört der normalen Darmflora bei Tieren an (Gibbs et al. 1985) und kommt sporadisch als nichtpathogener Keim in der Schleimhaut des Genitaltraktes vor (Aurich 2005; Rolle and Mayr 2007). Bei einer Endometritis sind die am häufigsten isolierte Bakterien *E. coli* gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis* (Gibbs et al. 1985). Bei einer *E. coli*- oder *Proteus*-Infektion besitzt der Eiter eine schmutzige, schokoladenbraune Farbe, ist zähflüssig und geruchsspezifisch (Weiss 2007).

#### **1.1.1.5 *Enterobacter-cloacae*-Komplex**

*Enterobacter cloacae* sind gramnegative, anaerobe Stäbchenbakterien, die zur Familie der Enterobacteriaceae gehören. Sie kommen ubiquitär vor und sind Bestandteil der Darmflora gesunder Menschen. *Enterobacter cloacae* gehört zu den wenigen Spezies, die pathogen sind und vor allem bei immunsupprimierten Menschen Erkrankungen auslösen können. *Enterobacter cloacae* kann Ursache für Atemwegserkrankungen, Sepsis, Meningitis, nekrotisierende Enterocolitis bei Frühgeborenen, Harnwegsinfektionen und Wundinfektionen sein (Hahn et al. 2009; Madigan et al. 2013).

### **1.1.2 Andere gramnegative Bakterienarten**

#### **1.1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* sind gramnegative, aerobe, oxidase- und katalasepositive stäbchenförmige Bakterien, welche der Familie Pseudomonadaceae angehören (Rolle and Mayr 2007). *Pseudomonas aeruginosa* können aus Pflanzen, Früchten und Lebensmitteln

isoliert werden und sind als Boden- und Wasserkeim weit verbreitet (Viala et al. 2004). Aufgrund des Vorkommens und der ausgeprägten Resistenzlage wird *Pseudomonas aeruginosa* auch als gefährlicher nosokomialer Keim betrachtet (Hariharan et al. 1995; Viala et al. 2004; Rolle und Mayr 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* ist an vielen lokalen Infektionen, aber auch an septikämischen Allgemeinerkrankungen beteiligt. *Pseudomonas aeruginosa* kommt im Genitaltrakt von Pferden vor und kann somit ein Grund für Endometritis und Unfruchtbarkeit bei Stuten sein (Samper et al. 2006; Tiago et al. 2012). Die Endometritis bei der Stute ist meist eine polymikrobielle Infektion, bei der aerobe und anaerobe Bakterien beteiligt sind (Gibbs et al. 1985). *Pseudomonas aeruginosa* gehört zu den Aborterregern, welche in der Umgebung oder im distalen Genitaltrakt von Stute vorkommen und durch eine aufsteigende Infektion zum Abort führen (Aurich 2005). Hengste hingegen sind nur Träger des Erregers (Allen et al. 2011).

Eine weitere Rolle spielt *Pseudomonas aeruginosa* bei schlecht heilenden Wunden, vor allem an den unteren Gliedmaßen von Pferden. Allgemein haben Wunden bei Pferden aufgrund der Umgebung ein hohes Infektionsrisiko. Sie beherbergen verschiedenste Mikroorganismuspopulationen. Die Wundheilung wird durch die Anwesenheit von bakteriellen Biofilmen verzögert, was wiederum eine Ansiedelung weiterer Mikroorganismen fördert (Freeman et al. 2009; Westgate et al. 2011).

#### **1.1.2.2 *Actinobacillus equuli***

*Actinobacillus equuli* sind gramnegative, fakultativ anaerobe, pleomorphe stäbchenförmige Bakterien, die der Familie der Pasteurellaceae angehören. Die Spezies *Actinobacillus equuli* ist in zwei Subspezies, in *Actinobacillus equuli* ssp. *equuli* ssp. nov. und *Actinobacillus equuli* ssp. *hemolyticus* ssp. nov., eingeteilt. *Actinobacillus equuli* ssp. *hemolyticus* kommt ausschließlich beim Pferd vor (Christensen et al. 2002). *Actinobacillus equuli* ist ein Kommensale der Mundhöhle und des Verdauungstraktes von Pferden (Patterson-Kane et al. 2001; Schröttner et al. 2013). *Actinobacillus equuli*, früher auch als *Shigella equirulis* bekannt, kommt besonders bei gesunden Pferden auf den Tonsillen und im Pharynx vor. Eine Übertragung des Erregers ist durch latent infizierte oder chronisch kranke Tiere möglich. Er wird intrauterin, omphalogen oder post partum übertragen. Bei einer



intrauterinen Infektion kommt es bei der Stute zu einem Spätabort oder zur Geburt lebensschwacher bzw. septikämischer Fohlen (Rolle und Mayr 2007). Meistens erkranken die Fohlen in einem Alter von ein paar Stunden bis zu drei Tagen nach Geburt, was häufig durch einen plötzlichen Beginn von Fieber und Durchfall gekennzeichnet ist (Stewart et al. 2002). Außerdem kommt es zu septikämischen Krankheitserscheinungen, wie Polyarthritiden und Glomerulonephritiden, was auch als Fohlenfrühlähme beschrieben wird. Der Tod tritt im Normalfall innerhalb von 24 Stunden ein (Martens et al. 1986; Radostits et al. 2000). Bei einem langsameren Krankheitsverlauf treten Symptome einer fieberhaften Allgemeinerkrankung, Dyspnoe in Verbindung mit Pneumonien, Durchfälle, Kolikerscheinungen, Festliegen in Verbindung mit Polyarthritiden und Schläfrigkeit bis hin zu komatösen Zuständen, welche auch als „sleepy foal disease“ bekannt sind, auf. Ältere Fohlen weisen meist einen milderen Verlauf auf. Erkrankungen bei adulten Tieren sind weniger häufig und meist mehr lokalisiert. Hierzu gibt es Berichte über Arthritis, Endokarditis, Meningitis, Orchitis, Periorchitis, Abort, Pleuropneumonie, Enteritis und akute oder chronische Peritonitis. Todesfälle sind jedoch aufgrund der schnellen Immunantwort selten (Ashhurst-Smith et al. 1998; Patterson-Kane et al. 2001).

## **1.2 Grampositive Bakterienarten**

### **1.2.1 Streptococcaceae**

#### **1.2.1.1 *Streptococcus* spp.**

Streptokokken (*Strep.*) sind grampositive, kugelförmige oder ovoide, in Ketten oder paarweise angeordnete fakultative Anaerobier und gehören zur Familie Streptococcaceae. Man unterscheidet zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -hämolysierenden Streptokokken. Bei der  $\alpha$ -Hämolyse wird Hämoglobin in Methämoglobin umgewandelt, welches auf Blutagar eine grünliche Zone erzeugt. Bei der  $\beta$ -Hämolyse werden Erythrozyten durch das Betahämolysin der Streptokokken vollständig abgebaut, wodurch eine transparente Hämolysezone auf der Blutagarplatte entsteht. Streptokokken kommen auf gesunden Haut- und Schleimhautoberflächen von Menschen und Tieren vor. Allerdings können sie auch pathogen sein und somit verschiedene Erkrankungen auslösen (Köhler et al. 2001; Hahn et al. 2009; Selbitz et al. 2010). Beim Pferd kommen *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Streptococcus equi* ssp.

*zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* und zum Teil *Streptococcus pneumoniae* vor.

### 1.2.1.2 *Streptococcus equi* ssp. *equi*

*Streptococcus equi* ssp. *equi* gehört zu den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken und ist an Equiden adaptiert. *Streptococcus equi* ssp. *equi* kommt nicht in der Umwelt vor und wird somit auf aerogenem Weg oder durch Vektoren, über Wunden und Läsionen, durch den Deckakt oder die Milch übertragen. Sehr selten findet eine intrauterine Infektion statt (Rolle und Mayr 2007).

*Streptococcus equi* ssp. *equi* ist der Auslöser der Druse (Anzai et al. 1997; Erol et al. 2012). Die Druse ist eine weltweit verbreitete und hochkontagiöse Erkrankung, die sich durch Entzündung der Schleimhäute der oberen Atemwege und eine Vereiterung der regionären Lymphknoten mit der Tendenz zur Abszedierung äußert (Anzai et al. 1997; Timoney 2004; Boyle 2011). Betroffen sind vor allem junge Pferde bis ca. fünf Jahre, aber auch adulte Pferde, welche in großen Beständen stehen oder häufig ihren Standort wechseln. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit sinkt mit dem Alter (Anzai et al. 1997). Erste klinische Anzeichen sind ein Anstieg der Körpertemperatur bis 41°C in Verbindung mit Inappetenz und Apathie. Neben einer serösen bis eitrigem Rhinitis kommt es zur Pharyngitis und im weiteren Verlauf zu einer Schwellung der mandibulären, später auch retropharyngealen Lymphknoten mit Neigung zur Abszedierung. Durch die Schwellung der Kopflymphknoten kommt es von Stridores über Atembeschwerden bis hin zur akuten Dyspnoe. Im anglo-amerikanischen wird die Druse aus diesem Grund auch als „strangles“, im Deutschen „ersticken“ bezeichnet (Wintzer 1999; Dietz et al. 2006; Rolle und Mayr 2007). Komplikationen treten auf, wenn es aufgrund einer hämatogenen Streuung zur Bakteriämie oder Metastasierung verschiedener Lymphknoten oder Organe kommt. Am häufigsten sind hierbei die Gekröselymphknoten und dadurch der Darm aber auch die Lunge betroffen (Berlin et al. 2013; Sweeney et al. 2005). Eine weitere Erkrankung, die *Streptococcus equi* ssp. *equi* verursacht, ist die subkutane Phlegmone. Es handelt sich um eine flächenartige subkutane Entzündung des Bindegewebes und der Lymphgefäße. Sie ist zunächst serös, kann sich aber zu einer eitrigem Wundinfektion, welche auch auf tiefere Gewebsschichten übergreifen kann, entwickeln. Das Allgemeinbefinden ist meist gestört und steht in Verbindung mit einem Temperaturanstieg,

Inappetenz und Mattigkeit. Eine deutliche Schwellung des entsprechenden Bereichs ist zu beobachten. Außerdem sind regionäre Lymphknoten vergrößert (Dietz et al. 2006).

### 1.2.1.3 *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* gehört zu den  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken. Ihr Wirtsspektrum umfasst alle Haustiere und den Menschen. Besonders häufig ist er aber von Pferden zu isolieren (Rolle und Mayr 2007; Selbitz et al. 2010; Erol et al. 2012). *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* ist ein Kommensale der Schleimhaut von Maulhöhle, Pharynx und des Respirationstraktes (Timoney 2004; Erol et al. 2012). *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* ist ein Grund für Erkrankungen des Reproduktionstraktes, da er häufig von Feten, Plazenten und aus dem Genitaltrakt von Pferden isoliert wird (Giles et al. 1993; Hong et al. 1993; Timoney 2004; Clark et al. 2008; Erol et al. 2012). *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* löst durch eine akute Plazentitis und eine Bakteriämie im Fohlen zwischen dem sechsten und neunten Monat einen Abort aus (Hong et al. 1993; Erol et al. 2012). Auch ist er Verursacher von Endometritiden (Aurich 2005).

Bei Fohlen älter als vier Monaten tritt häufig eine subakute Bronchitis auf, die aus unvollständig ausgeheilten meist viralen Bronchitiden resultiert. Aus einer eitrigen Rhinitis, welche eine Bronchitis nach sich zieht, kann sich eine Bronchopneumonie entwickeln. Das Allgemeinbefinden ist kaum gestört, es besteht leichtes Fieber, geschwollene Mandibularlymphknoten, Husten und zum Teil eitriger Nasenausfluss (Wintzer 1999; Kolm et al. 2010).

*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* ist Verursacher der Fohlenspätlähme, auch als Fohlenseptikämie oder -pyämie bezeichnet. Die Fohlenspätlähme äußert sich in Form einer schmerzhaften Polyarthrititis und einer neonatalen Septikämie. Entweder erfolgt die Infektion pränatal oder postnatal. Pränatal infizierte Fohlen werden lebensschwach geboren und zeigen respiratorische Symptome. Es kommt zu neurologischen Ausfällen, Polyarthrititis und Osteomyelitis. Bei einer postnatalen Infektion sind die Fohlen zunächst unauffällig, verlieren plötzlich an Vitalität und weisen dann die gleichen klinischen Veränderungen auf wie bei einer pränatalen Infektion (Wintzer 1999; Dietz et al. 2006; Rolle und Mayr 2007; Selbitz et al. 2010).

#### 1.2.1.4 *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*

*Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* gehört zu den  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken (Timoney 2004). *Streptococcus dysgalactiae* wird in zwei Subspezies unterteilt: *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae* und *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*. *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* gehört zu den normalen Bewohnern der Haut und Schleimhautoberfläche (Timoney 2004; Preziuso et al. 2010; Erol et al. 2012). Bei Pferden kommt *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* bei uterinen Abszessen, Lymphadenitis und chronischen Erkrankungen der oberen Atemwege vor und ist Grund für eine Plazentitis (Erol et al. 2012). Meist wird *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* von abortierten Plazenten, abszedierenden Lymphknoten, selten von Patienten mit Druse-ähnlichen Erkrankungen isoliert (Timoney 2004). Außerdem ist *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* Auslöser einer akuten oder chronischen Euterentzündung. Ein akutes Geschehen weist eine katarrhalische Mastitis mit diffuser Schwellung und Eiter- oder Fibrinflocken im Eutersekret auf. Eine akute Mastitis kann sich im weiteren Verlauf zu einer chronischen Mastitis entwickeln (Reese et al. 1978; McCue et al. 1989).

#### 1.2.1.5 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* gehört zu den  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken. *Streptococcus pneumoniae* ist sowohl ein Kommensale des oberen Respirationstraktes des Menschen (Benson et al. 1984) als auch ein ernstzunehmendes Pathogen, das als typischer Eitererreger Bronchopneumonien, Meningitiden und Sepsis verursacht (Hahn et al. 2009). Der einzige *Streptococcus-pneumoniae*-Stamm, der die Fähigkeit besitzt Pferde zu besiedeln und der auch bei Pferden isoliert werden kann, ist *Streptococcus pneumoniae* vom Kapseltyp 3 (Benson et al. 1984; Timoney 2004). Bei Pferden spielt *Streptococcus pneumoniae* bei Erkrankungen der unteren Atemwege entweder als sekundärer oder primärer Erreger eine Rolle.

#### 1.2.2 Staphylococcaceae

Staphylokokken (*Staph.*) sind grampositive, kugelförmige, weintraubenähnliche, in Haufen angeordnete, fakultativ anaerobe Kokken. Sie gehören zur Familie der Staphylococcaceae.

Staphylokokken sind in 36 Spezies und 17 Subspezies unterteilt. Sie besiedeln als Kommensale und Pathogene die Haut und Schleimhäute von Mensch und Tier und sind in der Umwelt weit verbreitet (Nagase et al. 2002).

#### **1.2.2.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* ist ein aerober Erreger, der katalse- und koagulasepositiv ist (Köhler et al. 2001). Er ist gleichzeitig ein Kommensale der Flora von Säugetieren und ein opportunistischer Pathogener bei Mensch und Tier. *Staphylococcus aureus* kann vor allem aus der Nase und von der Haut im Bereich des Karpus, im Nacken, am Widerrist und auf der Kruppe gesunder Pferde isoliert werden (Shimizu et al. 1991; Yasuda et al. 2000; Haenni et al. 2010; Van den Eede et al. 2012; Mallardo et al. 2013). Hauterkrankungen sind eine der primären Erkrankungen, die durch *Staphylococcus aureus* verursacht werden. Vor allem kommt er bei Hautläsionen und Wunden vor. Eine weitere durch *Staphylococcus aureus* ausgelöste Infektion ist die Botryomykose. Hierbei handelt es sich um eine chronisch granulomatöse Entzündung der Haut, bei der die Granulome oft mit zahlreichen Mikroabszessen durchsetzt sind. Bei Stuten tritt die Botryomykose auch am Euter auf (Aurich 2005; Dietz et al. 2006; Weiss 2007; Meissner et al. 2007). Außerdem spielt *Staphylococcus aureus* bei Infektionen des Respirationstraktes, des Genitaltraktes und bei Sepsis eine Rolle (Shimizu et al. 1991; Haenni et al. 2010).

Infektionen des Respirationstraktes können aufgrund einer gestörten pulmonalen Abwehr zur Erkrankungen führen. Hierbei kommt es meist zu unspezifischen klinischen Veränderungen. Es treten bronchiale und alveoläre Veränderungen auf, die verschiedene Formen einer Pneumonie nach sich ziehen (Dietz et al. 2006; Kolm et al. 2010). Ein bakterieller Abort durch *Staphylococcus aureus* findet meist sporadisch statt. Durch das Aufsteigen des Keims aus der Umgebung oder dem distalen Genitaltrakt der Stute stirbt der Fetus entweder infolge einer intrauterinen Sepsis oder es wird durch eine mangelhafte Versorgung des Fetus durch die Plazenta ein Abort ausgelöst (Prickett 1970; Aurich 2005).

*Staphylococcus aureus* ist in manchen Fällen auch der Grund für ein septisches Geschehen. Dies tritt vor allem bei Fohlen auf. Die Übertragung findet entweder pränatal durch eine Plazentitis, eine lokale oder systemische Infektion oder durch eine Endotoxämie der Mutter oder postnatal statt. Postnatal gelten Nabel, Respirations- oder Gastrointestinaltrakt als

Eintrittspforte. Die Fohlen werden entweder lebensschwach geboren oder ihr Allgemeinbefinden verschlechtert sich innerhalb kürzester Zeit nach Geburt (Kolm et al. 2010).

### **1.2.2.2 *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* wird neben *Staphylococcus hominis* und *Staphylococcus haemolyticus* hauptsächlich von der Haut des Menschen isoliert (Kloos et al. 1976; Busscher et al. 2006). *Staphylococcus epidermidis* ist ein koagulasenegativer Erreger der Gattung *Staphylococcus*. Vor allem wird er aus der Nase, von der Stirn, unter den Achseln und von Armen und Beinen des Menschen isoliert (Nagase et al. 2002). In der Regel stellt *Staphylococcus epidermidis* keine Gefahr dar. Jedoch kann er aus chronischen Wunden vor allem bei Menschen isoliert werden (Freeman et al. 2009). Es gibt Autoren, die das Vorkommen von *Staphylococcus epidermidis* auch bei Pferden beschreiben. In einer Publikation von Corrente et al. (2009) wird das Vorkommen von einem Methicillin-resistenten Stamm von *Staphylococcus epidermidis* beschrieben. Dieser konnte von einem Knochenfragment eines Pferdes mit Osteolyse isoliert werden. Der gleiche Stamm konnte ebenfalls aus der Nase des gleichen Pferdes und aus der Nase eines Pferdes mit einer vermuteten generalisierten Infektion isoliert werden. Weiterhin wurden muskulosketale und respiratorische Infektionen, verursacht durch *Staphylococcus-epidermidis*-Stämme, beim Pferd beschrieben (Trostle et al. 2001). Außerdem wurden in einer Studie von Yasuda et al. (2000) bei 29,5 % der Pferde Methicillin-resistente Staphylokokken entweder aus der Nase oder von der Haut isoliert. Hierbei konnten insgesamt sechs Spezies identifiziert werden. Neben *Staphylococcus epidermidis* war *Staphylococcus xylosus* bei diesen Isolaten enthalten (Yasuda et al. 2000). Eine andere Studie von Kloos et al. (1976) sieht *Staphylococcus epidermidis* eher als Kontaminanten denn als Besiedler bei Tieren.

## **1.2.3 Andere grampositive Bakterienarten**

### **1.2.3.1 *Rhodococcus equi***

*Rhodococcus equi* sind kokkoide, grampositive, aerobe Bakterien, die zur Familie der Nocariaceae gehören (Rolle und Mayr 2007; Selbitz et al. 2010). Es handelt sich um fakultativ intrazelluläre Pathogene, die sich durch Phagozytose in Makrophagen der Abtötung durch

Leukozyten entziehen (Prescott 1991). 1923 wurde *Rhodococcus equi*, damals noch *Corynebacterium equi*, das erste Mal in Schweden bei Fohlen mit einer granulomatösen Pneumonie isoliert (Prescott 1991; Guerrero et al. 2011). Es ist ein ubiquitärer Keim, der vor allem im Boden vorkommt. Nach Ausscheidung mit dem Kot von Pflanzenfressern und Schweinen, erfolgt eine Infektion per Inhalation von kontaminiertem Staub oder durch Koprophagie bzw. durch Nahrungsaufnahme über den Intestinaltrakt (Takai et al. 1991; Nay 1996). Betroffen von der Erkrankung mit *Rhodococcus equi* sind hauptsächlich Fohlen bis zu einem Alter von sechs Monaten, aber besonders Fohlen in den ersten zwei Lebensmonaten. Erkrankungen bei adulten Pferden sind sehr selten und denjenigen der Fohlen sehr ähnlich (Prescott 1991; Vengust et al. 2002; Bolton et al. 2010). Die Folge einer Infektion bei Fohlen ist eine pyogranulomatöse Pneumonie mit Beteiligung der regionären Lymphknoten in Form einer eitrigen Lymphadenitis. Bei einem perakuten Verlauf kommt es rasch zum Tod. Ein akuter Verlauf äußert sich in typisch respiratorischen klinischen Veränderungen, mit Fieber, Tachypnoe, Tachykardie, Inappetenz, Nasenausfluss, gelegentlich Husten und pathologischen Befunden der Lungenauskultation und –perkussion (Venner et al. 2005). Zusätzlich können extrapulmonale Erkrankungen wie eine pyogranulomatöse oder ulzerative Enterokolitis, Abszedierung von Lymphknoten im ganzen Körper, Polyarthritits oder eine Osteomyelitis vorkommen (Nay 1996; Vengust et al. 2002; Bolton et al. 2010). Die Rhodokokkenenteritis erfolgt durch Infektion des Darmtraktes meist in Verbindung mit einer Rhodokokkenpneumonie. Eine Polyarthritits oder Polysynovitis kann die Folge hämatogener Streuung der Bakterien sein. Subkutane Abszesse und Phlegmonen durch *Rhodococcus equi* verursacht, sind weitere klinische Veränderungen, die in Verbindung mit einer Rhodokokkenpneumonie auftreten können (Kolm et al. 2010).

In der Literatur sind wenige Fälle von Aborten aufgrund von Rhodokokkeninfektionen bekannt. Eine Infektion geschieht entweder durch die Kontamination in der Vagina und eine dadurch aufsteigende Infektion oder durch eine hämatogene Streuung, die von einem Infektionsherd in der Stute ausgeht. Die Stute abortiert in einem späten Stadium der Gestation. *Rhodococcus equi* kann anschließend sowohl aus der Plazenta als auch aus dem Fetus isoliert werden (Fitzgerald et al. 1995; Patterson-Kane et al. 2002; Szeredi et al. 2006).

### **1.2.3.2 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* sind grampositive kurze Stäbchen und gehören zur Familie der Listeriaceae. Die fakultativ anaeroben Bakterien besitzen die Fähigkeit sich auch unter ungünstigen Verhältnissen zu vermehren. Das Wachstum ist in neutralem, schwach saurem oder schwach alkalischem Milieu und bei niedrigeren Temperaturen möglich (Kröz et al. 1998). *Listeria monocytogenes* kommt ubiquitär in der Umwelt vor. Sein natürlicher Lebensraum ist der Boden. Die Ausscheidung erfolgt durch sogenannte Überträger über den Intestinaltrakt oder die Milch (Wilkins et al. 2000). Somit erfolgt die Infektion meist oral durch Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel oder durch unbelebte Vektoren wie Futtermittel und Einstreu (Dedié 1993). Außerdem ist eine Infektion über die Nasenmukosa, die Konjunktividen oder durch eine Wundkontamination möglich (Wilkins et al. 2000; Warner et al. 2012).

Bei Tieren tritt die Listeriose in verschiedenen Formen auf. Zum einen gibt es die zerebrale Form, welche sich in einer Meningitis äußert (Warner et al. 2012), zum anderen die metrogene Form (Kröz et al. 1998), die in der Gravidität auftritt und zu einer Infektion des Fetus führt, was einen Abort oder die transplazentare Listerieninfektion, auch „Granulomatosis infantiseptica“ genannt, zur Folge hat. Diese Form der Listeriose zieht eine Sepsis nach sich, die im Allgemeinen bei Neugeborenen sichtbar wird. Die Organlisteriose ist eine Form der Erkrankung, welche im Rahmen einer systemischen Listeriose auftritt (Kröz et al. 1998; Wilkins et al. 2000). Die Erkrankung ist relativ selten und manifestiert sich hauptsächlich bei geschwächten oder immunsupprimierten Menschen oder Tieren (Clark et al. 1978).

*Listeria monocytogenes* als Ursache für eine Sepsis bei neugeborenen Fohlen erscheint in der Literatur nur sehr selten (Wallace et al. 1995; Wilkins et al. 2000) und auch die klinische Erkrankung von Pferden tritt selten auf (Warner et al. 2012).

## **1.3 Grampositive anaerobe Bakterienarten**

### **1.3.1 *Clostridium* spp.**

#### **1.3.1.1 *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* sind grampositive, obligat anaerobe, plumpe Stäbchen, die der Familie Clostridiaceae angehören. Sie sind 1892 das erste Mal durch Welch et al. als *Bacillus*



*aerogenes capsulatus* beschrieben worden. *Clostridium perfringens* ist ein ubiquitärer Keim, der im Erdboden, Staub, Wasser und im Darm von Mensch und Tier vorkommt (Hatheway 1990). *Clostridium perfringens* bildet mit fünf Toxovaren (Toxintyp A-E) verschiedene Toxine, wovon vier Toxine als Haupttoxine gelten (Diab et al. 2012). Diese vier Toxine, Alpha-, Beta-, Epsilon-, Iota-Toxin, werden aufgrund ihrer Pathogenität auch als Lethaltoxine bezeichnet. Das Alpha-Toxin wird von allen Toxintypen (A-E) gebildet. Es ist verantwortlich für Gewebsschädigung bei Gasgangrän, führt zu Hypotension, Bradykardie, Schock und einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Außerdem spielt es bei Lebensmittelvergiftungen eine große Rolle. Das Beta-Toxin wird von den Toxovaren B und C gebildet und führt bei Abwesenheit von Protease zu nekrotischen Läsionen im Dünndarm. Außerdem führt es zu einem Blutdruckanstieg und zum Abfall der Herzfrequenz aufgrund der Freigabe von Katecholaminen. Das Epsilon-Toxin wird von den Toxintypen B und D gebildet. Es ist zunächst ein Prototoxin, welches durch Enzyme aktiviert wird. Dadurch wird die Permeabilität der Darmwand heraufgesetzt. Durch einen Eintritt in den Blutkreislauf kommt es zu hyperämischen, geschwollenen Nieren und zu einem Lungenödem. Das Iota-Toxin wird von dem Toxintyp E gebildet und ist der Grund für eine Enteritis und eine generelle Intoxikation. Das *Clostridium-perfringens*-Enterotoxin, welches vor allem durch die Toxovare A und C produziert wird, verursacht durch seine Bindung an Oberflächenrezeptoren der Darmepithelzellen eine Steigerung der Membranpermeabilität und einen Verlust von Flüssigkeit und Ionen. Dies geschieht vor allem im Ileum, aber auch im Jejunum (Hatheway 1990).

Bei Pferden spielen vor allem das Toxovar A und C eine Rolle. Der Toxintyp A ist ein Teil der normalen gastrointestinalen Flora beim gesunden Pferd (Gautsch et al. 1993; Schoster et al. 2012), kann jedoch bei der „Equine intestinal Clostridiosis“, auch als „Colitis X“ bezeichnet, ein Grund für einen Krankheitsausbruch sein. Im Anfangsstadium der Erkrankung steigt der Gehalt an *Clostridium perfringens* Typ A im Kot an (Wierup 1977; Schiefer 1981). Des Weiteren ist das Toxovar A für die Entstehung einer Enterotoxämie bei Schafen, Ziegen, Rindern, Hunden, Alpakas und auch Pferden verantwortlich (Hatheway 1990). Die Toxovare A, B und C von *Clostridium perfringens* führen zur Enterocolitis bei Fohlen (Diab et al. 2012). Das *Clostridium perfringens* Typ C ist aber der wichtigste und meist erwähnte Vertreter von Darmerkrankungen bei neugeborenen Fohlen (Uzal et al. 2012). Das Toxin ist gegenüber der Trypsinaktivität anfällig. Eine Infektion bei Fohlen ist durch die geringe Trypsinkonzentration

im Darm und die durch das Kolostrum übertragenen Trypsininhibitoren begründet. Ein akuter Beginn von Kolik mit oder ohne Durchfall oder der plötzliche Tod von Fohlen und jungen Pferden bis zu einem Jahr sind die typischen klinische Veränderungen für eine nekrotisierende Enteritis und Enterocolitis, welche durch *Clostridium perfringens* Typ C hervorgerufen werden (Diab et al. 2012).

### **1.3.1.2 *Clostridium difficile***

*Clostridium difficile* sind grampositive, obligat anaerobe, schlanke Stäbchen mit ovalen subterminalen Sporen, welche zur Familie Clostridiaceae gehören. *Clostridium difficile* produziert zwei Toxine, die als Toxin A und B bezeichnet werden. Das Toxin A ist enterotoxisch. Durch inflammatorische Prozesse, Neutrophileninfiltration im Ileum und die Freigabe von Entzündungsmediatoren führt es zu Gewebsschäden und somit zu einer Flüssigkeitsanreicherung, einer erhöhten Membranpermeabilität und zur hämorrhagischen Nekrose. Die zytotoxische Aktivität von Toxin B bewirkt eine Depolymerisation der Aktinfilamente, indem das Zellzytoskelett zerstört wird und eine Abrundung der Zellen stattfindet (Lyerly et al. 1985; Hatheway 1990).

*Clostridium difficile* ist einer der wichtigsten Gründe für die Entstehung von Durchfall, Enterokolitis und Typhlocolitis beim Pferd (Beier et al. 1994; Schoster et al. 2012; Diab et al. 2013). Zwei begünstigende Faktoren für die Entstehung einer *Clostridium difficile* assoziierten Erkrankung bei Pferden sind ein Klinikaufenthalt oder eine vorausgehende Antibiotikatherapie, jedoch kommen auch sporadische Erkrankungen vor (Diab et al. 2013). Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens, vor allem im Erdboden, aber auch im Kot von Pferden oder anderen Tieren, findet eine fäkal-orale Übertragung statt (Diab et al. 2013). *Clostridium difficile* kann aus verschiedenen Darmabschnitten sowohl gesunder als auch an Durchfall erkrankter Pferde isoliert werden. Die Nachweishäufigkeit bei klinisch gesunden Fohlen ist deutlich geringer als die bei an Durchfall erkrankten Fohlen oder Adulten, wobei hier die unter 14 Tage alten Fohlen eine höhere Prävalenz zeigen (Beier et al. 1994).

## 2 Infektion und Entzündungsreaktionen

### 2.1 Vereinfachte Darstellung der Pathogenese einer Infektionsabwehr

Eine inflammatorische Reaktion ist eine zelluläre und molekulare Reaktion auf einen Stimulus durch Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Das Ziel dieser Reaktion ist, die Ausbreitung des Erregers zu verhindern und ihn zu eliminieren (Gramm et al. 1995).

Die angeborene Immunantwort mit ihrer nicht-spezifischen Antwort ist der erste Schritt der Abwehrkette. Zu den beteiligten Zelltypen gehören Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Diese Zellen besitzen spezielle Rezeptoren, bekannt als „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), welche viele Moleküle als fremd, das heißt nicht körpereigen erkennen. Diese Moleküle werden als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. Wenn ein PAMP von einem Rezeptor (PRRs) erkannt wird, wird eine unspezifische Immunantwort ausgelöst, welche die Elimination des eindringenden Erregers zum Ziel hat. Die unspezifische Immunantwort kann durch Phagozytose und durch die Hochregulierung des angeborenen Immunsystems durchgeführt werden.

Nach Erkennung eines PAMPs beginnt die Produktion von Zytokinen. Zunächst werden proinflammatorische Moleküle produziert, welche die Zellabwehr aktivieren. Kurz darauf werden antiinflammatorische Moleküle freigesetzt, welche die proinflammatorische Antwort wieder schwächen bzw. stoppen (Bone et al. 1997a). Die zu den Glykoproteinen gehörenden Zytokine umfassen Interleukine, den Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Chemokine und Wachstumsfaktoren. Sie regulieren die Entzündung und Immunantwort und wirken als Mediatoren zwischen den Zellen. Aufgrund von Rezeptoren und anderen regulatorischen Mechanismen zeigen sie verschiedene Effekte im Körper (Auer and Stick 2006).

Nachdem die Entzündungsmediatoren die Leber erreicht haben, stimulieren sie dort die Produktion von etwa 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteinen und weiteren antiinflammatorischen Molekülen. Diese haben die Funktion die Entzündung zu lokalisieren, die Ausbreitung zu verhindern und das Immunsystem bei der Sanierung des Entzündungsherdes zu unterstützen (Nyström 1998; Tizard 2004).

Im zweiten Stadium beginnt die initiale systemische Antwort. Diese Antwort vermittelt, dass die lokale Reaktion zur Bekämpfung des ursprünglichen Agens nicht ausreicht. Sie gilt als Warnsignal und stimuliert weiterhin die proinflammatorischen Mediatoren. Diese Kaskade

führt zu einer kompensatorischen systemischen antiinflammatorischen Antwort, welche in der Regel die anfängliche Entzündungsreaktion schnell herunterreguliert.

Ein Kontrollverlust der Entzündungsreaktion hat eine massive systemische Reaktion zur Folge. Die Permeabilität der Blutgefäße steigt, die Plättchenaggregation bewirkt einen verlangsamten Blutfluss und möglicherweise eine Ischämie, es kommt zur Vasodilatation, Transsudation und einer Fehlverteilung des Blutflusses.

Sepsis wird mit einer Immunsuppression verglichen. Durch Abschalten des Immunsystems erfolgt keine Antwort mehr auf ein eindringendes Antigen. Die Zytokinproduktion wird unterdrückt ohne die Funktion zu modifizieren (Robertson et al. 2006). Dieses Phänomen, das bei Sepsispatienten auftritt, wird in der Immunologie als Anergie bezeichnet. Es kommt zu einer metabolischen Störung. Durch die stetige Aktivierung von proinflammatorischen Mediatoren kommt es zum Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse. Die Mediatoren beeinflussen durch übergreifende Prozesse das Endothel, den Blutkreislauf, die Hämodynamik und die Koagulationsmechanismen. Durch Endothelschädigung kommt es zu Organdysfunktionen. Die Homöostase geht bei der Sepsis vollkommen verloren, weshalb das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Aktivitäten nicht stabilisiert werden kann. Dieser Prozess führt zu einer massiven inflammatorischen Reaktion = SIRS (Kidokoro et al. 1996; Vervloet et al. 1998). Als Gegenregulation setzt normalerweise eine antiinflammatorische Immunantwort ein, die als Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome = CARS bezeichnet wird (Bone et al. 1997b).

Nach der Immunsuppression folgt im Endstadium die immunologische Dissonanz, welche eine aus dem Gleichgewicht geratene überschießende Immunantwort darstellt (Bone et al. 1997b).

## **2.2 SIRS**

SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrom bezeichnet eine abnormale generalisierte Entzündungsreaktion des Organismus durch infektiöse oder nichtinfektiöse Ursachen (Bone et al. 1992; Gramm et al. 1995; Bone et al. 1997b; Kahnt et al. 2008).

1992 wurden vom American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) für die Humanmedizin klinische Kriterien festgelegt, welche

inzwischen für die Tiermedizin angepasst wurden und in Studien mit Hunden, Katzen und Pferden (Kahnt et al. 2008) verwendet werden. Für den Menschen müssen zwei dieser Kriterien erfüllt werden, um von SIRS sprechen zu können (Bone et al. 1992; Robertson et al. 2006):

1. Fieber > 38 °C oder Hypothermie < 36 °C
2. Tachykardie > 90 Schläge pro Minute
3. Tachypnoe > 20 Atemzüge pro Minute oder Hyperventilation / Hypoknapie bei einem PaCO<sub>2</sub> < 32 mm Hg
4. Leukozytose > 12000 / µl oder Leukopenie < 4000 / µl oder ein erhöhter Anteil von stabkernigen neutrophilen Granulozyten (> 10 % unreife Neutrophile, Linksverschiebung) (Bone et al. 1992; Robertson et al. 2006)

Wie schon oben erwähnt wurden in der Veterinärmedizin die Kriterien für SIRS zum Teil übernommen und entsprechend angepasst. Hierzu gibt es verschiedene Studien, die sich mit der Sensitivität und Spezifität für die SIRS- und Sepsiskriterien beschäftigen und diese vergleichen. Dabei kommt es zu verschiedenen Grenzwerten.

<b>Kriterium</b>	<b>Einheit</b>	Purvis and Kirby (1994)	Hardie (1995)	Hauptmann, Walshaw, and Oliver (1997)	Brady and Otto (2001)	de Laforcade et al. (2003)
<b>Temperatur</b>	°C	< 37,8 > 39,7	< 38,0 > 40,0	< 38,1 > 39,2	< 38,0 > 40,0	< 37,8 > 39,4
<b>Herzfrequenz</b>	/min	> 160	> 120	> 120	> 120	> 140
<b>Atemfrequenz</b>	/min	> 20	> 20	> 20	> 40	> 20
<b>Leukozyten</b>	/µl	< 4000 > 12000	< 5000 > 18000	< 6000 > 16000	< 5000 > 18000	< 6000 > 16000
<b>Neutrophile</b>	%	> 10	> 5	> 3		> 3

SIRS kann in zwei große Kategorien unterteilt werden: in eine nicht infektiösbedingte Entzündungsform und in die Sepsis (Robertson et al. 2006).

## 2.3 Sepsis

Die klassische Definition der Sepsis von Hugo Schottmüller aus dem Jahr 1914 (*Geschichte der Sepsis*), die besagt, dass bei einer Sepsis von einem Sepsisherd auf hämatogenen Wegen konstant oder periodisch pathogene Bakterien im Körper verbreitet werden, so dass Krankheitserscheinungen ausgelöst werden, wurde inzwischen durch die Definition des ACCP und der SCCM abgelöst.

Eine Sepsis wird heute laut Consensus-Definition als eine komplexe inflammatorische Wirtsreaktion infektiöser Ätiologie (Gramm et al. 1995), das heißt eine durch Infektion ausgelöste SIRS (Bone et al. 1992), definiert. Der Wirt ist nicht in der Lage die Entzündung lokal einzudämmen (Gramm et al. 1995). Früher war der Ausdruck Sepsis grundsätzlich mit einer Bakteriämie oder bakteriellen Toxinen verbunden. Inzwischen gilt der Ausdruck Sepsis auch bei einer SIRS auf eine Infektion mit Viren, Parasiten, Protozoen oder Pilzen (Bone et al. 1992; Bone et al. 1997b; Robertson et al. 2006).

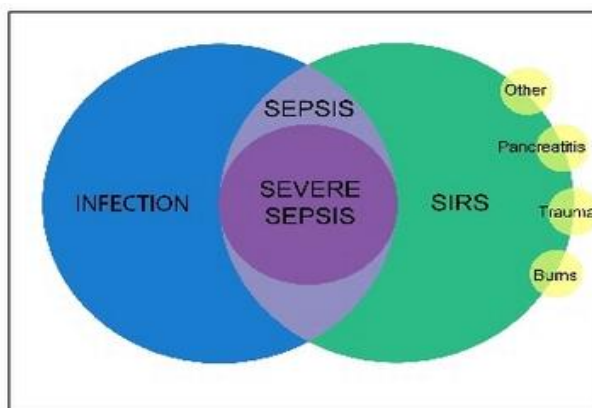
1992 wurden durch die ACCP und der SCCM Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock festgelegt (Hagel et al. 2011). Nach diesen Kriterien wird eine Sepsis über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Symptome und durch die Erfüllung mindestens zweier der vier SIRS-Kriterien diagnostiziert. Der Nachweis einer Infektion ist nicht notwendig (Gramm et al. 1995; Hagel et al. 2011).

Eine schwere Sepsis ist eine Sepsis, welche mit Organdysfunktion, einer abnormalen Hypoperfusion und einer sepsisbedingten Hypotension einhergeht (Bone et al. 1992; Nyström 1998).

Der septische Schock ist eine Sonderform der schweren Sepsis und wird als sepsisbedingte Hypotension definiert (Bone et al. 1992). Trotz Flüssigkeitszufuhr bleibt die Hypotension bestehen. Wenn es im weiteren Verlauf zu einem Versagen mehrerer voneinander abhängiger Organsystemen kommt (Bone et al. 1992; Robertson et al. 2006), spricht man von Multiorganversagen (multiple organ dysfunction syndrome = MODS). Man spricht von primärem und sekundärem MODS. Beim primären MODS wird das Organ direkt durch einen bestimmten Stimulus geschädigt. Dieser führt zur Dysfunktion des Organes. Das sekundäre MODS ist nicht die Antwort auf einen Stimulus, sondern die Konsequenz auf die Wirtsantwort. Ihr geht eine Infektion oder ein Trauma in einem Teil des Systems voraus,

woraufhin der Körper mit einer systemischen Entzündungsreaktion reagiert und es anderswo zur Dysfunktion der Organe kommt (Bone et al. 1992; Bone et al. 1997b; Nyström 1998).

Welches Organ als erstes in seiner Funktion eingeschränkt wird ist von der jeweiligen Spezies abhängig. Beim Pferd und Hund ist oft der Darm das Schockorgan, wohingegen bei der Katze die Lunge meist als erstes ihre Funktion einstellt. Beim Pferd ist Hufrehe oft die Folge von SIRS. Das Herz wird im Gegensatz zur Humanmedizin bei Tieren erst spät einbezogen (Kahnt et al. 2008).



**Abbildung 1:** Der Zusammenhang zwischen systemischer inflammatorischer Reaktion (SIRS), Sepsis und Infektion (Bone et al. 1992)

Sepsis ist die Wirtsantwort auf eine Infektion; sie wird als bestehende SIRS definiert und einer vermuteten oder bestätigten Infektion zugeordnet.

## 2.4 Unterschied zwischen Sepsis und Bakteriämie

Bei einer Sepsis, schweren Sepsis und einem septischem Schock handelt es sich um klinische Diagnosen mit einem nicht notwendigerweise positiven Erregernachweis. Die Diagnose Sepsis bedeutet nicht automatisch das Vorhandensein einer Bakteriämie (Kappstein 2009; Jauch et al. 2012). Vierzig bis fünfzig Prozent der Patienten mit der Diagnose Sepsis weisen trotz eindeutiger klinischer Zeichen einer Infektion negative mikrobiologische Befunde auf (Jauch et al. 2012).

Eine Bakteriämie wird als zeitweises Vorhandensein von lebensfähigen Erregern im Blut (Bone et al. 1992) bzw. als ein kultureller Nachweis von Bakterien im Blut definiert (Hagel et al. 2013). Dieser mikrobiologische Befund kann entweder asymptomatisch oder mit klinischen Symptomen einer Sepsis assoziiert sein. Aus diesem Grund unterscheidet man

eine primäre und eine sekundäre Form der Bakteriämie. Bei der primären Form liegt ein Erregernachweis ohne Assoziation einer Infektion vor. Die sekundäre Form weist einen Erreger auf bei gleichzeitig vorhandener Infektion mit demselben Erreger an einer variablen Körperstelle (Kappstein 2009). Die Bakteriämie ist ausschließlich ein mikrobiologischer Befund, dem eine klinische Diagnose zugeordnet werden muss.

### **3 Mikrobiologischer Nachweis**

#### **3.1 Blutkultur**

Die Blutkultur stellt eine mikrobiologische Untersuchung zum kulturellen Nachweis von Bakterien bzw. Pilzen im Blut dar (Seifert et al. 2007; Gander et al. 2009; Lucignano et al. 2011).

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin wird die Blutkultur als „Goldstandard“ zum Nachweis bakterieller Infektionen und Pilzinfektionen im Blut verwendet (Hall et al. 2006; Tsalik et al. 2010; Lucignano et al. 2011).

Eine Blutkultur wird bei Symptomen einer SIRS, welche eine Sepsis zur Folge haben können, angelegt. Außerdem dient eine Blutkultur bei Verdacht auf Endokarditis, Fieber unklarer Genese, Pneumonie, Meningitis und bei Fieber immunsupprimierter Patienten der Diagnose. Das Ergebnis einer Blutkultur soll helfen, mit einer adäquaten Antibiotikatherapie zu beginnen und somit die Prognose zu verbessern und die Letalität zu senken (Seifert et al. 2007).

##### **3.1.1 Auswertung mit mehreren Blutkultursets**

In der Humanmedizin erfolgt die Blutentnahme durch die Punktion peripherer Venen verschiedener Seiten (Washington 1975; Wilson 1996). Es wird empfohlen mindestens eine Blutkulturflasche für aerobe und eine für anaerobe Bebrütung zu beimpfen. Diese werden dann als Blutkulturpaar oder Blutkulturset bezeichnet. Das Beimpfen mehrerer Sets wird ebenfalls empfohlen (Wilson 1996; Seifert et al. 2007; Gander et al. 2009). Dies erleichtert bei der Auswertung der Blutkultur eine echte Bakteriämie von Kontaminationen zu unterscheiden. Verschiedene Studien zeigten, dass das Beimpfen mehrerer



Blutkulturflaschensets zu einer besseren Rate der entdeckten Bakteriämien führte. Washington (1975) berichtete, dass bei Abnahme von ein bis drei Blutkulturen Bakteriämien zu 80 % mit einer Kultur, zu 89 % mit zwei und zu 99 % mit allen drei Blutkulturen detektiert wurden. Weinstein et al. (1983) präsentierte in einer Studie im Zeitraum zwischen 1975-1977 ähnliche Ergebnisse (91 % mit einer, mehr als 99 % mit beiden Kulturen). In einer Studie von Cockerill et al. (2004) konnten bei Verwendung eines automatischen Blutkultursystems 65 % der Infektionen im Blut mit einem Blutkulturset, 80,4 % mit zwei und 95,7 % mit drei nachgewiesen werden.

Der beste Entnahmezeitpunkt ist ein bis zwei Stunden vor Fieberbeginn oder Fieberanstieg. Da dies jedoch schwer zu realisieren ist, wird, sobald Symptome auftreten die für eine Sepsis sprechen, Blut für eine Blutkultur entnommen. Außerdem soll die Entnahme vor Beginn der antibiotischen Therapie stattfinden, da der kulturelle Nachweis unter antibiotischer Therapie meist nicht oder nur noch verzögert möglich ist (Glerant et al. 1999; Grace et al. 2001).

In der Tiermedizin wird oftmals aufgrund der hohen Kosten, welche vom Besitzer selbst getragen werden müssen, nur ein Set, das heißt eine aerobe und eine anaerobe Blutkulturflasche angelegt.

### **3.1.2 Kontaminationen**

Ein großes Problem stellen die falsch-positiven Ergebnisse dar. Durch Kontaminationen, die beim Anlegen einer Blutkultur entstehen können, kommt es zu falsch-positiven Ergebnissen. Dies erschwert eine Unterscheidung zwischen einer echten Bakteriämie und einer Kontamination. Das Ziel ist die Kontaminationsrate auf zwei bis drei Prozent zu senken (Spitalnic et al. 1995; Hall et al. 2006; Gander et al. 2009). Gründe für Kontaminationen sind zum einen mangelhafte Hautdesinfektion und Verunreinigung der Blutkulturflasche beim Beimpfen durch die „single needle“ Technik, ein vermehrter Gebrauch von Kathetern und dadurch eine geringere Blutentnahme durch Venenpunktion, zum anderen Methoden, die zur Detektion kleinerer Mengen lebender Mikroorganismen im Blut führen und die eine vermehrte Detektion von z.B. Staphylokokken (koagulase-negative Staphylokokken als Kontamination) ermöglichen (Weinstein 2003; Hall et al. 2006; Seifert et al. 2007).

Die Blutentnahme durch Venenpunktion muss unter aseptischen Bedingungen erfolgen (Washington 1975; Wilson 1996; Weinstein 2003). Hierfür sind das Tragen von

Einmalhandschuhen und die Verwendung einer sterilen Kanüle notwendig. Die Punktionsstelle darf nach Hautdesinfektion nicht mehr palpiert werden. Die Desinfektion der Haut an der Entnahmestelle ist ein wichtiger Faktor, um Kontaminationen zu verringern. Jedoch ist eine Kontamination auch bei einer adäquaten Desinfektion der Haut nicht auszuschließen. Hierfür sind Mikroorganismen in tieferen Hautschichten, die durch eine Desinfektion nicht zu erreichen sind, verantwortlich. Verschiedenen Studien zufolge gibt es unter Verwendung von Povidon-Iod, Jodtinktur, Isopropyl-Alkohol oder Povidon-Iod plus Ethylalkohol keine signifikanten Unterschiede in der Kontaminationsrate (Washington 1975; Hall et al. 2006). Die Punktionsstellen werden zunächst mit einem VAH- (Verbund für angewandte Hygiene) gelisteten Hautdesinfektionsmittel gereinigt. Hierbei werden vom Zentrum aus beginnend konzentrische Kreise gezogen. Danach erfolgt die eigentliche Desinfektion mit einem alkoholischen Hautdesinfektionsmittel, welches dann je nach vorgeschriebener Einwirkzeit abtrocknet. Zusätzlich wird der Gummistopfen der Blutkulturflasche vor dem Beimpfen gesäubert (Wilson 1996; Seifert et al. 2007; Gander et al. 2009).

Um Kontaminationen weiterhin zu senken, gibt es eine „Double-needle“ Technik, bei der eine sterile Kanüle benutzt wird, um den Patienten Blut zu entnehmen und eine weitere sterile Kanüle, um die Blutkulturflasche zu beimpfen. Hierdurch konnte ein Abfall der Kontaminationsrate von 3,7 % auf 2,0 % festgestellt werden (Spitalnic et al. 1995; Weinstein 2003). Mit dem Wissen über blutübertragbare Krankheiten und das durch die „double-needle“ Technik erhöhte Risiko an Nadelstichverletzungen, wurde in der Humanmedizin wieder auf die „Single-needle“ Technik umgestellt (Tan et al. 2001; Weinstein 2003).

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), aerobe und anerobe grampositive Stäbchen, *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes* und Streptokokken der Viridans-Gruppe gehören zur natürlichen Hautflora des Menschen. Sie werden jedoch, vor allem wenn sie nur in einer von mehreren Blutkulturflaschen wachsen, als potentielle Kontaminanten einer Blutkultur angesehen (Souvenir et al. 1998; Richter et al. 2002; Hall et al. 2006). In der Studie von Richter et al. (2002) betrug die Kontaminationrate durch KNS 61,7 %, durch Streptokokken der Viridans-Gruppe 42,5 %, durch aerobe grampositive Stäbchen 75,8 %, durch *Bacillus* spp. 28,6 %, durch *Micrococcus* spp. 80 % und durch anaerobe grampositive Stäbchen 77,8 %.

Koagulase-negative Staphylokokken sind somit die am häufigsten isolierten Erreger. Sie zählen in bis zu 70 % zu den Kontaminationen. Jedoch gelten sie auch als Verursacher einer echten Bakteriämie. Die Unterscheidung, ob KNS als Kontamination oder als klinisch signifikante Bakteriämie auftreten, erfordert eine genaue Identifikation mit Hilfe der Klinik des Patienten, der mikrobiologischen Daten und der Anzahl der positiven Blutkulturen (Weinstein et al. 1997; Souvenir et al. 1998; Mirrett et al. 2001).

Bei der Detektion von *Staph. aureus*, *Strep. pneumoniae*, *E. coli* und anderen Enterobacteriaceae und *Pseudomonas aeruginosa* wird immer von einer echten Bakteriämie ausgegangen (Weinstein 2003; Hall et al. 2006).

### **3.1.3 Entnahmeevolumen und Transport**

Das Blutvolumen spielt für die Sensitivität der Diagnostik eine große Rolle. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass je größer das Blutvolumen ist, desto besser die Ergebnisse und Erkennung einer Bakteriämie sind (Ilstrup et al. 1983; Plorde et al. 1985; Mermel et al. 1993; Li et al. 1994; Weinstein et al. 1994). Bei Erwachsenen werden 20 ml Blut entnommen, das gleichmäßig auf eine aerobe und eine anerobe Blutkultur aufgeteilt wird (Li et al. 1994; Wilson 1996; Seifert et al. 2007).

Um eine Verzögerung der Patientenversorgung zu verhindern und eine baldige Befundübermittlung zu fördern, müssen die beimpften Blutkulturflaschen auf schnellstem Weg ins Labor gebracht werden. Wenn dies nicht möglich ist, ist eine Lagerung bei Raumtemperatur (25 °C) oder im Inkubator (35 °C) möglich. Eine Auskühlung muss vermieden werden (Wilson 1996; Seifert et al. 2007).

## **4 Molekulardiagnostischer Nachweis**

### **4.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) ist ein molekulardiagnostisches in-vitro-Verfahren, bei dem ein definierter DNA-Abschnitt mit Hilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase, vervielfältigt wird (Dierkes et al. 2009; Yuan et al. 2009). Dies ermöglicht den Nachweis der Ursache infektiöser Erkrankungen aus Patientenmaterial,

welcher bei ausreichender Menge an Erregern auch direkt aus dem Blut erfolgt (Rudolph et al. 1993; Rothman et al. 2002; Dierkes et al. 2009). Im Vergleich zur Blutkultur ist die molekulardiagnostische Identifikation der Mikroorganismen deutlich schneller. Im Durchschnitt benötigt eine Blutkultur 24 bis 72 Stunden, eine PCR hingegen vier bis sieben Stunden (Tsalik et al. 2010; Lucignano et al. 2011).

Als DNA-Polymerasen werden für die PCR vor allem Taq-Polymerasen verwendet. Diese Enzyme sind Weiterentwicklungen der ursprünglich aus dem thermophilen gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq), welches in der Nähe von heißen Quellen und Geysiren vorkommt, isolierten Polymerase. Die Taq-Polymerase hat eine optimale Extensionstemperatur von 75 bis 80 °C, wodurch sie für den Einsatz in einer PCR geeignet ist (Lodish et al. 2001). Die Polymerase benötigt für den Start der Reaktion zwei Primer, kurze einzelsträngige Oligonukleotide. Ein Primer lagert sich an den Antisense-Strang der DNA (F-Primer), der andere Primer an den Sense-Strang (R-Primer) der denaturierten DNA an. Das Primerpaar schließt das zu amplifizierende DNA-Fragment ein und bestimmt so dessen Länge. Die freien 3'-Hydroxygruppen der Primer dienen als Ausgangspunkte der DNA-Replikation durch die Polymerase.

Ein PCR-Ansatz besteht somit aus einer zu amplifizierenden DNA, welche als Template bezeichnet wird, einer thermostabilen DNA-Polymerase, zwei passenden Oligonukleotidprimern, Nukleotiden und einer auf die Polymerase abgestimmte gepufferte Umgebung (Müllhardt 2009).

Die PCR-Reaktion beruht auf wiederkehrenden Zyklen bestehend aus drei Schritten, der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation, auch Extension genannt. Durch das Lösen der Basenpaare bei 95 °C spaltet sich bei der Denaturierung die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge auf. Im zweiten Schritt, dem Annealing (ca. 55 - 60 °C) lagern sich die Oligonukleotidprimer an ihre komplementäre Bindungsstelle der Template-DNA. Im letzten Schritt, der Elongation oder Extension, wird die Temperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Hierbei verlängert die Polymerase die angelagerten Primer vom 5'- zum 3'- Ende komplementär zum Templatestrang. Somit entsteht eine Kopie der Original-DNA, begrenzt auf ein von den Primern eingerahmtes Fragment. Die Zyklenzahl einer PCR liegt zwischen 25 und 40 Zyklen. Da immer zwei Primer, die jeweils an einem der beiden Einzelstränge binden, eingesetzt werden, wird die DNA-

Menge in jedem Zyklus nahezu verdoppelt. Somit wird die Original-DNA während einer PCR exponentiell vermehrt (Anthony et al. 2000; Harada et al. 2008; Yuan et al. 2009; Müllhardt 2009; Lin et al. 2010; Lottspeich et al. 2012).

Es gibt verschiedene PCR-Verfahren. Die end-point-PCR wird bis zum Abschluss der Reaktion durchgeführt und das Ergebnis anschließend analysiert. Bei der realtime-PCR wird der Verlauf der Reaktion bzw. die Zunahme der PCR-Produkte über Fluoreszenzfarbstoffe in Echtzeit verfolgt. Im Falle einer Multiplex-PCR, die sowohl mit einer end-point-PCR als auch mit einer realtime-PCR möglich ist, finden mehrere Nachweise gleichzeitig in einer Reaktion statt (Markoulatos et al. 2002; Yuan et al. 2009).

### III Material und Methoden

#### 1 Probanden

Das für die Studie herangezogenen Patientengut waren Pferde, die von verschiedenen Kliniken und Praxen betreut wurden. Insgesamt wurden 101 Pferde aus fünf Kliniken/Praxen beprobt. Die Pferde standen entweder als Patienten in den Kliniken und Praxen ein oder wurden im Rahmen der Fahrpraxis im Stall beprobt. Elf der 101 Proben waren Kontrollproben, welche von Pferden aus verschiedenen Ställen, Altersklassen und unterschiedlichem Trainingszustand stammten. Diese Pferde waren am Tag der Blutentnahme und auch zuvor klinisch gesund. Die Pferde wurden in zwei Gruppen eingeteilt, welche aus 5 adulten Pferden und 6 Fohlen bestanden. Eine Liste aller in die Studie eingeschlossen Pferde bzw. Proben wird in Tabelle 29 gezeigt. Tabelle 29 beinhaltet außerdem eine Übersicht über die Altersklasse, das genaue Alter und Geschlecht der Pferde, die Art der entnommenen Proben und die klinischen Veränderungen.

**Tabelle 1:** Zuordnung der Kliniken zu den Probennummern  
Anhand der ersten Zahl der Probennummer konnte die Probe einer Klinik zugeordnet werden

Probennummer	Klinik
1_xxx	Klinik 1
3_xxx	Klinik 3
4_xxx	Klinik 4
6_xxx	Klinik 6
7_xxx	Klinik 7

#### 2 Teilnahme Kriterien

Bei Teilnahme an der Studie, wurden die betroffenen Pferde klinisch untersucht und Blut entnommen. Vor der Studie wurden Einschlusskriterien festgelegt und als Merkblatt (Anhang 1) an die teilnehmenden Kliniken und Praxen verteilt. Die von Bone et al. (1992) und Robertson et al. (2006) beschriebenen SIRS-Kriterien wurden als Anhaltspunkte genommen. Das Hauptkriterium für diese Studie war eine erhöhte Körpertemperatur ( $> 38,5$  °C). Andere abgefragte, aber nicht für den Einschluss in die Studie notwendige Kriterien waren Hypothermie, Leukozytose, Tachykardie oder Tachypnoe. Außerdem wurden Krankheitsbilder und klinische Veränderungen abgefragt, die als Hinweis auf eine Bakteriämie oder Sepsis dienten.

Die Entscheidung zur Teilnahme wurde den praktizierenden Tierärzten überlassen. In Fällen, in denen die Pferde bereits mit einem Antibiotikum therapiert wurden, es über einen längeren Zeitraum zu rezidivierenden Temperaturerhöhungen kam oder der Krankheitsverlauf schon einige Zeit anhielt bevor eine Blutprobe genommen werden konnte, wurde der Einschluss in die Studie erwogen.

### **3 Mappen für Kliniken/Praxen**

Jeder Klinik/Praxis wurde vor Beginn der Studie eine Mappe ausgehändigt, in der sich das Merkblatt über die Einschlusskriterien (Anhang 1) und eine detaillierte Beschreibung zum Ablauf der Blutentnahme (Anhang 2) befanden. Zusätzlich enthielt die Mappe Befundbögen (Anhang 3), die zur Auswertung dienten. Diese Befundbögen klärten über die Herkunft der Probe auf und übermittelten die Daten des Pferdes. Außerdem informierten sie über eine antibiotische Vorbehandlung und die klinischen Veränderungen, welche das Pferd zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigte.

### **4 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte, wie in Anhang 2 beschrieben, durch die Punktion der Vena jugularis dexter oder sinistra. Vor Entnahme wurde die Stelle rasiert und danach mit einem geeigneten Hautantiseptikum, entweder Alkohol oder einer alkoholischen Povidon-Jod-Lösung, durch mehrmaliges Abwischen und erneutes Auftragen desinfiziert und entfettet. Das Hautantiseptikum wurde erneut auf die rasierte Stelle aufgetragen und während der vorgeschriebenen Einwirkzeit feucht gehalten. Nach der Einwirkzeit wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem sterilen Tupfer entfernt. Hierbei wurden entweder sterile Handschuhe oder Einmalhandschuhe getragen, welche vor Beginn der Entnahmeprozedur mit Alkohol oder einer alkoholischen Povidon-Jod-Lösung besprüht wurden.

Zehn Milliliter des entnommenen Blutes wurden für das Beimpfen einer Blutkulturflasche und 2 ml für den molekularbiologischen Nachweis (PCR) verwendet. Um die insgesamt 12 ml Blut sicher zu erhalten, wurden ca. 20 ml Vollblut entnommen. Hierfür wurden eine sterile Eimalkanüle und eine 20 ml fassende Spritze verwendet.

## 5 Blutproben für die PCR

### 5.1 Stabilisieren der Blutproben für die PCR

Das Blut für die PCR-Untersuchung wurde sofort im Anschluss an die Blutentnahme in ein hierfür vorbereitetes Stabilisierungsröhrchen gefüllt. In diesem befanden sich 2 ml AL-Puffer, zu denen 2 ml des entnommenen Vollblutes hinzugefügt wurden. Der AL-Puffer stammte aus dem QIAamp DNA Blood Mini Kit und diente der Lyse des Blutes und eventueller Mikroorganismen und somit der Stabilisierung der Probe. Nach Einfüllen des Vollblutes wurde das Blutstabilisierungsröhrchen vorsichtig und langsam etwa zwei bis dreimal geschwenkt. Die Stabilisierungsröhrchen wurden vor Beginn der Studie vorbereitet und an die Kliniken und Praxen verteilt. Für die Stabilisierungsröhrchen wurden sterile 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 2 ml AL-Puffer befüllt.

### 5.2 Aufbewahrung und Transport der Blutproben für die PCR

Das für die PCR bestimmte stabilisierte Blut (III Abschnitt 5.1) wurde bei Kühlschranktemperatur (+4 - 8 °C) gelagert und transportiert. Die Kühlung beim Transport erfolgte in einer Kühltasche mit Kühlakkus und geschah innerhalb eines Tages.

## 6 Sekundärproben

Wenn verfügbar wurde parallel zur Blutprobe eine Sekundärprobe entnommen. Sekundärproben wurden als Probeentnahme von einem potentiell für das Krankheitsbild verantwortlichen Infektionsherd definiert.

**Tabelle 2:** Sekundärproben und deren Probengefäße

Sekundärprobenart	Probengefäß
Bauchhöhlenflüssigkeit	Probenröhrchen
Bronchialsekret	Probenröhrchen oder Tupfer
Brusthöhlenflüssigkeit	Probenröhrchen
Eiter	Probenröhrchen oder Tupfer
Kot	Probenröhrchen
Nasensekret	Probenröhrchen oder Tupfer
Präputialabstrich	Tupfer



Sekundärprobenart	Probengefäß
Synovia	Probenröhrchen
Trachealsekret	Probenröhrchen oder Tupfer
Uterussekret	Probenröhrchen

### 6.1 Aufbewahrung und Transport der Sekundärproben

Die Sekundärproben wurden entweder als Tupferproben oder im Fall von Sekret in Probenröhrchen entnommen und aufbewahrt. Sie wurden wie die Blutproben (III Abschnitt 5.2) gelagert und transportiert.

## 7 Blutkulturflaschen

Parallel zu den für die PCR bestimmten Blutproben wurde jeweils eine Blutkulturflasche beimpft. Wie schon in III Abschnitt 4 beschrieben wurden 10 ml des entnommenen Blutes unmittelbar nach der Entnahme in eine Blutkulturflasche beimpft. Nach vorherigem Entfernen des Plastikschatzes von der Blutkulturflasche und Desinfektion des Gummiverschlusses wurden die 10 ml Vollblut mit einer sterilen Einmalkanüle in das Medium der Blutkulturflasche verbracht. Zum Beimpfen wurden sterile Handschuhe getragen. Die beimpften Blutkulturflaschen trafen innerhalb der nächsten 48 h im Labor ein. Bis dahin wurden sie bei Zimmertemperatur (25 °C) gelagert.

### 7.1 Verarbeitung der Blutkulturflaschen

Nach Ankunft im Labor (IDEXX Vet Med Labor, Ludwigsburg) wurde der Blutkulturflasche ein Detektionssystem in Form einer Signalkammer aufgesetzt. Das Blutkultursystem war für den Nachweis von aeroben und anaeroben Bakterien geeignet. Ein positives Ergebnis wurde durch das Aufsteigen des Blut-Medium-Gemisches in die aufgesetzte Signalkammer sichtbar. Dies geschieht aufgrund der Gasproduktion, die beim Wachsen eines Erregers in der Flasche entsteht und dem daraus folgenden Überdruck. Die Flasche wurde mindestens bis zu einem positiven Ergebnis, aber höchstens zehn Tage bei 37 °C bebrütet. Von einer positiven Blutkultur wurden für den Erregernachweis verschiedene Agar-Platten mit Selektivnährböden, sowie Anreicherungs-Bouillons ausgestrichen und beimpft. Bei Wachstum eines oder mehrerer Erreger wurde mit Hilfe des MALDI-TOF-MS (Bruker) oder

des VITEK 2 (bioMérieux) eine Keimdifferenzierung ausgehend von Einzelkolonien durchgeführt. Das Ergebnis wurde danach von erfahrenen Fachtierärzten für Mikrobiologie und Mikrobiologen interpretiert. Außerdem bestand die Möglichkeit der Erstellung eines Antibiogramms unter Verwendung des VITEK 2.

## **7.2 Blutkulturproben**

Nach Abschluss der Untersuchungen wurde aus der Blutkulturflasche eine Probe (Aliquot) mit einem Volumen von 1 ml genommen und eingefroren. Die postkulturell entnommenen Blutkulturproben wurden wie die Proben für die PCR verarbeitet und getestet (III Abschnitt 8, 10 und 11).

## **8 Aufreinigung der Probe**

Die Gesamt-DNA der Probe wurde mit dem DNA Blood Mini Kit von QIAGEN wie im Folgenden aufgereinigt und isoliert.

Die stabilisierten Blutproben (III Abschnitt 5.1), Sekundärproben (III Abschnitt 6) und die postkulturell entnommene Blutkulturproben (III Abschnitt 7.2) wurden nach dem Protokoll „DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)“ aus dem QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Second Edition November 2007, Seite 27-29) verarbeitet.

Für die Aufreinigung der stabilisierten Blutproben wurde die Reihenfolge der ersten drei Schritte geändert. Der laut Handbuch dritte Schritt, die Zugabe des Lysepuffers AL, wurde schon in den Kliniken und Praxen durch das Einfüllen des entnommenen Vollblutes in das Stabilisierungsröhrchen durchgeführt. Nach dem Eintreffen der Probe im Labor (Curetis AG, Holzgerlingen) wurde die stabilisierte Blutprobe gründlich gemischt und für die Weiterverarbeitung 400 µl der Mischung entnommen. Anschließend wurde der laut Protokoll erste Schritt, die Zugabe der Proteinase K, durchgeführt.

Wenn eine Sekundärprobe als Tupferprobe im Labor eintraf, wurden zunächst 200 µl PBS in ein 1,5-ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, in dem der Tupfer abgespült wurde. Danach wurde nach Protokoll die DNA aufgereinigt.

Eine weitere Abweichung vom Protokoll bestand am Ende der DNA-Aufreinigung. Die

gereinigte DNA wurde in 200 µl AE-Puffer für 5 min anstatt laut Protokoll für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach eluiert. Das Isolat enthielt die equine DNA des Blutes sowie potentiell bakterielle DNA, welche für die weitere Vorgehensweise benötigt wurde.

**Tabelle 3:** Aufreinigung der Proben

Menge	Tätigkeit	Temperatur/ Umdrehungen	Gerät	Zeit
200 µl	PBS		Pipette	
	+ Sekundärprobe als Tupferprobe		Pipette	
	mischen		Vortexer für Safe Lock Tubes	
200 µl	Sekundärprobe oder Blutkulturprobe			
200 µl	AL Buffer			
	mischen		Vortexer für Safe Lock Tubes	
ODER				
	Stabilisierte Blutprobe mischen		Vortexer	
400 µl	Stabilisierte Blutprobe		Pipette	
ab hier gleiche Arbeitsschritte für allen Proben				
20 µl	Protease		Pipette	
	mischen		Vortexer	
	Inkubieren	56 °C	Thermomixer	10 min
	Zentrifugieren		Zentrifuge	kurz hoch zentrifugieren
200 µl	Ethanol		Pipette	
	mischen	intermittierend	Vortexer	15 sec
	Zentrifugieren		Zentrifuge	kurz hoch zentrifugieren
500 µl	Template in Spin column umfüllen		Pipette	
	Zentrifugieren	6000 x g	Zentrifuge	1 min
	Tubes wechseln			
500 µl	Buffer AW1		Pipette	
	Zentrifugieren	6000 x g	Zentrifuge	1 min
500 µl	Buffer AW2		Pipette	
	Zentrifugieren	20000 x g	Zentrifuge	3 min
	Ausschütten			
	Zentrifugieren	20000 x g	Zentrifuge	1 min
	In Safe lock Epi (Eppendorf Reaktionsgefäße)			
200 µl	Buffer AE		Pipette	
	Stehen lassen/inkubieren	Raumtemperatur (25 °C)		5 min
	Zentrifugieren	6000 x g	Zentrifuge	1 min

## 9 Primer

Ein Großteil der verwendeten Primer wurde vor Beginn der Studie entwickelt (Anhang 4). Die Primer wurden von der Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert. Die Primer-Stocklösungen wurden mit dem vorgegebenen Volumen an Nukleasefreiem Wasser in eine Lösung mit der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gebracht und gefroren gelagert. Für die weitere Verarbeitung und Verhinderung von Kontaminationen wurden Aliquots der Stocklösungen hergestellt.

### 9.1 Primerdesign

#### 9.1.1 Datenbanksuche mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Nach Festlegung der für diese Studie relevanten Pathogene wurde mit dem Primerdesign begonnen (Verwendete Software siehe IX Tabellen, Tabelle 30). Soweit möglich wurde für das Primerdesign 23 S rDNA verwendet. Lediglich in einem Fall wurde auf die Sequenz von *gyrB* zurückgegriffen. Sequenzen wurden in den Datenbanken des NCBI gesucht, initial über Stichwortsuche und anschließend mit BLAST. BLAST ist ein Tool zum Durchsuchen großer Sequenzdatenbanken, das Nukleotid- oder Proteinsequenzen einer Suchanfrage (Query) mit schon in Datenbanken vorhandenen Sequenzen vergleicht. Nach Abschluss der Suche liefert das Programm lokale Alignments mit passenden Sequenzen aus der Datenbank. Die Ergebnisse einer BLAST-Suche werden durch mehrere Qualitätskriterien bewertet. Eine Aussage über die Signifikanz eines Ergebnisses ist der E-value (Expected value). Der E-value ist ein Begriff aus der Wahrscheinlichkeitsrechnung und beschreibt hier die Wahrscheinlichkeit, dass die „Query“ zufällig mit dem Ergebnis übereinstimmt und keine Ähnlichkeit oder sogar Identität aufgrund einer verwandtschaftlichen Beziehung zwischen den Sequenzen besteht. Je niedriger der E-value ist, desto wahrscheinlicher ist die Suchsequenz zur „Query“ homolog. Weitere Qualitätskriterien des Ergebnisses sind die „Query coverage“, die angibt, welchen Anteil der Query das Suchergebnis abdeckt und die „Identity“, die eine Aussage darüber macht wie groß die Übereinstimmung innerhalb dieses abgedeckten Bereichs ist (Altschul et al. 1990).

### 9.1.2 Multiples Sequenzalignment

Clustal X ist ein Computerprogramm zur Berechnung multipler Sequenzalignments. In dieser Studie wurde Clustal X 2.1 verwendet. Alignments sind die Grundlage aller Sequenzanalysen. Das einfachste Alignment, das paarweise Alignment, besteht aus zwei Sequenzen, die aufgrund der Position ihrer Nukleotide bzw. Aminosäuren aneinander ausgerichtet werden. Ziel ist es dabei, möglichst viele identische Positionen nebeneinander in den zu vergleichenden Sequenzen zu finden. Die Bewertung dieses Vergleichs erfolgt mit einer sogenannten Substitutionsmatrix, die die Berechnungsgrundlage für die Ermittlung der Werte für "Identität" und "Ähnlichkeit" der Sequenzen bildet. Das Multisequenz-Alignment, also das gleichzeitige Analysieren mehrerer Sequenzen, liefert im Vergleich zum paarweisen Sequenz-Alignment genauere Informationen zur Nukleotid- bzw. Aminosäureverteilung an einzelnen Positionen ähnlicher Sequenzen. Alle Multisequenz-Alignments wurden mit Clustal X unter Verwendung der Voreinstellungen durchgeführt. Ob ein multiples Alignment biologisch sinnvoll ist, muss für jedes Alignment neu geklärt werden (Larkin et al. 2007).

Die Sequenzen aus Anhang 4 wurden sortiert und mit Gruppen verwandter Sequenzen jeweils ein multiples Sequenzalignment durchgeführt. Anhand dieser Alignments wurden spezifische Bereiche in der Sequenz für die jeweilige bakterielle Spezies oder Gruppe identifiziert. Für diese Bereiche wurden dann Primer entwickelt. Für die Studien-Primer wurden die folgenden Kriterien verwendet:

**Tabelle 4:** Kriterien für das Primerdesign

Länge	20-25 Basen
Schmelzpunkt	50-59 °C
GC-Gehalt	40-60 %
Hairpin	< 40 °C

Mögliche Primer wurden mit OligoAnalyzer 3.1 und Primer-BLAST auf ihre Eignung überprüft (Verwendete Software für das Primerdesign siehe Tabelle 30).

Mit dem OligoAnalyzer 3.1 konnten die Primer auf ihre Schmelztemperatur, ihren GC-Gehalt, die Ausbildung sogenannte Hairpins (ein „Zusammenklappen“ des Oligonukleotides) und das Selfpriming, also das Hybridisieren identischer Primer überprüft werden. Um die theoretische Spezifität der Primer zu analysieren, wurde mit den Sequenzen der Primerpaare

mit Primer-BLAST eine Datenbanksuche durchgeführt. Primer-BLAST durchsucht die NCBI-Datenbank nach möglichen Templates für die eingegebenen Primer. Hierzu wurden in die Rubrik Primer Parameters der Forward- und der Reverse-Primer eingegeben. In der Rubrik „Primer Pair Specificity Checking Parameters“ wurde die Datenbasis auf nr (non-redundant) umgestellt und die Einschränkung auf „Homo sapiens“ herausgenommen.

## 9.2 Herstellung der Primermischungen für die Multiplex-PCR

Die Primer wurden zu sechs Primermischungen kombiniert. Die Mischungen bestanden entweder aus drei oder vier Primerpaaren. Die Primer wurden in einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  in den Primermischungen eingesetzt. Bei der Zusammenstellung der Primermischungen wurde auf eine ausreichende Unterscheidbarkeit in der Länge der zu synthetisierenden Fragmente und auf eine ähnliche Schmelztemperatur geachtet. Um bei der Auswertung verschiedene Analyte unterscheiden zu können, unterschieden sich kombinierte Analyte um mindestens 50 Basenpaare in ihren Fragmentlängen. Die Primermischungen wurden wie folgt pipettiert.

**Tabelle 5:** Pipettierschema zur Herstellung der Primermischungen für die Multiplex-PCR (für Studienproben)

Konzentration der einzelnen Primer in der Mischung = 3  $\mu\text{M}$

Anzahl der Primerpaare	Volumen	Material
3 bzw. 4 Primerpaare	Je 3 $\mu\text{l}$	F-Primer (100 $\mu\text{M}$ )
	Je 3 $\mu\text{l}$	R-Primer (100 $\mu\text{M}$ )
	76 $\mu\text{l}$ /82 $\mu\text{l}$	Nukleasefreies Wasser

Eine Ausnahme stellte Primermischung 6 mit dem Universal Primer (unspezifischer Primer für die Detektion einer Vielzahl an bakteriellen Spezies) dar. Hier wurde eine Konzentration des Primers von 10  $\mu\text{M}$  in der Primermischung eingesetzt.

**Tabelle 6:** Pipettierschema zur Herstellung der Primermischung des Universal-Primer bzw. für die Singleplex-PCR

Konzentration der einzelnen Primer in der Mischung = 10  $\mu\text{M}$

Primer	Volumen	Material
Universal Primer	10 $\mu\text{l}$	F-Primer (100 $\mu\text{M}$ )
	10 $\mu\text{l}$	R-Primer (100 $\mu\text{M}$ )
	80 $\mu\text{l}$	Nukleasefreies Wasser

Die Primermischungen setzen sich wie in Tabelle 31 gezeigt zusammen. Es wurden jeweils 100-200  $\mu\text{l}$  der Primermischungen hergestellt. Aufgrund des geringen Volumens, wurden die Primermischungen während der Studie mehrmals erneuert, um Kontaminationen zu verringern bzw. zu verhindern.

## 10 PCR

### 10.1 Pipettierschema für die Multiplex-PCR

Nach Aufreinigung der Blut-, Sekundär- und postkulturellen Blutkulturproben wurde die isolierte DNA im weiteren Verlauf für die PCR vorbereitet.

Zwölf Ansätze mit jeweils einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  wurden pipettiert. Diese Ansätze setzten sich aus 25  $\mu\text{l}$  Mastermix, 10  $\mu\text{l}$  Template, 5  $\mu\text{l}$  Primermischung und 10  $\mu\text{l}$  Nukleasefreiem Wasser zusammen. Der Mastermix (QIAGEN, Multiplex PCR Kit) ist doppelt konzentriert und enthält die Taq DNA-Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), sowie die für die Polymeraseaktivität benötigte Konzentration an zweiwertigen Kationen. Außerdem bestimmt der Mastermix die Pufferbedingungen. Das Template bestand aus der isolierten equinen sowie potentiell bakteriellen DNA. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug in den Primermischungen 1 bis 5 0,3  $\mu\text{M}$ , im Reaktionsansatz der Primermischung 6 (Universal-Primer) 1  $\mu\text{M}$ .

Um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen, wurden parallel Negativkontrollen angesetzt. Hierfür wurde anstelle der Template-DNA Nukleasefreies Wasser verwendet.

**Tabelle 7:** PCR-Ansatz für die Multiplex-PCR (für Studienproben)

Volumen	Material
25 $\mu\text{l}$	2x Mastermix
10 $\mu\text{l}$	Template/nukleasefreies Wasser
5 $\mu\text{l}$	Primermischung 1-6
ad 50 $\mu\text{l}$	Nukleasefreies Wasser

## 10.2 PCR-Programm

Nach Herstellung der PCR-Ansätze wurde eine end-point-PCR durchgeführt. Hierfür wurde der Mastercycler<sup>®</sup> epigradient eppendorf von Eppendorf als Thermocycler verwendet.

Das für alle Proben verwendete PCR-Programm (Tabelle 32) begann mit einem initialen 95 °C-Schritt (10 min) zur Aktivierung der verwendeten Polymerase. Anschließend erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 96 °C (30 sec), bei dem die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären DNA-Strängen aufgelöst wurden. Dadurch fand die Auftrennung des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge statt. Bei der Hybridisierung bei 61 °C lagerten sich die Primer an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge der Ziel-DNA an (Annealing). Danach begann die DNA-Polymerase aktiv zu werden indem sie beginnend am 3'-Ende der Primer den Gegenstrang synthetisierte. Hierzu wurden der Template-DNA komplementäre dNTPs (A, T und G, C) angelagert (Elongation, 72 °C, 50 sec) und somit aus den Einzelsträngen wieder zwei komplementäre DNA-Doppelstränge repliziert. Die ersten beiden Zyklen hatten eine verlängerte Annealing-Phase (5 min), um auch bei geringer Template-Konzentration ein Anlagern der Primer zu ermöglichen und somit die Nachweisgrenze des Assays zu senken. Der letzte Schritt (final extension) wurde im Zuge der Optimierung des Programms auf 1 min reduziert. Diese drei Schritte wurden im vorliegenden Programm 2x mit langer Annealingzeit (5 min) und 33-Mal mit kurzer Annealingzeit (1 min) wiederholt.

## 11 Auswertung der PCR

### 11.1 Bioanalyser

Das für die qualitative und quantitative Auswertung verwendete Gerät war ein 2100 Bioanalyser von Agilent, der als Ersatz für die klassische Gelelektrophorese heute in vielen Labors eingesetzt wird. Die elektrophoretischen Assays des Agilent Bioanalyzers beruhen auf einer herkömmlichen Gelelektrophorese, welche auf einen Chip übertragen wird. Der Chip besitzt Kavitäten unter denen sich ein Netzwerk aus Mikrokanälen befindet. Diese werden mit einer Gelmatrix, die einen fluoreszierenden, interkalierenden DNA-Farbstoff enthält gefüllt. Zur Eingrenzung des Messbereichs dient der obere und untere Marker, der in die Kaviäten des Chips pipettiert wird. Für die Berechnung der Fragmentgrößen dient eine Mischung aus DNA-Fragmenten definierter Längen. Pro Chip



können bis zu 12 unterschiedliche PCR-Proben in den jeweiligen Kavitäten gemessen werden.

Wie in einem Agarosegel wandern die DNA-Fragmente in der Gelmatrix des Chips in einem angelegten elektrischen Feld. Ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis sorgt für die Trennung der Moleküle nach Größe. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt über Kurven eines Elektropherogramms (Peaks) und Gel-ähnlichen Bildern (Banden). Im Elektropherogramm entspricht die x-Achse der Basenzahl des DNA-Fragments und die Fläche unter der Kurve seiner Konzentration, welche in nM angegeben wird (Agilent Technologies). Wenn ein Signal an der für einen Analyten spezifischen Stelle auf der x-Achse erscheint, wurde das als Hinweis für das Vorhandensein der zu amplifizierenden DNA gewertet.

Für diese Arbeit wurde das Agilent DNA 1000 Kit verwendet. Dieses Kit dient der Trennung, Größenbestimmung und Quantifizierung von dsDNA Fragmenten von 25 bis 1000 Basenpaaren.

## 12 Datenspeicherung

Die Daten, die von den Befundbögen stammten, wurden in eine Datenbank (Access 2007-2010; Microsoft Office) eingespeist. Diese Datenbank ermöglichte es die Daten übersichtlich zu verwalten. Für diese Studie wurden in Access Formulare erstellt um die Dateneingabe zu vereinfachen. Die in diese Formulare eingetragenen Daten wurden automatisch in Tabellen gespeichert. Mit Hilfe der Datenbank konnten Abfragen erstellt werden, die das Sortieren, Filtern und Auswerten erleichterten. Es wurden drei Formulare erstellt, die miteinander verknüpft wurden. Im Formular „Probenverwaltung“ wurden die allgemeinen Daten festgehalten. Im Formular „Probendetails“ wurden Informationen zum Krankheitsbild und zur Therapie abgelegt und im letzten Formular „Ergebnisse“ wurden die Ergebnisse der Untersuchungen eingetragen.

**Tabelle 8:** Formulare der Datenbank

Probenverwaltung	Probendetails	Ergebnisse
Probennummer	Probennummer	Probennummer
Blutprobennummer	Antibiotikagabe wenn ja:	PCR-Ergebnis (Anzahl der Keime)
Sekundärprobennummer	Dauer	Blutkulturflaschen-ID

<b>Probenverwaltung</b>	<b>Probendetails</b>	<b>Ergebnisse</b>
Sekundärprobenart	Art	Blutkulturergebnis
Eingangsdatum		Erreger der Blutkultur
Analysedatum	Fieber	Analyte der PCR-Probe
Entnahmedatum	Hypothermie	
Name des Pferdes	Tachykardie	
Alter	Tachypnoe	
Geschlecht	Leukopenie	
Besitzer	Leukozytose	
Praxis/Klinik	Neutrophilie	
Anmerkung	Labor (weitere Auffälligkeiten)	
	Sonstiges	

## **IV Vortests**

### **1 Kultur**

Für die verschiedenen Vortests wurden vor Beginn der Studie definierte Bakterienisolate (Tabelle 33) auf verschiedenen festen Nährmedien, abhängig von der Bakterienart, durch Ausstreichen angezüchtet. Sie wurden 24 Stunden bei 37 °C im Inkubator bebrütet.

#### **1.1 Verarbeitung der Bakterienisolate**

Nach Anzucht der unterschiedlichen Bakterienarten wurden Bakteriensuspensionen hergestellt. Dafür wurde eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze in 200 µl PBS gebracht. Diese Suspensionen wurden wie die Proben (III Abschnitt 8, Tabelle 3) aufgereinigt und die bakterielle DNA isoliert.

### **2 Lagerungstest**

Da sich die Kliniken und Praxen in einem Umkreis von circa 50 Kilometern befanden und nicht sicherzustellen war, dass die Proben am selben Tag analysiert werden konnten, war das Ziel der Lagerungstests herauszufinden, wie die Blutproben für die PCR stabilisiert werden könnten.

Die Lagerungstests wurden bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Bei Raumtemperatur (+25 °C), im Kühlschrank (+4 - 8 °C) und im Gefrierschrank (-20 °C). Hierfür wurden zwei Bakterienisolate (06\_E-\_coli und 24\_S-pneumoniae) verwendet (IV Abschnitt 1). Mit dem Photometer wurde eine  $OD_{600} = 1,0$  eingestellt. Das entspricht einer Konzentration im Isolat von ca.  $10^9$  Organismen/ml. Hieraus wurde nach einer Verdünnung von 1:10 eine Konzentration von  $10^8$  Organismen/ml hergestellt und von dieser Konzentration aus weiter auf  $10^7$  und  $10^6$  Organismen/ml verdünnt. Die verwendete Einheit „Organismen/ml“ berücksichtigt, dass diese Methode nicht zwischen lebenden und toten bakteriellen Organismen differenzieren kann.

Das Blut, entnommen von klinisch gesunden Pferden, wurde mit den auf  $10^8$  Organismen/ml eingestellten Bakteriensuspensionen beimpft. Das Blut wurde in sechs Portionen à 3 ml aufgeteilt und mit jeweils 3 µl der Bakteriensuspension versetzt. Das entspricht einer

Verdünnung von 1:1000, so dass eine Konzentration von  $10^5$  Organismen/ml in dem beimpften Blut entstand. Mit den Suspensionen der Konzentrationen  $10^7$  und  $10^6$  Organismen/ml wurden analog beimpftes Blut mit den Konzentrationen  $10^4$  und  $10^3$  Organismen/ml hergestellt. Nachdem das Blut mit der Bakteriensuspension versetzt wurde, wurde AL-Puffer im Verhältnis 1:1 (3 ml) hinzugefügt. Dadurch wurde eine Lyse der enthaltenen bakteriellen Zellen zur Stabilisierung der Probe erreicht. Anschließend wurden die Proben auf die beschriebene Weise gelagert und deren DNA zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert.

Die Isolierung der DNA erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 8, Tabelle 3). Ein Basalwert zum Zeitpunkt Null, das heißt nach Zufügen der verdünnten Bakterienisolate, wurde bestimmt. Die fünf weiteren Messzeitpunkte wurden variabel ausgewählt.

Es wurde eine Primermischung von *E. coli* und *Streptococcus pneumoniae* mit einer Primerkonzentration von 3  $\mu$ M (Tabelle 9) hergestellt. Der PCR-Ansatz wurde wie in Tabelle 10 pipettiert. Negativkontrollen wurden mitgeführt.

**Tabelle 9:** Pipettierschema zur Herstellung der Primermischung für den Lagerungstest  
Konzentration der einzelnen Primer in der Mischung = 3  $\mu$ M

Primer	Volumen
<i>E. coli</i> – F-Primer	3 $\mu$ l
<i>E. coli</i> – R-Primer	3 $\mu$ l
<i>Streptococcus pneumoniae</i> – F-Primer	3 $\mu$ l
<i>Streptococcus pneumoniae</i> – R-Primer	3 $\mu$ l
Nukleasefreies Wasser	88 $\mu$ l

**Tabelle 10:** PCR-Ansatz für Lagerungstest  
Konzentration der Primer im Reaktionsansatz = 0,3  $\mu$ M

Volumen	Material
15 $\mu$ l	2x Mastermix
6 $\mu$ l	Template/Nukleasefreies Wasser
3 $\mu$ l	Primermischung
ad 30 $\mu$ l	Nukleasefreies Wasser

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32: PCR-Programm und III Abschnitt 11).

### 3 Positivkontrollen mit Singelplex-PCR

Positivkontrollen wurden zur Überprüfung der Primerfunktion durchgeführt. Hierfür wurden Einzelprimer-PCRs aller später in der Studie eingesetzten Primer durchgeführt. Es wurden Einzelprimermischungen wie in III Abschnitt 9.2 Tabelle 6 hergestellt. Ihnen wurde die entsprechende Template-DNA zugefügt (Tabelle 33, IV Abschnitt 1). Ein PCR-Ansatz wurde wie in der untenstehenden Tabelle pipettiert. Negativkontrollen wurden mitgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32: PCR-Programm und III Abschnitt 11).

**Tabelle 11:** PCR-Ansatz für die Singelplex-PCR  
Konzentration der Primer im Reaktionsansatz = 0,3  $\mu$ M

Volumen	Material
15 $\mu$ l	2x Mastermix
1 $\mu$ l	Template/Nukleasefreies Wasser
1 $\mu$ l	Primermischung
ad 30 $\mu$ l	Nukleasefreies Wasser

### 4 Positivkontrollen mit Multiplex-PCR

Zusätzlich wurden die Positivkontrollen mit vorläufigen Primermischungen durchgeführt, welche aus jeweils drei Primerpaaren bestanden. Die Primermischungen wurden wie in III Abschnitt 9.2 (Tabelle 5) beschrieben hergestellt und setzten sich wie in Tabelle 34 gezeigt zusammen. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert. Als Template kam die in IV Abschnitt 1 aufgereinigte und isolierte DNA der Bakterienisolate (Tabelle 33) zum Einsatz.

**Tabelle 12:** PCR-Ansatz für die Positivkontrollen der Multiplex-PCR  
Konzentration der Primer im Reaktionsansatz = 0,3  $\mu$ M

Volumen	Material
15 $\mu$ l	2x Mastermix
1 $\mu$ l	Template/Nukleasefreies Wasser
3 $\mu$ l	Gemisch 1-6
ad 30 $\mu$ l	Nukleasefreies Wasser

Von jeder Primermischung wurden drei Ansätze hergestellt, denen die entsprechende Template-DNA zugefügt wurde. Zusätzlich wurden Negativkontrollen mitgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32 und III Abschnitt 11).

## 5 Positivkontrolle des Universal-Primers

Die Primermischung wurde wie in III Abschnitt 9.2 (Tabelle 6) hergestellt. Der Reaktionsansatz wurde wie für die Positivkontrollen der Singleplex-PCRs (IV Abschnitt 3, Tabelle 11) angesetzt. Als Template wurden verschiedene Bakterienisolate (IV Abschnitt 1, Tabelle 33) eingesetzt. Getestet wurden sowohl durch das Primerpanel abgedeckte bakterielle Spezies als auch Arten, die nicht mit den restlichen Primerpaaren detektiert würden. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32: PCR-Programm und III Abschnitt 11).

## 6 Sensitivität

Um herauszufinden bis zu welcher Bakterienkonzentration bei der PCR ein Ergebnis zu erwarten war (Sensitivität), wurden Verdünnungsreihen analysiert.

Die Bakterien wurden wie in IV Abschnitt 1 angezchtet und in Suspension gebracht. Sie wurden mit 500  $\mu\text{l}$  PBS vermischt. Photometrisch wurde ein  $\text{OD}_{600} = 0,5$  eingestellt. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von ca.  $5 \times 10^8$  Organismen/ml.

Vor der DNA-Isolation wurde von der Ausgangssuspension (ca.  $5 \times 10^8$  Organismen/ml) durch eine 1:500 - Verdünnung eine Konzentration von  $10^6$  Organismen/ml hergestellt:

**Tabelle 13:** Verdünnung der Bakteriensuspension

248 $\mu\text{l}$ PBS	+ 2 $\mu\text{l}$ Bakteriensuspension der Konzentration $10^8$ Organismen/ml
-----------------------	--

Danach fand eine Isolierung der DNA wie bei den Studienproben statt (III Abschnitt 8, Tabelle 3). Nach Isolierung der DNA wurden von dieser  $10^6$  Organismen/ml konzentrierten Suspension weitere Verdünnungen hergestellt. Verdünnt wurde bis zu einer Konzentration von  $10^2$  Organismen/ml.

Es wurden die in der Studie verwendeten Primermischungen eingesetzt (Tabelle 31). Auch der PCR-Ansatz wurde wie für die Studienproben pipettiert (Tabelle 7). Den Primermischungen 1-5 wurden die entsprechenden Templates, bei denen ein Amplifikat zu erwarten war, zugefügt. Für jede Primermischung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32: PCR-

Programm und III Abschnitt 11).

## **7 Kreuzreaktionstest**

Ein weiterer Vortest bestand in der Testung auf Kreuzreaktionen. Hierbei wurde jedes Primerpaar mit den Templates der restlichen Primerpaare getestet. Als Template kam die in IV Abschnitt 1.1 isolierte DNA der Bakterienisolate (Tabelle 33) zum Einsatz. Außerdem wurden die für die Studie hergestellten Primermischungen verwendet (Tabelle 31). Eine Ausnahme bestand in Primermischung 6, dem Universal-Primer, welcher wie in IV Abschnitt 5 getestet wurde. Der Reaktionsansatz wurde wie für die Positivkontrollen der Multiplex-PCR pipettiert. (IV Abschnitt 4, Tabelle 12). Von Primermischung 1-5 wurde jeweils ein Reaktionsansatz hergestellt zu dem das gleiche Template hinzugefügt wurde. Dieses Schema wurde für alle Bakterien des Panels durchgeführt. Die Analyse erfolgte wie bei den Studienproben (III Abschnitt 10.2, Tabelle 32: PCR-Programm und III Abschnitt 11).

**Verwendete Geräte im Labor:** Tabelle 35

**Verwendete Materialien im Labor:** Tabelle 36

## V Ergebnisse

### 1 Ergebnisse der Vortests

#### 1.1 Lagerungstest

Der Lagerungstest wurde, wie in IV Abschnitt 2 beschrieben, bei drei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur = RT (+25 °C), Kühlschranktemperatur = KT (+4 - 8 °C), Gefrierschranktemperatur = GT (-20 °C)) mit unterschiedlichen Endkonzentrationen einer Bakteriensuspension durchgeführt.

Die Lagerung von *E. coli* mit der Konzentration  $10^5$  Bakterien/ml zeigte bei allen drei Temperaturen vergleichbare Werte. Abgesehen von wenigen Messschwankungen blieb die DNA-Konzentration der Proben nach der PCR konstant. Eine geringgradige Abnahme war zu sehen.

**Tabelle 14:** Lagerung von  $10^5$  *E. coli* Bakterien/ml bei RT, KT und GT

Zeit in Stunden	RT $10^5$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml	KT $10^5$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml	GT $10^5$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml
	DNA-Konzentration nach PCR in nM	DNA-Konzentration nach PCR in nM	DNA-Konzentration nach PCR in nM
0	2,1	18,8	3,4
4	100,7	71,1	85,5
24	11,8	44,9	62,9
28	79,5	89,6	50,9
48	78,7	63,9	74,9
120	70,0	87,3	56,8

Die Lagerung von *E. coli* und *Streptococcus pneumoniae* mit einer Konzentration von  $10^4$  Bakterien/ml an allen drei Lagerungsorten zeigte, dass die Konzentration der DNA bei Kühlschranktemperaturen am stabilsten war.

Da Änderungen in der Signalhöhe einer end-point-PCR am deutlichsten im linearen Konzentrationsbereich sind wurde ein weiterer Test mit *E. coli* mit einer Konzentration von  $10^3$  Bakterien/ml bei Kühlschranktemperatur (+4 - 8 °C) durchgeführt. Wie in Tabelle 15 aufgeführt, zeigte *E. coli* über einen Zeitraum von 16,5 h konstante Werte für die Lagerung.



**Tabelle 15:** Lagerung von  $10^3$  *E. coli* Bakterien/ml bei KT

Zeit in Stunden	KT $10^3$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml
	DNA-Konzentration nach PCR in nM
4	38,6
12	35,8
16,5	30,2

## 1.2 Positivkontrollen für die Singleplex-PCR

Alle Primerpaare führten als Singleplex PCR zu Amplifikaten der erwarteten Fragmentlänge.

**Tabelle 16:** Positivkontrolle für die Singleplex-PCR

Primer	Länge des Produkts in Basenpaaren	Template
Ecoli_857_F Ecoli_1319_R	469	<i>Escherichia coli</i>
S.enterica_1678_F S.enterica_2078_R	411	<i>Salmonella typhimurium</i>
K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R	285	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Proteus_1851_F Proteus_2049_R	198	<i>Proteus mirabilis, Proteus vulgaris</i>
Entero_895_F Entero_1457_R	581	<i>Enterobacter cloacae</i>
P.aerug_124_F P.aerug_686_R	621	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	197	<i>Actinobacillus equuli</i>
Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	515	<i>Strep. equi ssp. zooepidemicus, Strep. equi ssp. equi, Strep. dysgalactiae, Strep. pneumoniae</i>
Sequiequi_158_F Sequi_435_R	278	<i>Streptococcus equi ssp.equi</i>
Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R	291	<i>Strep. equi ssp. equi + Strep. equi ssp. zooepidemicus</i>
Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R	280	<i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i>
Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R	289	<i>Streptococcus equi ssp.equi</i>
S.dysgalactiae_1018_F; S.dysgalactiae_1317_R	307	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
S.pneumoniae_2450_F S.pneumoniae_2804_R	359	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
S.aureu_1056_F S.aureu_1242_R	225	<i>Staphylococcus aureus</i>

Primer	Länge des Produkts in Basenpaaren	Template
S.epi_2171_F S.epi_2868_R	682	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
R.equi_129_F R.equi_528_R	402	<i>Rhodococcus equi</i>
Listeria sp._481_F Listeria sp._770_R	284	<i>Listeria monocytogenes</i>
Cl.difficile_2181_F Cl.difficile_2377_R	199	<i>Clostridium difficile</i>
Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R	222	<i>Clostridium perfringens</i>

### 1.3 Positivkontrollen für die Multiplex-PCR

Die Primermischungen für die Multiplex-PCR führten weder zu falsch-positiven noch zu falsch-negativen Ergebnissen. Es wurde ausschließlich das erwartete Amplifikat in der korrekten Länge gebildet.

**Tabelle 17:** Positivkontrolle für die Multiplex-PCR

Primer im Gemisch	Template		
<b>Gemisch 1</b>	<i>Strep. pneumoniae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
S.pneumoniae_2450_F S.pneumoniae_2804_R	361 bp		
Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R		222 bp	
Entero_895_F Entero_1457_R			596 bp
<b>Gemisch 2</b>	<i>Actinobacillus equuli</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Strep. equi ssp. equi</i>
A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	198 bp		
R.equi_129_F R.equi_528_R		415 bp	
Sequiequi_158_F Sequi_435_R			280 bp
<b>Gemisch 3</b>	<i>Colstridium difficile</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>
Cl.difficile_2181_F Cl.difficile_2377_R	198 bp		
Listeria sp._481_F Listeria sp._770_R		288 bp	
S.enterica_1678_F S.enterica_2078_R			416 bp

Primer im Gemisch	Template		
<b>Gemisch 4</b>	<i>Staph. aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Strep. equi</i> ssp. <i>equi</i> + <i>Strep. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>
S.aureu_1056_F S.aureu_1242_R	227 bp		
P.aerug_124_F P.aerug_686_R		633 bp	
Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R			503 bp
<b>Gemisch 5</b>	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	<i>Strep. equi</i> ssp. <i>equi</i> + <i>Strep. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	<i>Staph. epidermidis</i>
Proteus_1851_F Proteus_2049_R	198 bp		
Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R		291 bp	
S.epi_2171_F S.epi_2868_R			686 bp
<b>Gemisch 6</b>	<i>Strep.dysgalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>E. coli</i>
S.dysgalactiae_1018_F S.dysgalactiae_1317_R	299 bp		
K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R		279 bp	
Ecoli_857_F Ecoli_1319R			476 bp

#### 1.4 Positivkontrolle des Universal-Primer

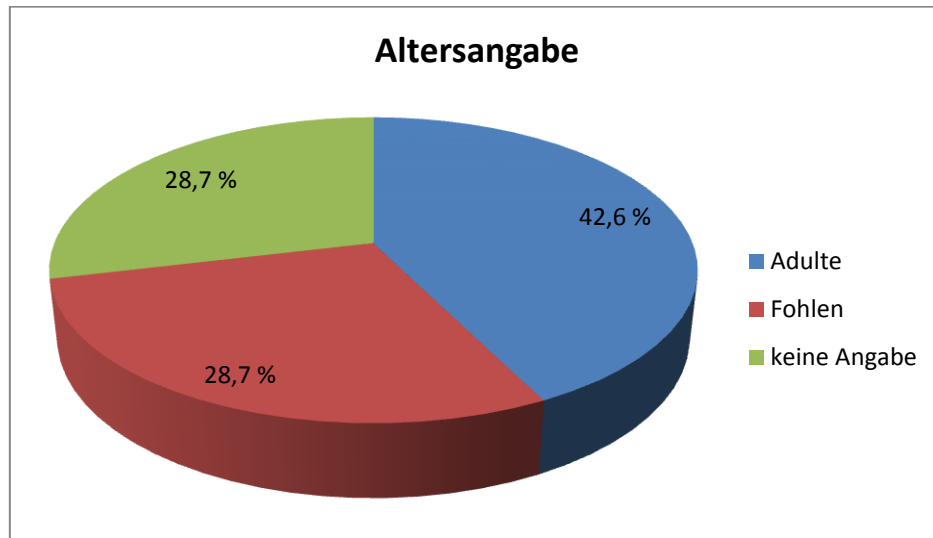
Der Universal-Primer zeigte mit sämtlichen Templates Signale im Bereich von 361 bis 464 Basenpaaren. Die erwartete Fragmentlänge des Universal Primers lag laut Primer BLAST bei 371 Basenpaaren.

#### 1.5 Nachweisgrenze

Ein Großteil der Primer zeigte mit entsprechendem Template bei erwarteter Fragmentlänge eine Amplifikation bis zu einer Konzentration von  $10^2$  Bakterien/ml. Die Primer für *Streptococcus equi* ssp. *equi* und *Listeria* spp. zeigten bis zu einer Konzentration von  $10^3$  Bakterien/ml eine Amplifikation. Das Primerpaar für *Rhodococcus equi* amplifizierte nur bis zu einer Konzentration von  $10^4$  Bakterien/ml.

## 2 Probanden

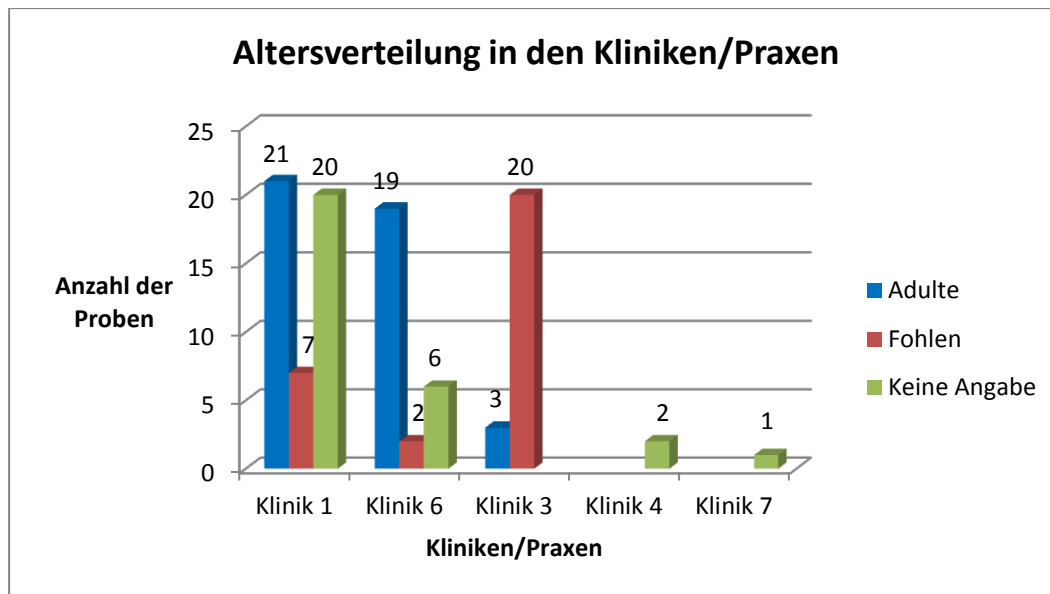
Insgesamt wurden 101 Blutproben von Pferden unterschiedlichen Alters entnommen. Als Fohlen wurden Pferde bis zur Vollendung des ersten Lebensjahres betrachtet. Die 101 Blutproben setzten sich aus 42,6 % adulter Pferde, 28,7 % Fohlen und 28,7 % Pferden ohne Altersangabe zusammen. Im weiteren Verlauf werden die Pferde ohne Altersangabe zu den adulten Tieren gerechnet.



**Abbildung 2:** Altersangabe

Blutproben wurden von 43 adulten Pferden (blau), 29 Fohlen (dunkelrot) und 29 Pferden ohne Altersangabe (grün) entnommen. Im weiteren Verlauf der Studie wurden die Pferde ohne Altersangabe den Adulten zugeordnet.

Klinik 3 lieferte mit 20 Proben (69 %) den Großteil der Fohlenproben. Klinik 1 beprobte sieben Fohlen (24,1 %) und Klinik 6 zwei Fohlen (6,9 %). Blutproben der Kliniken 1 und 6 stammten hauptsächlich von adulten Pferden (21 und 19 Proben). Klinik 3 lieferte drei Proben von adulten Pferden. Proben von Pferden, bei denen das Alter im Befundbogen nicht angegeben wurde belaufen sich für die Klinik 1 auf 20 Proben, Klinik 6 auf sechs Proben, Klinik 4 auf zwei Proben und eine Probe für die Klinik 7.



**Abbildung 3:** Altersverteilung in den Kliniken/Praxen

In Klinik 3 überwiegen die Fohlenproben (rot). In den anderen Kliniken wurden hauptsächlich Proben von adulten Pferden (blau) genommen.

### 3 Geschlechter

In der Studie wurden mehr männliche als weibliche Tiere beprobt. Die untersuchte Kohorte bestand aus 42 Wallachen, 25 Hengsten und 34 Stuten. Alle Wallache gehörten den adulten Pferden an. Bei den 25 Hengsten zählten 76,0 % zu den Fohlen und 24,0 % zu den adulten Pferden. 29,4 % der Stuten waren Fohlen und 70,6 % adulte Pferde.

### 4 Kriterien für die Teilnahme an der Studie

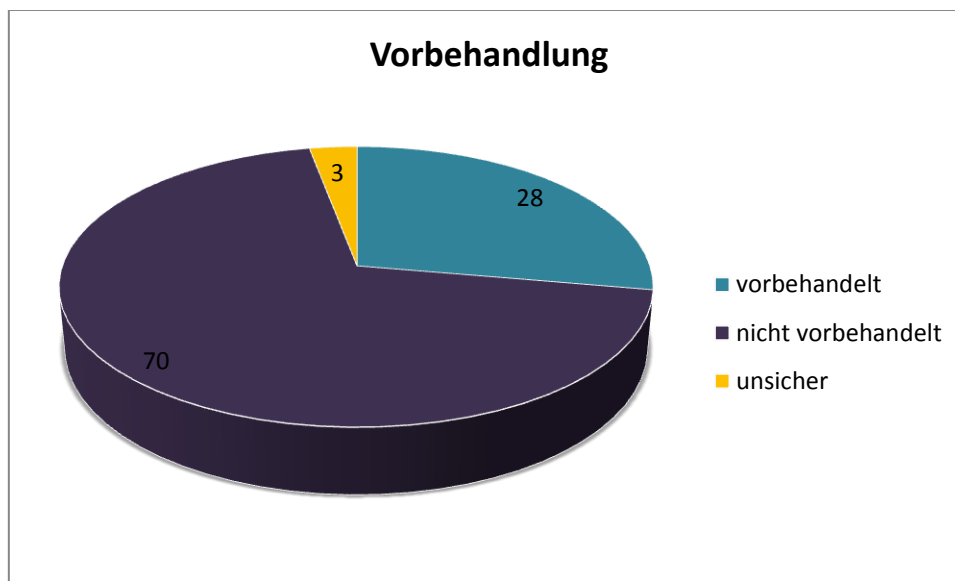
In die Studie eingeschlossen wurden Proben, die ein vollständiges Set ergaben. Ein Set bestand aus einer Blutprobe im Stabilisierungsröhrchen für die PCR-Untersuchung (III Abschnitt 5) und einer beimpften Blutkulturflasche (III Abschnitt 7), die der mikrobiologischen Untersuchung diente. Sekundärproben (III Abschnitt 6) jeglicher Art waren optional.

Die Pferde, die in die Studie einbezogen wurden, wurden nach den Einschlusskriterien (Anhang 1) ausgewählt. Das Hauptkriterium für die Studienteilnahme war eine erhöhte Körpertemperatur (III Abschnitt 2).

## 5 Vorbehandlung

Als vorbehandelt galten Pferde, die vor Blutentnahme für die Studie ein oder mehrere Antibiotika verabreicht bekamen. Dabei wurde vor allem der Zeitpunkt der letzten Eingabe und die Dauer der Wirkung des Antibiotikums berücksichtigt.

Danach galten 28 Pferde als vorbehandelt. Drei Pferde konnten weder als vorbehandelt noch als nicht vorbehandelt eingestuft werden. Sie wurden als „unsicher“ bezeichnet.



**Abbildung 4:** Vorbehandlung

70 Pferde waren nicht vorbehandelt (violett). 28 Pferde erhielten vor Blutentnahme ein oder mehrere Antibiotika (blau). Drei Pferde konnten nicht eindeutig eingestuft werden. Diese werden als „unsicher“ (gelb) bezeichnet.

Die vorbehandelten Pferde wurden mit den Antibiotikaklassen Penicillin, Aminoglykosid, Cephalosporin der vierten Generation, Fluorchinolon, Makrolid, Pyrimidin und Sulfonamid behandelt. Dreizehn Tiere erhielten Cefquinom, fünf Pferde wurden mit der Kombination Penicillin-Streptomycin und drei mit einem Depot-Penicillin (Penicillin-Procaïn) behandelt. Jeweils ein Pferd bekam Trimethoprim-Sulfonamid, Enrofloxacin und Tulathromycin. Ein Pferd wurde mit Trimethoprim-Sulfonamid, Cefquinom und einem Depot-Penicillin therapiert. Bei drei Pferden war bekannt, dass sie vorbehandelt waren, das Antibiotikum war im Befundbogen jedoch nicht angegeben. Die Behandlung der drei adulten Pferde, bei denen eine Vorbehandlung als nicht sicher galt, lag eine längere Zeit zurück. Eines der Pferde wurde für eine Woche mit Penicillin-Procaïn behandelt und die Blutentnahme erfolgte nach einer weiteren Woche. Das verwendete Präparat ist ein Antibiotikum, dessen Gabe bei Pferden alle 48 Stunden wiederholt werden sollte. Ebenfalls mit Penicillin-Procaïn wurde

ein weiteres Pferd bis 38 Tage vor der Blutentnahme für die Studie behandelt. Ein drittes adultes Pferd erhielt über einen Zeitraum von fünf Tagen den Wirkstoff Cefquinom. Die letzte Eingabe erfolgte drei Tage vor Blutentnahme. Cefquinom ist bei adulten Pferden einmal täglich, bei Fohlen zweimal täglich anzuwenden. Die Plasmakonzentration bleibt nur kurze Zeit erhalten.

Cefquinom wird sowohl bei Adulten als auch bei Fohlen häufig eingesetzt. Da an der Studie eine unterschiedliche Anzahl adulter Pferde und Fohlen teilnahmen, mussten die Zahlen, um sie vergleichbar zu machen, gewichtet werden (Tabelle 18). Die Gewichtung zeigt, dass Cefquinom in dieser Studie häufiger bei Fohlen (57,9 %) als bei Adulten (42,1 %) zum Einsatz kam. Die Kombination Penicillin-Streptomycin wurde bei insgesamt fünf Tieren angewendet, wovon der Großteil (90,8 %) in die Altersklasse der Fohlen gehörte. Ein adultes Pferd wurde mit Penicillin-Streptomycin behandelt. Penicillin-Procaïn, Trimetoprim-Sulfonamid und Enrofloxacin wurden in dieser Studie nur bei adulten Pferden eingesetzt (Tabelle 18). Der Wirkstoff Tulathromycin wurde bei einem Fohlen angewendet.

**Tabelle 18:** Einsatz von Antibiotika in den verschiedenen Altersgruppen durch gewichtete Zahlen  
Gewichtung:  $72/29 = 2,48$  (72 Adulte, 29 Fohlen)

Wirkstoff	Ins-gesamt	Anzahl Adulte	Anzahl Fohlen	Gewichtete Adulte	Gewichtete Fohlen	% Adulte gewichtet	% Fohlen gewichtet
<b>Cefquinom</b>	14	9	5	3,6	8,6	42,1	57,9
<b>Pen-Strep</b>	5	1	4	0,4	4,4	9,2	90,8
<b>Pen-Procaïn</b>	4	4		1,6	1,6	100	0
<b>Unbekanntes AB</b>	3	3		1,2	1,2	100	0
<b>Trim-Sulf</b>	2	2		0,8	0,8	100	0
<b>Enrofloxacin</b>	1	1		0,4	0,4	100	0
<b>Tula-thromycin</b>	1		1	0	1	0	100

## 6 Proben der Kontrollgruppen

Von den insgesamt 101 Studienproben wurden 11 Proben für die Kontrollgruppen entnommen. Hierfür wurden Pferde aus verschiedenen Ställen, verschiedener Altersgruppen und unterschiedlichem Trainingszustand ausgewählt, welche am Tag der Blutentnahme und auch zuvor klinisch gesund waren. Die Pferde wurden in zwei Gruppen eingeteilt, welche aus 5 adulten Pferden und 6 Fohlen bestanden.

Drei der Kontrollblutproben wiesen Keime auf (Tabelle 19). Bei einer Blutprobe (1\_032) wurde durch die PCR-Untersuchung ein *Staphylococcus epidermidis* festgestellt, welcher zu den Hautkeimen zählt. In zwei anderen Blutproben (1\_012 und 1\_019) wurde in der Blutkultur das Wachstum von den Hautkeimen *Staphylococcus hominis* ssp. *hominis*, *Staphylococcus xylosus* und *Corynebacterium* sp. festgestellt.

**Tabelle 19:** Ergebnisse der Blutproben der Kontrollgruppen

Probennummer	Altersgruppe	PCR-Ergebnis	Blutkultur-Ergebnis
1_012	Adult	negativ	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>
1_017	Adult	negativ	negativ
1_018	Adult	negativ	negativ
1_019	Adult	negativ	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.
1_020	Adult	negativ	negativ
1_032	Fohlen	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	negativ
1_045	Fohlen	negativ	negativ
1_046	Fohlen	negativ	negativ
1_047	Fohlen	negativ	negativ
1_048	Fohlen	negativ	negativ
3_024	Fohlen	negativ	negativ



## 7 Untersuchungsergebnisse aller Studienproben

**Tabelle 20:** Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aller Studienproben

Ergebnisse der Blutkulturen (Blut-Kultur), der PCR-Analysen der Blutproben (Blut-PCR) und der postkulturell untersuchten Blutkulturproben (Blut- postkulturell PCR) und wenn vorhanden der Sekundärprobe, die ebenfalls mittels PCR analysiert wurde (Sekundärprobe-PCR). In wenigen Fällen konnte postkulturell keine Blutkulturprobe entnommen werden. Bei diesen Proben fehlt das entsprechende Ergebnis. Wenn keine Sekundärprobe vorlag, ist dies ebenfalls durch einen Strich gekennzeichnet.

	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell-PCR		
gelb	negativ	positiv	negativ	UP-positiv	Universal-Primer zeigte ein Signal
grün	negativ	negativ	positiv	grüne Schrift	Übereinstimmung der Bakterien
türkis	positiv	negativ	negativ	blaue Schrift	Streptococcus spp.-Primer -Signal weist auf Streptokokken hin
pink	positiv	positiv	positiv, gleiche Bakterien wie in Blut-PCR	orange Schrift	Vorkommen der gleichen Gattung
khaki	positiv	UP-positiv	UP-positiv	Nicht farblich unterlegte Proben	Differenzen zwischen Blut-Kultur; Blut-PCR und Blut-postkulturell-PCR. Zum Teil Übereinstimmungen mit Sekundär-PCR
rot	negativ	negativ	negativ		
3_022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>		

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
1_001	negativ	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>Trachealsekret</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus sp.</i> UP-positiv
1_002	negativ	negativ	negativ	–
1_003	negativ	negativ	negativ	<b>Nasentupfer</b> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus sp.</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
				<i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
1_004	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	–
1_005	negativ	negativ	negativ	<b>Nasentupfer</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
1_006	negativ	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Clostridium difficile</i>	negativ	<b>Nasentupfer</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
1_007	negativ	negativ	negativ	<b>Nasentupfer</b> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv
1_008	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Actinobacillus equuli</i>	–

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
			<i>Listeria</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
1_009	negativ	negativ	negativ	–
1_010	negativ	UP-positiv	negativ	<b>Nasensekret</b> <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> <i>Streptococcus</i> sp. UP-positiv
1_011	negativ	<i>Staphylococcus aureus</i> UP-positiv	negativ	–
1_012	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	negativ	negativ	–
1_013	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp.	negativ	<b>Eiter</b> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Clostridium difficile</i>
1_014	negativ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	–
1_015	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus</i> sp.	<b>Nasentupfer</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
1_016	negativ	negativ	negativ	<b>Eiter</b> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Streptococcus equi</i> spp. <i>equi</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
				<i>Streptococcus</i> sp. <i>Clostridium difficile</i> UP-positiv
1_017	negativ	negativ	negativ	–
1_018	negativ	negativ	negativ	–
1_019	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Corynebacterium</i> sp.	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv	–
1_020	negativ	negativ	–	–
1_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–
1_022	negativ	negativ	UP-positiv	–
1_023	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> sp.	negativ	–
1_024	KNS( <i>Staphylococcus vitulinus</i> )	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv	<i>Streptococcus pneumniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv	–
1_025	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Listeria</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus</i> sp. UP-positiv	negativ	–
1_026	negativ	UP-positiv	negativ	<b>Nasensekret</b> <i>Streptococcus</i> sp.

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
				<i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
1_027	negativ	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv	negativ	–
1_028	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Clostridium difficile</i> UP-positiv	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–
1_029	negativ	negativ	negativ	–
1_030	negativ	UP-positiv	negativ	–
1_031	negativ	negativ	negativ	–
1_032	negativ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	–
1_033	negativ	negativ	<i>Proteus</i> sp.	–
1_034	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv	<i>Streptococcus</i> sp. UP-positiv	<b>Synovia</b> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus</i> sp. UP-positiv
1_035	negativ	<i>Proteus</i> sp.	negativ	–
1_036	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	–
1_037	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	<b>Präputiumtupfer</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv
1_038	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus</i> sp.	negativ	–

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
1_039	negativ	negativ	negativ	–
1_040	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativ	–
1_041	negativ	UP-positiv	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	–
1_042	<i>Acinetobacter</i> sp. KNS	negativ	negativ	–
1_043	negativ	negativ	negativ	–
1_044	negativ	negativ	negativ	<b>Synovia</b> negativ
1_045	negativ	negativ	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> UP-positiv	–
1_046	negativ	negativ	negativ	–
1_047	negativ	negativ	negativ	–
1_048	negativ	negativ	negativ	–
3_001	negativ	negativ	negativ	<b>Uterussekret</b> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Streptococcus equi</i> spp. <i>equi</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>E. coli</i> UP-positiv
3_002	<i>Staphylococcus xylosus</i> MSS	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv	<b>Kot</b> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
3_003	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus equi</i> spp. <i>equi</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>Kot</b> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
3_004	negativ	negativ	negativ	<b>Synovia</b> <i>Actinobacillus equuli</i> UP-positiv
3_005	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp.	negativ	–
3_006	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus</i> sp. UP-positiv	–
3_007	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> UP-positiv	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> UP-positiv	–
3_008	negativ	negativ	negativ	–
3_009	negativ	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<b>Kot</b> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>E. coli</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
				UP-positiv
3_010	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	<b>Synovia</b> <i>Actinobacillus equuli</i> UP-positiv
3_011	negativ	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	<b>Bauchhöhlenflüssigkeit</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> <i>E. coli</i> UP
3_012	negativ	negativ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>Bauchhöhlenflüssigkeit</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp. UP-positiv
3_014	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	negativ	negativ	–
3_015	<i>Pantonea</i> sp. (Nnp)	negativ	negativ	–
3_016	negativ	UP-positiv	negativ	<b>Bauchhöhlenflüssigkeit</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Clostridium difficile</i> UP-positiv
3_017	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	negativ	negativ	–
3_018	negativ	negativ	negativ	–



Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
3_019	negativ	negativ	negativ	–
3_020	negativ	negativ	negativ	–
3_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>	<i>Proteus sp.</i>	<b>Synovia</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
3_022	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> UP-positiv	–
3_023	<i>Staphylococcus warneri</i>	negativ	negativ	–
3_024	negativ	negativ	negativ	–
4_001	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	–
4_002	negativ	<i>Streptococcus sp.</i> UP-positiv	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	–
6_001	negativ	negativ	–	–
6_002	negativ	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> UP-positiv	<b>Trachealsekret</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
6_003	negativ	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>	–
6_004	negativ	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
6_005	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	negativ	–

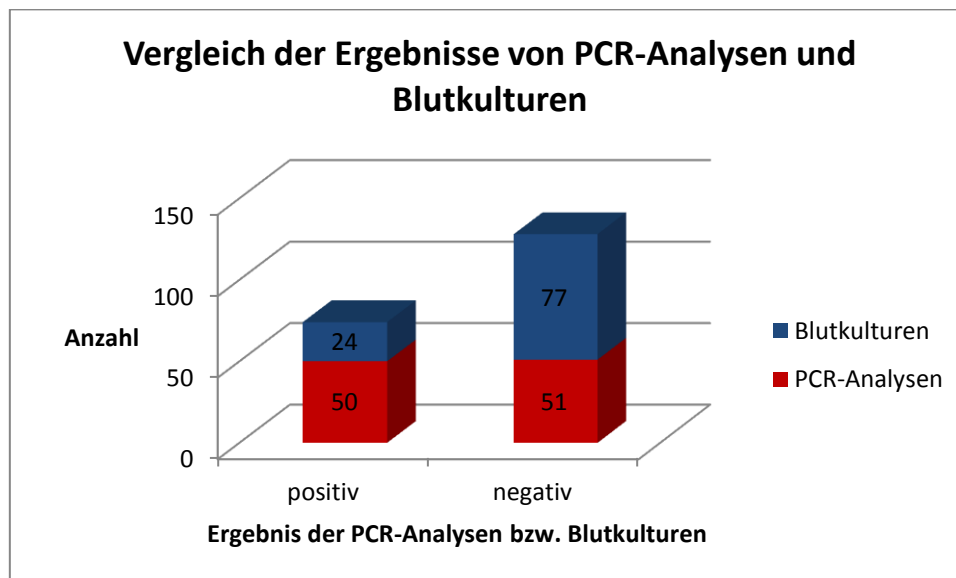
Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
6_006	negativ	negativ	negativ	–
6_008	negativ	UP-positiv	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–
6_009	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>	negativ	–
6_015	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus equi ssp. equi</i>	negativ	<b>Eiter</b> <i>Streptococcus equi ssp. equi</i> <i>Streptococcus sp.</i> UP-positiv
6_016	negativ	negativ	negativ	–
6_017	vergrünende Streptokokken KNS <i>Staphylococcus sp.</i>	negativ	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP	–
6_018	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus sp.</i> UP-positiv	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv	<b>Tupfer von Bronchoskopie</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
6_022	negativ	<i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> UP-positiv	negativ	–
6_023	negativ	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	<b>Nasentupfer</b> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Actinobacillus equuli</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
6_024	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	–
6_025	<i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i>	negativ	negativ	–
6_029	negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	–
6_030	<i>Acinetobacter sp.</i>	negativ	UP-positiv	–
6_031	negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativ	–
6_032	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Proteus sp.</i>	negativ	<b>Nasentupfer</b> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>E. coli</i> UP-positiv
6_036	negativ	negativ	negativ	–
6_037	negativ	negativ	negativ	–
6_038	negativ	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	–
6_040	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>	negativ	–
6_043	vergrünende Streptokokken <i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i>	UP-positiv	–

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Blut-postkulturell PCR	Sekundärprobe-PCR
	<i>Clostridium clostridiiforme</i>			
6_044	negativ	negativ	negativ	–
6_045	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> UP-positiv	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	–
7_001	negativ	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–

## 8 Vergleich der Untersuchungsergebnisse von PCR-Blutanalysen und Blutkulturen

Fünfundzig der insgesamt 101 Blutproben, die mittels PCR untersucht wurden (PCR-Blutproben), erwiesen sich als positiv. Das heißt es wurden ein oder mehrere Erreger detektiert. Die Mehrheit (77 Blutkulturen) der insgesamt 101 parallel zu den PCR-Analysen angelegten Blutkulturen waren negativ.



**Abbildung 5:** Vergleich der Ergebnisse von PCR-Analysen und Blutkulturen  
50 PCR-Blutanalysen (rot) und 24 Blutkulturen (blau) waren positiv.

Von den 51 Blutkulturen, die parallel zu den negativen PCR-Analysen angelegt wurden, zeigten zehn ein Wachstum. Der Vergleich der negativen Blutkulturen (77 Blutkulturen) mit den zugehörigen PCR-Blutproben ergab mehr positive Ergebnisse für die molekulardiagnostische Methode. Sechsendreißig PCR-Blutanalysen waren trotz negativer Blutkultur positiv. Bei 41 Proben stimmten Blutkultur und PCR-Blutproben in ihrem negativen Ergebnis überein.

Die zu den 50 positiven PCR-Blutproben angelegten Blutkulturen zeigten in 36 Fällen kein Wachstum. Auch hier wurden mehr positive Ergebnisse mit einer PCR erreicht.

Von 24 positiven Blutkulturen waren 14 parallel dazu durchgeführte PCR-Blutanalysen ebenfalls positiv. Bei den restlichen 10 PCR-Blutproben wurden keine Keime detektiert.

**Tabelle 21:** PCR Ergebnisse vs. Blutkultur-Ergebnisse

Mit BK-positiv bzw. PCR-positiv wurden positive und mit BK-negativ bzw. PCR-negativ wurden negative Blutkultur bzw. PCR-Ergebnisse bezeichnet.

Negative PCRs: 51		Positive PCRs: 50		Negative BKs: 77		Positive BKs: 24	
BK - positiv	BK- negativ	BK - positiv	BK- negativ	PCR- positiv	PCR- negativ	PCR- positiv	PCR- negativ
10	41	14	36	36	41	14	10

Einundvierzig PCR-Blutanalysen und Blutkulturen stimmten in ihrem negativen Ergebnis und 14 in ihrem positiven Ergebnis überein. Somit zeigte die Mehrheit der Ergebnisse (54,5 % = 55 Fälle) eine Übereinstimmung.

## 9 Überprüfung der Primer-Spezifität

Die Proben wurden hinsichtlich des Vorkommens von 18 Bakterienarten untersucht. Ein Universal-Primer wurde als unspezifischer Primer für die Detektion einer Vielzahl an bakteriellen Spezies definiert. Ein daraus resultierendes positives Signal gab keine Auskunft über die Art des detektierten Erregers. Das Signal zeigte nur das Vorhandensein eines Mikroorganismus in der Probe an. Alle Primer (Anhang 4) wurden, wie in III Abschnitt 9.1 beschrieben, für diese Studie entwickelt. Bei der Entwicklung wurde auf eine möglichst hohe Spezifität der Primer geachtet. Die Primer wurden wie beschrieben gegen die NCBI Datenbank verglichen. Dabei wurden bei einigen Primerpaaren Besonderheiten festgestellt.

Die Primer A.equuli+suis\_620\_F und A.equuli+suis\_813\_R amplifizierten sowohl das Bakterium *Actinobacillus equuli* als auch den nahen Verwandten *Actinobacillus suis*. Der Primer wurde trotzdem weiterhin als spezifisch für *Actinobacillus equuli* gewertet.

Die Primer Entero\_895\_F und Entero\_1457\_R amplifizierten laut Datenbank zusätzlich zu dem gewünschten Bakterium *Enterobacter cloacae* auch *Enterobacter sp.* und *Klebsiella pneumoniae*. Da die Vortests aber zeigten, dass das Primerpaar DNA von *Klebsiella pneumoniae* nicht amplifizierte, wird im weiteren Verlauf von *Enterobacter cloacae* gesprochen.

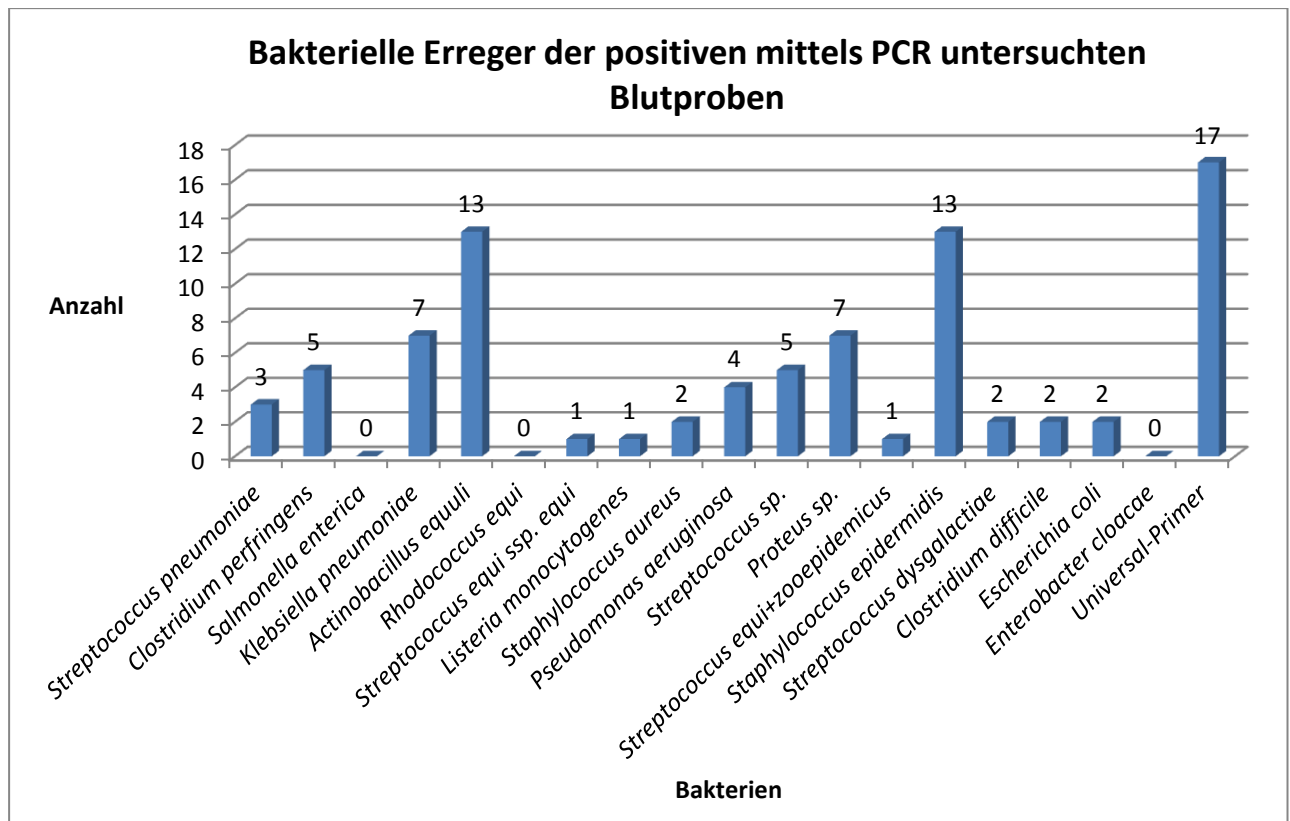
Die Primer Listeria sp.\_481\_F und Listeria sp.\_770\_R wurden als Genus-Primer entwickelt und sind laut Primer BLAST aber spezifisch für *Listeria monocytogenes*. Aus diesem Grund

wird im Folgenden bei einem positiven Signal der beiden Primer von *Listeria monocytogenes* gesprochen.

Die Primer Strep\_equi\_608\_F und Strep\_equi\_894\_R sind spezifisch für *Streptococcus equi* und amplifizieren DNA beider Subspezies *Streptococcus equi* ssp. *equi* und *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. Zur Differenzierung der beiden Subspezies wurde zusätzlich das Primerpaar Sequiequi\_158\_F und Sequi\_435\_R verwendet, das spezifisch nur mit *Streptococcus equi* ssp. *equi*-DNA reagiert. Somit wurde das Vorkommen von *Streptococcus equi* ssp. *equi* durch beide Primerpaare angezeigt. Ein alleiniges positives Signal des Primerpaars für *Streptococcus equi* ssp. *equi* oder *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (Strep\_equi\_608\_F und Strep\_equi\_894\_R) bedeutete, dass in der Probe *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* vorlag. Es gab jedoch Ausnahmen, in denen nur die Primerpaare für *Streptococcus equi* ssp. *equi* ein Signal aufwiesen. Hier wurde dann das Vorliegen von *Streptococcus equi* ssp. *equi* in der Probe gewertet.

## 10 Bakterielle Erreger der positiven PCR-Blutproben

Die 18 bakteriellen Erreger kamen in unterschiedlicher Häufigkeit in der Studie vor. Am häufigsten wurden *Actinobacillus equuli* und *Staphylococcus epidermidis* detektiert (jeweils in 13 Proben), gefolgt von *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus* sp., die siebenmal vorkamen. Fünfmal wurden *Clostridium perfringens* und *Streptococcus* sp. detektiert. *Pseudomonas aeruginosa* kam viermal und *Streptococcus pneumoniae* dreimal vor. Jeweils zweimal wurden *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Clostridium difficile* und *Escherichia coli* in den positiven PCR-Blutproben festgestellt. *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Listeria monocytogenes* und *Streptococcus equi* ssp. *equi* und/oder *zooepidemicus* kamen jeweils einmal in den Proben vor. Bei genauer Differenzierung wurde festgestellt, dass *Streptococcus equi* ssp. *equi* und *Strep. equi* ssp. *zooepidemicus* jeweils einmal detektiert wurden. *Salmonella enterica*, *Rhodococcus equi* und *Enterobacter cloacae* kamen in den PCR-Blutproben nicht vor.



**Abbildung 6:** Bakterielle Erreger der positiven mittels PCR untersuchten Blutproben  
Art und Anzahl der in den positiven PCR-Blutproben identifizierte Mikroorganismen

### 10.1 Anzahl der detektierten Erreger pro positiver PCR-Blutprobe

Die 50 positiven PCR-Blutanalysen variierten in der Anzahl der amplifizierten Analyten pro Probe. 26 Proben (52 %) wiesen einen Analyten, 14 Proben (28 %) zwei, drei Proben (6 %) drei und eine Probe (2 %) fünf positive Analyte auf. Bei weiteren sechs Proben (12 %) zeigte ausschließlich der Universal-Primer ein Signal an. PCR-Blutanalysen mit vier positiven Ergebnissen lagen in dieser Studie nicht vor.

Eine Übersicht welche Mikroorganismen wie oft allein oder zusammen mit anderen Keimen in den PCR-Blutproben vorkamen ist in Tabelle 22 aufgelistet.



**Tabelle 22:** Anzahl der Bakterienarten pro positiver PCR-Blutprobe

Bakterien	Anzahl der Bakterien positiver PCR-Proben	Zahl der Analyte				nur Universal-Primer
		ein	zwei	drei	fünf	
Insgesamt	68	26	14	3	1	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	1	2	0	0	
<i>Clostridium perfringens</i>	5	2	1	1	1	
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0	0	0	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	4	2	1	0	
<i>Actinobacillus equuli</i>	13	3	7	2	1	
<i>Rhodococcus equi</i>	0	0	0	0	0	
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i>	1	0	1	0	0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	0	0	1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	0	0	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	1	1	1	1	
<i>Streptococcus</i> sp.	5	2	2	0	1	
<i>Proteus</i> sp.	7	3	2	2	0	
<i>Streptococcus equi</i> +zooepidemicus	1	1	0	0	0	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	5	7	1	0	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	1	1	0	0	
<i>Clostridium difficile</i>	2	0	2	0	0	
<i>Escherichia coli</i>	2	1	0	1	0	
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	
Universal-Primer	17	6	3	1	1	6

## 11 Positive Blutkulturen

Insgesamt wurde in 24 Blutkulturen ein Wachstum festgestellt (Abbildung 5). Einundzwanzig verschiedene Bakterienarten kamen vor. Der Großteil (76,2 %) gehörte zu den grampositiven Bakterien, dagegen wurden nur fünf gramnegative Keime identifiziert. *Staphylococcus vitulinus* und *Acinetobacter* sp. kamen dreimal vor und waren somit in den Blutkulturen die

am häufigsten vorkommenden Bakterien. Zweimal wurden *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus xylosus* und vergrünende Streptokokken kultiviert. Ein Wachstum der restlichen Bakterienarten kam jeweils einmal vor.

**Tabelle 23:** Vorkommen und Anzahl der Bakterienarten der nicht sterilen Blutkulturen

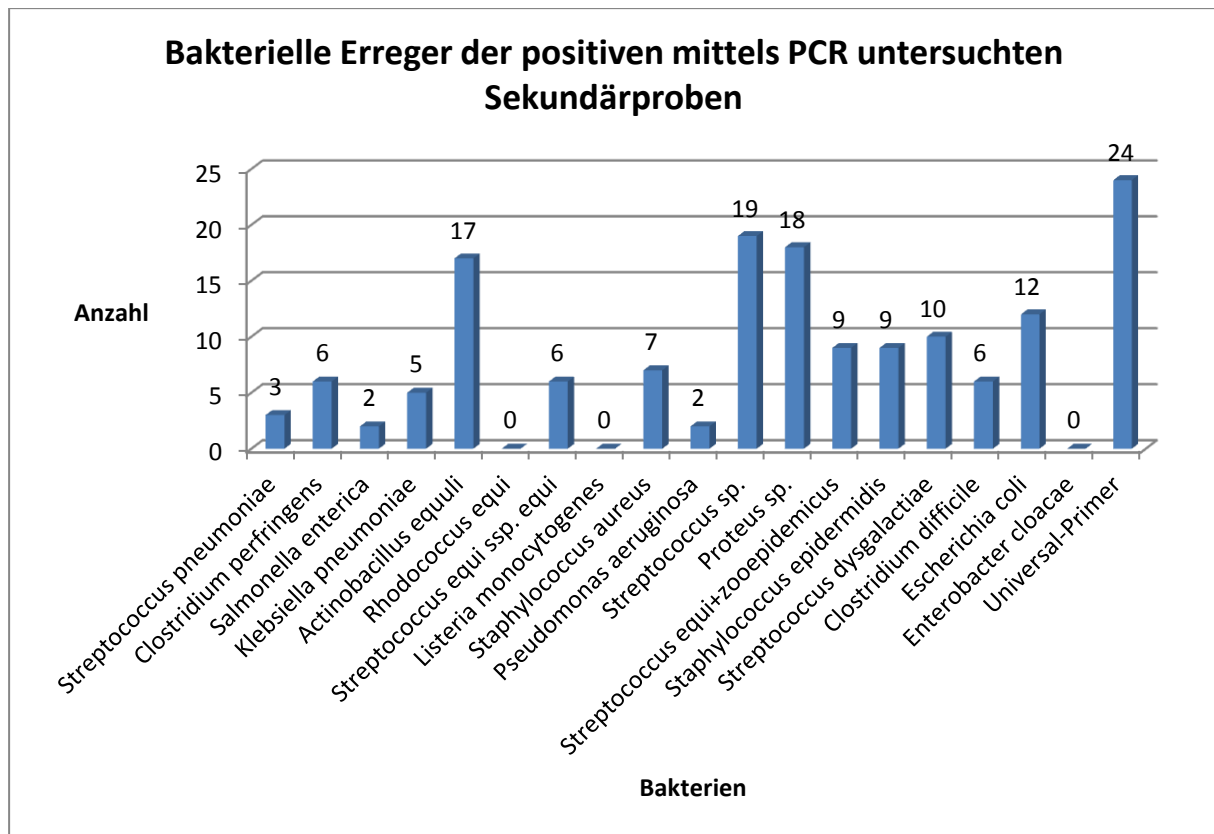
Bakterielle Erreger der nicht sterilen Blutkulturen		
Bakterien	Anzahl	Kontamination (K) / Pathogener (P)
<i>Aerococcus viridans</i>	1	K
<i>Bacillus</i> sp.	2	K
<i>Clostridium clostridiforme</i>	1	K
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	K
<i>Propionibacterium</i> sp.	1	K
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	P
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	K
<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	1	K
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	K/P
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	3	K
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	K
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	K
koagulasenegative Staphylokokken	1	K
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	1	P
<i>Streptococcus uberis</i>	1	P
vergrünende Streptokokken	2	K
<i>Acinetobacter</i> sp.	3	K
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	K
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	K
<i>Escherichia coli</i>	1	P
<i>Pantoea</i> sp.	1	K

Die Blutkulturen wiesen sowohl Mono- als auch Mischkulturen auf. Mit einer Anzahl von 21 kamen Monokulturen häufiger vor als Mischkulturen (3 Kulturen). Die 21 Monokulturen wiesen 17 unterschiedliche Keime auf. Die drei Mischkulturen enthielten sieben verschiedene Bakterienarten. Eine Mischkultur zeigte ein Wachstum von *Corynebacterium* sp. und *Staphylococcus xylosus*, eine andere von *Clostridium clostridiforme*, vergrünenden Streptokokken und *Acinetobacter* sp. und die dritte *Staphylococcus* sp., koagulasenegativen Staphylokokken und vergrünenden Streptokokken. Eine Übersicht der Bakterienarten der nicht sterilen Blutkulturen wird in Tabelle 23 gezeigt.

In den 10 positiven Blutkulturflaschen (Tabelle 21), deren zugehöriges PCR-Ergebnis negativ war, wuchsen zum Großteil Umweltkeime bzw. handelte es sich um Kontaminationen (*Corynebacterium* sp., *Staphylococcus hominis* spp. *hominis*; *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus vitulinus*, koagulasenegative Staphylokokken, vergründende Streptokokken, *Acinetobacter Iwoffii*, *Acinetobacter* sp., *Pantoea* spp.). Nicht als Kontamination zählte das Wachstum von *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* in einer Blutkultur. In den 14 positiven Blutkulturflaschen (Tabelle 21), deren zugehörige PCR-Blutproben ebenfalls positiv waren, wurden sowohl Umweltkeime bzw. Kontaminationen als auch pathogene Erreger kultiviert.

## 12 Bakterielle Erreger der positiven Sekundärproben

Wenn möglich, wurde zu jeder PCR-Blutprobe und Blutkulturflasche eine Sekundärprobe entnommen (III Abschnitt 6). Insgesamt wurden 28 Sekundärproben wie die Blutproben verarbeitet und mit der identischen Multiplex-PCR untersucht. Das Signal des Universal-Primers war mit einem Vorkommen in 24 Sekundärproben das am häufigsten vorkommende Signal. Als häufigster Erreger der Sekundärproben wurde *Streptococcus* sp. in 19 Proben detektiert. Ebenso waren die Bakterien *Proteus* sp. mit einem Vorkommen in 18 Proben und *Actinobacillus equuli* in 17 Proben häufige Vertreter. *Escherichia coli* wurde in 12, *Streptococcus dysgalactiae* in 10 und *Streptococcus equi* ssp. *equi* und/oder *zooepidemicus* und *Staphylococcus epidermidis* in jeweils neun Sekundärproben detektiert. Siebenmal wurde *Staphylococcus aureus* detektiert. *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile* wurden beide wie auch *Streptococcus equi* ssp. *equi* sechsmal identifiziert. *Klebsiella pneumoniae* kam in fünf Proben vor. In drei Proben kam *Streptococcus pneumoniae* vor. *Salmonella enterica* und *Pseudomonas aeruginosa* waren in zwei Proben vorhanden. *Rhodococcus equi* und *Enterobacter cloacae* kamen, wie auch in den Blutproben nicht vor. *Listeria monocytogenes*, der bei den Blutproben einmal vorkam, war in den Sekundärproben nicht zu amplifizieren. Bei genauer Differenzierung kam *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* fünf Mal und *Streptococcus equi* ssp. *equi* sechs Mal vor.



**Abbildung 7:** Bakterielle Erreger der positiven Sekundärproben, die mittels einer PCR-Analyse untersucht wurden.

### 12.1 Anzahl der detektierten Erreger pro positiver Sekundärprobe

Von insgesamt 28 Sekundärproben war nur eine Probe negativ. Die restlichen 27 Proben waren mit einer unterschiedlichen Anzahl an Analyten positiv. Am häufigsten waren zwei und fünf Erregern in den Sekundärproben zu finden (jeweils fünfmal), gefolgt von vier Proben mit je sechs Erregern. Bei jeweils drei Proben kamen drei bzw. acht Erreger vor. Zweimal wiesen die Sekundärproben einen oder sieben Analyte auf. Jeweils einmal kamen die Ergebnisse mit vier, neun bzw. zehn Erregern vor. Tabelle 37 enthält eine Übersicht der Ergebnisse.

## 13 Gegenüberstellung der PCR-Blutanalysen und der Blutkulturen

In 55 Fällen stimmten die PCR-Blutanalysen und die Blutkulturen bezüglich ihrer negativen oder positiven Ergebnisse überein (Tabelle 21). Jedoch wurden nicht immer die gleichen Mikroorganismen detektiert. In 42 Fällen war die Übereinstimmung eindeutig. Diese setzten sich aus 41 negativen PCR-Blutproben bzw. sterilen Blutkulturflaschen und einer positiven

PCR-Blutprobe bzw. nicht sterilen Blutkultur (*E. coli*) zusammen (Tabelle 20). In weiteren 13 Fällen zeigten sowohl die PCR-Blutanalysen als auch die Blutkulturen positive Ergebnisse, jedoch mit unterschiedlichen Mikroorganismen (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Detektierte Mikroorganismen in positiven PCR-Blutanalysen bzw. nicht sterilen Blutkulturen

Vergleich der bakteriellen Erreger der PCR-Blutproben bzw. Blutkulturen, wenn beide Methoden positive Ergebnisse ergaben. Ausschnitt aus Tabelle 20

UP-positiv = Universal-Primer zeigte ein Signal

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR
1_024	KNS ( <i>Staphylococcus vitulinus</i> )	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv
1_028	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Clostridium difficile</i> UP-positiv
1_034	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> UP-positiv
3_002	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3_005	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp.
3_006	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
3_007	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp. <i>E. coli</i>
4_001	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6_005	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
6_018	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus</i> sp. UP-positiv
6_024	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6_032	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Proteus</i> sp.
6_043	<i>Acinetobacter</i> sp. Vergrünende Streptokokken <i>Clostridium clostridiforme</i>	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i>

In 46 Fällen stimmten die positiven bzw. negativen Ergebnisse der PCR-Blutanalysen und der Blutkulturflaschen nicht überein (Tabelle 21). Bei 30 Proben wurden in der PCR-Blutprobe ein oder mehrere Bakterien detektiert. Die parallel dazu angelegten Blutkulturen waren negativ (Tabelle 38). Bei zehn Proben lagen negative PCR-Blutanalysen und positive Blutkulturen vor (Tabelle 25). Davon zählten zwei Proben zu denen der Kontrollgruppen (siehe V Abschnitt 6). Die Erreger, die in den Blutkulturen kultiviert wurden, waren zum Großteil Hautkeime oder Kontaminationen. Eine Ausnahme bildete der in Probe 6\_025

kultivierte *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*. Dieser gilt als pathogener Keim.

**Tabelle 25:** Detektierte Mikroorganismen in positiven Blutkulturen vs. negativer PCR-Blutanalysen  
Bei 10 Proben wurde trotz eines negativen PCR-Ergebnisses der Blutproben ein Wachstum in der Blutkultur festgestellt. Ausschnitt aus Tabelle 20

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR	Anmerkung
1_012	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>hominis</i>	negativ	Probe der Kontrollgruppe
1_019	<i>Staphylococcus xylosum</i>	negativ	Probe der Kontrollgruppe
1_042	<i>Acinetobacter</i> sp. KNS	negativ	
3_014	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	negativ	
3_015	<i>Pantoea</i> sp. Nnp	negativ	
3_017	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	negativ	
3_023	<i>Staphylococcus warneri</i>	negativ	
6_017	Vergrünende Streptokokken KNS <i>Staphylococcus</i> sp.	negativ	
6_025	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	negativ	
6_030	<i>Acinetobacter</i> sp.	negativ	

Bei sechs Proben, die sich in ihren Ergebnissen unterschieden, zeigte der Universal-Primer in der PCR-Blutanalyse ein Signal (Tabelle 20: Proben 1\_010; 1\_026; 1\_030; 1\_041; 3\_016; 6\_008). In der Probe befand sich somit ein Mikroorganismus, welcher nicht durch die spezifischen Primerpaare des Panels detektiert werden konnte. Die Proben wurden als positiv gewertet. Die Ergebnisse der parallel beimpften Blutkulturen waren negativ.

## 14 Gegenüberstellung der PCR-Blutanalysen und der Blutkulturen bei vorbehandelten Pferden

Wie in V Abschnitt 5 erwähnt, wurden 28 Pferde mit einem oder mehreren Antibiotika vorbehandelt. Drei Pferde konnten nicht eindeutig in die Gruppe der vorbehandelten oder nicht vorbehandelten Pferde eingestuft werden. Dem Rest (70 Pferde) wurde vor Blutentnahme kein Antibiotikum verabreicht.

Sechzehn PCR-Blutanalysen der 28 vorbehandelten Pferde zeigten trotz Vorbehandlung ein positives Ergebnis. In 24 der 28 Blutkulturen konnte kein Wachstum festgestellt werden (negativ). In den vier positiven Blutkulturen wurde in drei Fällen ein Wachstum von

Hautkeimen festgestellt. Zwei der dazugehörigen PCR-Blutproben waren ebenfalls positiv. Hier wurden ein Hautkeim und ein pathogener Mikroorganismus detektiert. Die dritte PCR-Blutanalyse wies ein negatives Ergebnis auf. Im Fall der vierten positiven Blutkultur lag ein pathogener Mikroorganismus vor. Die zugehörige PCR-Blutanalyse wies einen Hautkeim auf.

**Tabelle 26:** Vergleich der Ergebnisse der PCR-Blutanalysen mit denen der Blutkulturen vorbehandelter Pferde. Ausschnitt aus Tabelle 20

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR
1_013	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus</i> sp.
1_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_027	negativ	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv
3_003	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>
3_009	negativ	<i>Streptococcus</i> sp.
3_010	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
3_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>
4_002	negativ	<i>Streptococcus</i> sp. UP-positiv
6_008	negativ	UP-positiv
6_015	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i>
6_022	negativ	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zoepidemicus</i> UP-positiv
6_040	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>
6_045	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> UP-positiv
1_003	negativ	negativ
1_016	negativ	negativ
3_001	negativ	negativ
3_008	negativ	negativ
3_011	negativ	negativ
3_012	negativ	negativ
3_018	negativ	negativ
3_020	negativ	negativ
6_003	negativ	negativ
6_036	negativ	negativ
6_044	negativ	negativ
3_002	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4_001	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR
	<i>aureus</i>	
6_024	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3_015	<i>Pantoea</i> sp.	negativ
Pferde, die weder als vorbehandelt noch als nicht vorbehandelt eingestuft werden konnten		
1_010	negativ	UP-positiv
6_001	negativ	negativ
6_017	Vergrünende Streptokokken, KNS	negativ

Die drei Proben, die als unsicher, also weder als vorbehandelt noch als nicht vorbehandelt eingestuft wurden, wiesen jeweils zwei negative und jeweils ein positives PCR- und Blutkultur-Ergebnis auf. In der positiven Blutkultur, deren PCR-Untersuchung negativ war, lag ein Wachtsum von Hautkeimen vor. In der positiven PCR-Untersuchung wurde ein Signal des Universal Primers nachgewiesen. Die parallel angelegte Blutkultur war negativ. Die Blutprobe des dritten Pferdes, das als unsicher vorbehandelt eingestuft wurde, wies sowohl in der PCR-Analyse als auch in der Blutkultur ein negatives Ergebnis auf (Tabelle 26).

Siebzig Proben stammten von Pferden, die vor der Blutentnahme nicht vorbehandelt waren. Hier wiesen 29 Proben sowohl in der PCR als auch in der Blutkultur ein negatives Ergebnis auf. Weitere acht Proben zeigten ebenfalls ein negatives Ergebnis in der PCR-Untersuchung, in der Blutkultur war jedoch ein Erregerwachstum zu finden. Elf Proben von nicht vorbehandelten Pferden wiesen in der PCR und in der Blutkultur ein positives Ergebnis auf. Im Gegensatz dazu gab es 22 Proben, die ein positives Ergebnis PCR-Ergebnis zeigten, die Blutkultur jedoch negativ war (Tabelle 39).

Beim Vergleich der Ergebnisse der PCR-Blutproben und der Blutkulturen wurde sichtbar, dass mit der PCR-Untersuchung trotz Vorbehandlung häufiger ein positives Ergebnis erzielt wurde als mit der Blutkultur (Tabelle 27).



**Tabelle 27:** Vergleich der Ergebnisse der PCR-Blutproben und Blutkulturen vorbehandelter und nicht vorbehandelter Pferde

	PCR-positiv	PCR-negativ	Blutkultur-positiv	Blutkultur-negativ
Vorbehandelt	16 (57,1 %)	12 (42,9 %)	4 (14,3 %)	24 (85,7 %)
Nicht vorbehandelt	33 (47,1 %)	37 (52,9 %)	19 (27,1 %)	51 (72,9 %)
unsicher	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)

## 15 Gegenüberstellung von Blut- und Sekundärproben

Sechzehn von 28 mittels PCR untersuchten Sekundärproben enthielten unter Anderem identische Mikroorganismen wie die zugehörigen PCR-Blutproben (Tabelle 20). In der Probe 6\_018 zeigten *Proteus sp.* und der Universal-Primer in der PCR-Blutprobe wie auch in der Sekundärprobe ein Signal. Die Sekundärprobe wies insgesamt neun Erreger auf, welche nicht alle im Blut vorkamen. Die Blutkultur zu 6\_018 zeigte ein Wachstum von *Staphylococcus aureus*, der ebenfalls in der Sekundärprobe vorkam. Zwei weitere Erreger, *Bacillus sp.* und *Burkholderia cepacia*, die in weiteren Blutkulturen vorkamen, konnten, da sie nicht Bestandteil des Panels waren, in den PCRs der Blut- und Sekundärprobe nicht nachgewiesen werden. In der PCR-Blutprobe 1\_034 (*Bacillus sp.*) zeigte jedoch der Universal-Primer ein positives Signal. In der Probe 6\_032 (*Burkholderia cepacia*) wurde gleichzeitig in der PCR der Blut- und Sekundärprobe *Proteus sp.* detektiert. In den restlichen Proben wurden bakterielle Erreger identifiziert, die sowohl in der PCR-Blutprobe als auch in der Sekundärprobe vorkamen. Die Übereinstimmung ist in Tabelle 20 durch eine grüne Schrift gekennzeichnet. Die parallel angelegten Blutkulturen zeigten kein Wachstum.

Elf Sekundärproben stimmten nicht mit ihren PCR-Blutanalysen überein. Zehn der PCR-Blutanalysen wiesen ein negatives Ergebnis auf, wohingegen in den Sekundärproben Erregern detektiert wurden (siehe Tabelle 20). Bei Probe 3\_002 zeigte die PCR-Blutprobe ein positives Ergebnis mit *Staphylococcus epidermidis*. In der parallel angelegten Blutkulturflasche wurde das Wachstum von *Staphylococcus xylosus* festgestellt. In der Sekundärprobe wurde keiner der beiden Keime detektiert. Aufgrund der schlechten Datenlage für *Staphylococcus xylosus* kann keine Aussage über eine mögliche Kreuzreaktion des *Staphylococcus epidermidis* Primers mit *Staphylococcus xylosus* gemacht werden.

Eine Sekundärprobe (1\_044) wies ein negatives Ergebnis auf. Weiterhin konnten weder in der Blutkultur ein Wachstum noch in der PCR-Blutprobe oder der postkulturellen PCR-Untersuchung ein Keim detektiert werden.

## 16 Vorkommen von *Staphylococcus epidermidis*

Wie im Literaturteil beschrieben (II Abschnitt 1.2.2.2) wird *Staphylococcus epidermidis* hauptsächlich von der Haut des Menschen isoliert (Kloos et al. 1976; Busscher et al. 2006). In der Regel zählt er zu den Kontaminationskeimen (Freeman et al. 2009).

In dieser Studie wurde *Staphylococcus epidermidis* in 22 Proben identifiziert, davon waren 13 PCR-Blutproben und neun Sekundärproben. In 17 der 22 Proben kamen neben *Staphylococcus epidermidis* weitere Organismen vor. In den verbleibenden fünf Proben wurde nur das *Staphylococcus epidermidis* Signal positiv. Aufgrund des Vorkommens eines bekannten Erregers wurden diese Proben als positiv gewertet. Jedoch handelte es sich, wie schon oben erwähnt, wahrscheinlich um eine Kontamination. Proben, in denen nur *Staphylococcus epidermidis* als Erreger vorkam (5 Proben), waren ausschließlich Blutproben, die mittels PCR untersucht wurden.

## 17 Nachtests der postkulturell entnommenen Blutkulturproben

Von den Blutkulturflaschen wurden, wie in III Abschnitt 7.2 beschrieben, nach Abschluss der Kultivierung Aliquots entnommen, um sie anschließend mit dem Multiplex-PCR-Panel zu testen. Es war nur möglich von 98 der 101 Blutkulturflaschen ein Aliquot zu entnehmen. Bei einer Gegenüberstellung der Ergebnisse der PCR-Blutproben, der Blutkulturflaschen und der postkulturell entnommenen Blutkulturproben kamen Übereinstimmungen, Diskrepanzen und partielle Übereinstimmungen vor.

Bei 29 Proben war eine Übereinstimmung von PCR-Blutprobe, Blutkultur und postkultureller Blutkulturprobe zu sehen. Achtundzwanzig der übereinstimmenden Proben zeigten in der Blutkulturflasche kein Wachstum und die PCR-Blutprobe und das Blutkulturaliquot wiesen ein negatives Ergebnis auf (in Tabelle 20 rot markiert). In einer Probe (in Tabelle 20 Probe 3\_022) wurde in allen drei Untersuchungen *E. coli* nachgewiesen. Zusätzlich war im Blutkulturaliquot ein Signal des Universal Primers zu sehen.

Bei einem Großteil (53 Proben) der Proben gab es eine partielle Übereinstimmung. Entweder

stimmten das Ergebnis der Blutkultur und das Ergebnis der PCR-Analyse der Blutprobe bzw. des Blutkulturaliquots oder die PCR-Analyse der Blutprobe und des Blutkulturaliquots stimmten überein.

Fünfundzwanzig Proben (in Tabelle 20 **gelb** markiert) wiesen ein negatives Ergebnis der Blutkultur und deren mittels PCR untersuchten Aliquots auf. In den zugehörigen PCRs der Blutproben waren hingegen Keime zu detektieren. Bei elf Proben (in Tabelle 20 **grün** markiert) gab es eine Übereinstimmung zwischen Blutkultur und der PCR-Blutprobe. Beide waren negativ. Bei der PCR-Analyse der Blutkulturaliquots wurden jedoch Keime detektiert. In sieben weiteren Fällen (in Tabelle 20 **türkis** markiert) hatten sowohl die PCR-Analysen der Blutproben als auch die der Blutkulturaliquots ein negatives Ergebnis. Die Blutkultur zeigte in sechs Fällen ein Wachstum von Hautkeimen. In der übrigen Blutkulture wurde ein Pathogener isoliert. Die Bakterienarten, die in sechs weiteren PCR-Blutproben (in Tabelle 20 **pink** markiert) identifiziert wurden, wurden auch bei der PCR-Analyse der zugehörigen Blutkulturaliquots detektiert. Eine Besonderheit lag bei Probe 4\_001 vor. Hier wurde *Staphylococcus aureus* zusätzlich sowohl in der Blutkultur kultiviert als auch im mittels PCR untersuchten Blutkulturaliquot detektiert. Auch bei Probe 3\_007 wurde der in der Blutkultur gewachsene *Streptococcus uberis* in der PCR des Blutkulturaliquots durch den *Streptococcus* sp. Primer angezeigt. Bei zwei Proben (in Tabelle 20 **khaki** markiert) zeigte der Universal-Primer sowohl in der PCR-Analyse der Blutprobe als auch im Blutkulturaliquot ein Signal. Für Probe 6\_018 wurde zusätzlich in der Blutkultur und in deren Aliquot *Staphylococcus aureus* detektiert. Hier besteht die partielle Übereinstimmung zwischen Blutkultur und Aliquot und zwischen PCR-Blutprobe und Aliquot.

In der Blutkultur der Probe 6\_017 wurden unter anderem vergrünende Streptokokken kultiviert, welche in der PCR-Analyse des Blutkulturaliquots durch den *Streptococcus* sp. Primer wieder detektiert wurden. Die PCR-Blutprobe war negativ. Hier besteht die partielle Übereinstimmung zwischen der Blutkultur und der PCR des Blutkulturaliquots.

Neben anderen Mikroorganismen wurde in Probe 6\_043 ein Wachstum von *Clostridium clostridiforme* in der Blutkultur nachgewiesen. In der parallel dazu untersuchten PCR-Blutprobe wurde *Clostridium perfringens* detektiert. Das Aliquot wies ein Signal des Universal-Primers auf.

Sechzehn Proben zeigten keinerlei Übereinstimmung. Sie wichen in allen drei

Untersuchungen voneinander ab. Entweder wurden verschiedene Bakterienarten identifiziert oder eine Untersuchung war negativ während in den anderen beiden unterschiedliche Mikroorganismen gefunden wurden.

## 18 Signalhöhen bei der Auswertung der PCR-Proben

Die Signalhöhen in den PCR-Proben variierten bei Auswertung mit dem Bioanalyzer von Probe zu Probe. In vielen Fällen lagen geringe Signalhöhen der PCR-Blutproben vor. Trotzdem wurden diese als positives Ergebnis gewertet, wenn die mitgeführte Wasserprobe (Negativkontrolle) steril war oder in der Sekundärprobe der gleiche Mikroorganismus wie in der Blutprobe vorkam. Ab einer Signalhöhe von 5 nM wurde das Signal als eindeutig positiv angesehen. Bei allen Signalen, welche kleiner 5 nM waren, wurden verschiedene Aspekte für die Auswertung herangezogen. Zum einen kam es darauf an, welches Primerpaar ein Signal zeigte. Da *Staphylococcus epidermidis* als Hautkeim beim Menschen gilt wurde er in dieser Studie als Kontaminationsmarker angesehen und bei jedem Signal zwar als Kontamination aber als positiv gewertet. Auch der Universal-Primer wurde immer positiv gewertet, da dieses Primerpaar durchgängig kleine Signale lieferte. Außerdem wurden aufgrund des Krankheitsbildes eines Pferdes Schlüsse über die Signifikanz eines schwach positiven Ergebnisses gezogen.

In Probe 1\_006 wurde *Streptococcus dysgalactiae* aufgrund des hohen Signals in der Sekundärprobe in der zugehörigen Blutprobe als positiv gewertet. Der gleiche Fall trat bei Proben mit *Proteus* sp., *Actinobacillus equuli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* sp. und *Streptococcus equi* ssp. *equi* auf. In allen Proben lagen in den Sekundärproben eindeutige Signale vor, das heißt deutlich über einer Signalhöhe von 5 nM, so dass das Vorkommen der Bakterien in der Blutproben als positiv gewertet werden konnte. In einer Probe wurden aufgrund der parallelen Detektion in der Blut- und Sekundärprobe zwei Analyte als positiv gewertet (Probe 1\_013: *Clostridium perfringens* und *Actinobacillus equuli*). Auch die parallele Detektion des Universal-Primers und von *Staphylococcus epidermidis* führten, obwohl Signale des Universal-Primers und von *Staphylococcus epidermidis* immer positiv gewertet wurden, zu einer Bestätigung des Vorkommens in Proben.

**Tabelle 28:** Signalhöhen der PCR-Proben

Einige schwache PCR-Signale in Blutproben wurden durch das gleichzeitige Vorkommen in Primär- und Sekundärprobe bestätigt.

Probennummer	Primärprobe		Sekundärprobe	
	Primerpaar	Signalhöhe in nM	Primerpaar	Signalhöhe in nM
1_006	S.dysgalactiae_1018_F S.dysgalactiae_1317_R	0,7	S.dysgalactiae_1018_F S.dysgalactiae_1317_R	42,5
1_010	Universal_F Universal_R	0,4	Universal_F Universal_R	34,9
1_013	Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R	4,2	Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R	3,5
	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	7,5	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	12,7
	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	0,4	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	15,2
1_015	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	8,6	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	156,6
1_026	Universal_F Universal_R	0,5	Universal_F Universal_R	25,2
1_034	Universal_F Universal_R	0,5	Universal_F Universal_R	0,1
1_037	K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R	5,3	K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R	55,5
	S.epi_2171_F S.epi_2868_R	4,3	S.epi_2171_F S.epi_2868_R	3,6
3_003	Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R	7,5	Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R	147,1
3_009	Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	0,4	Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	87,4
3_010	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	0,6	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	61,2
3_016	Universal_F Universal_R	0,2	Universal_F Universal_R	0,2
3_021	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	1,3	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R	149,4
6_015	Sequiequi_158_F Sequi_435_R	0,2	Sequiequi_158_F Sequi_435_R	20,6
6_018	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	9,9	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	68,2
	Universal_F Universal_R	0,2	Universal_F Universal_R	17,3
6_023	Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	0,2	Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	22,4
6_032	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	4,9	Proteus_1851_F Proteus_2049_R	85,4

## VI Diskussion

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der molekulardiagnostischen Methode PCR mit dem kulturellen Erregernachweis durch Blutkulturen für die Analyse von Blutproben bei Pferden mit Verdacht auf eine systemische Infektion.

Blutkulturen sind in der Veterinärmedizin eine wichtige Methode zur Diagnose einer Sepsis (Taylor et al. 2001). Die Blutkultur wird als „Goldstandard“ beschrieben (Pusterla et al. 2009). Aufgrund der systembedingt langen Inkubationszeit von mindestens 12 bis 48 Stunden (Lucignano et al. 2011) ist die Blutkultur im Praxis- und Klinikalltag jedoch nicht sehr praktikabel. Vor allem im Bereich der Fohlenmedizin sind schnelle Entscheidungen für die weitere Behandlung essentiell. Hierzu kann die Untersuchung des Blutes mit Hilfe einer Blutkultur oft nicht beitragen.

Die PCR als molekulardiagnostische Methode ist wesentlich weniger zeitaufwendig, da keine Anzucht der Pathogene nötig ist, sondern die in der nativen Probe vorhandene DNA für den Nachweis der Erreger verwendet wird. Mit Hilfe von spezifischen Primer-Paaren findet eine direkte Detektion der Zielpathogene statt (Anthony et al. 2000). Durch die selektive Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte können auch geringe Mengen pathogener Keime detektiert werden (Rudolph et al. 1993). Aus diesem Grund beträgt die Zeit bis zum Vorliegen eines Ergebnisses nur wenige Stunden (Dierkes et al. 2009). Laut Hollis et al. (2008) führt dies zu einer Verbesserung der adäquaten Therapie und einer höheren Überlebensrate im Fall der Sepsis.

### 1 Gegenüberstellung der PCR- und Blutkulturergebnisse

In dieser Studie war das Ziel die Ergebnisse des Blutkultursystems Signal-Oxoid mit den Ergebnissen einer end-point Multiplex-PCR zu vergleichen.

Beide Methoden wiesen bei 41 Blutproben (40,6 %) übereinstimmend ein negatives Ergebnis auf. Allerdings konnte nur bei einer einzigen positiven Probe eine Übereinstimmung eines Erregers gefunden werden. Diese Probe zeigte in der Blutkultur ein Wachstum von *Escherichia coli*, welcher ebenfalls mittels PCR detektiert wurde. Diese Blutprobe stammte von einem septischen Fohlen.

Weitere 12,9 % (13 Proben) der Proben zeigten mit beiden Methoden ein positives Ergebnis, jedoch nicht die gleichen Mikroorganismen. Ein Grund hierfür ist, dass die Ergebnisse der Blutkultur zumeist als Hautkeime identifiziert wurden und keine krankheitsrelevanten Erreger zeigten. Anhand dieser Ergebnisse wird sichtbar, dass eine Übereinstimmung zwischen Blutkultur und PCR-Untersuchung gering ist. Die Übereinstimmung von positiven und negativen Ergebnissen zwischen der end-point-Multiplex-PCR und der Signal Oxoid Flasche (54,5 %) ist mit anderen Studien nicht vergleichbar. Diese Studie weist eine geringere Übereinstimmung auf. In der Studie von Dierkes et al. (2009) beträgt die Übereinstimmung positiver und negativer Ergebnisse zwischen Blutkultur und PCR 77 %, was auch mit anderen Studien vergleichbar ist (Mancini et al. 2008; Louie et al. 2008).

Eine deutlich höhere Positivrate ist in der aktuellen Studie im Gegensatz zu den Blutkulturen bei den PCR-Untersuchungen zu sehen. Hier weisen 49,5 % der PCR-Blutproben ein positives Ergebnis auf. Hingegen konnte nur bei 23,8 % der Blutkulturen ein Wachstum festgestellt werden. Dies bedeutet, dass in dieser Studie mehr als doppelt so viele positive Ergebnisse mit Hilfe der PCR erzielt wurden, als mit der Blutkultur. Auch in einer Studie von Lucignano et al. (2011) wurden im Gegensatz zur Blutkultur durch die PCR-Untersuchung eine höhere Rate positiver Ergebnisse festgestellt. Bei den PCR-Untersuchungen wiesen 14,6 % im Gegensatz zu 10,3 % der Blutkulturen ein positives Ergebnis auf.

Diese Erkenntnisse spiegeln nochmal sehr deutlich die Vorteile einer PCR-Untersuchung wider. Die enorme Zeitersparnis, die geringe Menge an Vollblut, die zur Untersuchung eingesetzt werden muss und vor allem die hohe Sensitivität, die es ermöglicht geringe Mengen an Erreger-DNA aus Vollblut zu detektieren.

Wie bereits erwähnt, dienen Sekundärproben oftmals zur eindeutigen Auswertung der Primärproben. So stimmten 16 der 28 Sekundärproben mit den Ergebnissen ihrer Blutproben überein. Es konnten ein oder mehrere Mikroorganismen identifiziert werden, welche sowohl in der Blut- als auch in der Sekundärprobe vorhanden waren.

Dies zeigt, dass eine PCR-Untersuchung eine gute Möglichkeit ist, einen Infektionsherd zu bestimmen. Stimmen Blut- und Sekundärprobe beim detektierten Mikroorganismus überein, kann mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der ins Blut streuende Infektionsherd gefunden und der Erreger mit dem positiven PCR-Ergebnis identifiziert wurde (Peters et al. 2004).

## 2 Auswahl der Erreger

Die Auswahl der Erreger fand durch die Autorin basierend auf der Literatur-Recherche, mit der Einschränkung auf bakterielle Sepsiserreger, statt. Ein Augenmerk wurde auf solche Bakterienspezies gelegt, die bei Pferden als Krankheitserreger vorkommen und der Grund für ein septisches Geschehen sein können.

Der beim Menschen vorkommende Hautkeim *Staphylococcus epidermidis* wurde als Kontaminationskontrolle mit in die Studie einbezogen. Außerdem wurde *Enterobacter cloacae* eingeschlossen, obwohl er laut Literatur bei Pferden nicht vorkommt. Er ist ein wichtiger Verursacher von Atemwegserkrankungen, Sepsis, Meningitis und Harnwegsinfektionen bei Menschen sowie bei Frühgeborenen von nekrotischer Enterocolitis und vor allem bei immunsupprimierten Menschen von Wundinfektionen (Madigan et al. 2013; Hahn et al. 2009; Allocati et al. 2013). Dieser Erreger konnte auch in dieser Studie nicht bei Pferden detektiert werden, was die oben genannte Aussage bestätigt.

Laut einer Studie von Reef et al. (1989) ist *E. coli* bei Pferden der häufigste Sepsiserreger. Auch die nahe verwandten Salmonellen können ernsthafte Erkrankungen verursachen (Owen et al. 1979; Weese et al. 2001; Ward et al. 2005) und spielen im Zusammenhang mit Sepsis, besonders bei Fohlen und immunschwachen Tieren eine Rolle (Hahn et al. 2009). Weitere Bakterien, die in der Literatur bei Pferden mit einer Sepsis in Verbindung gebracht werden, sind *Actinobacillus equuli*, *Staphylococcus aureus* (Kolm et al. 2010), *Proteus* spp. (Pusterla et al. 2009) und in wenigen Fällen *Listeria monocytogenes* (Wallace et al. 1995; Wilkins et al. 2000). Außerdem wurden *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, verschiedene Streptokokken-Spezies, *Rhodococcus equi*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile* in die Studie einbezogen.

Die Auswahl der in die Studie eingeschlossenen Mikroorganismen stellt natürlich nur einen Teil der bei Pferden vorkommenden bakteriellen Pathogene dar.

In dieser Studie konnte kein Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* in der Blutkultur festgestellt werden. Mittels PCR wurde der Erreger jedoch insgesamt dreimal detektiert. Diese Überlegenheit gegenüber der Blutkultur, *Streptococcus pneumoniae* mit einer PCR nachzuweisen wird durch mehrere Studien bestätigt, in denen eine verbesserte Detektion von *Streptococcus pneumoniae* durch PCR gezeigt wurde (Zhang et al. 1995; Lorente et al.



2000; Wheeler et al. 2000).

Die für den Nachweis von *Actinobacillus equuli* entwickelte Primer, amplifizieren laut Primer-BLAST sowohl *Actinobacillus equuli* als auch *Actinobacillus suis*. *Actinobacillus suis* wird in der Literatur als ein opportunistischer Erreger von Schweinen und Pferden angegeben. Er ist Verursacher von Septikämien, Pneumonien und Arthritiden vor allem beim Schwein, kann aber beim Pferd ähnliche Erkrankungen hervorrufen (Peel et al. 1991). *Actinobacillus suis* ist phenotypisch und phenogenetisch sehr ähnlich zu *Actinobacillus equuli* (Bisgaard et al. 1984). Außerdem wurden bislang manche *Actinobacillus-equuli*-Stämme falsch identifiziert oder sogar als equine „*Actinobacillus suis*“ falsch benannt (Kuhnert et al. 2003; Benavente et al. 2012). Aus diesem Grund wurde in der Studie beim Vorkommen eines Signals des Primerpaars für *Actinobacillus equuli* und *Actinobacillus suis* nur von *Actinobacillus equuli* gesprochen und nicht weiter differenziert.

### 3 Vor- und Nachteile der Oxoid-Signal-Blutkultur

Die Oxoid-Signal-Blutkulturflasche ist ein Blutkultursystem, welches das Wachstum von aeroben, anaeroben und mikroaerophilen Mikroorganismen in einer Flasche unterstützt (Sawhney et al. 1986). Durch die Gasproduktion beim Wachstum von Mikroorganismen wird in der Flasche ein Überdruck erzeugt, welcher das Blut-Medium-Gemisch in die Signalkammer befördert. Dies gilt als optisches Signal für eine positive Blutkultur (Sawhney et al. 1986). Laut einer Studie von Schwabe et al. (1990) liegen die Vorteile der Oxoid-Signal-Blutkulturflasche in ihrer leichten Handhabung. Es wird kein zusätzliches Instrumentarium benötigt. Der Positivnachweis erfolgt durch ein leicht erkennbares optisches Signal und es wird nur eine Flasche benötigt. Weitere Vorteile sind die geringen Kontaminationsmöglichkeiten und das niedrige Detektionslimit (Sawhney et al. 1986).

Im Gegensatz zur PCR, bei der spezifisch nach bestimmten Analyten gesucht wird, kann in der Blutkultur im Rahmen der Möglichkeiten des jeweiligen Systems theoretisch alle kultivierbaren Organismen gefunden werden. Laut einer Studie von Sawhney et al. (1986) können im Oxoid-System viele verschiedenen Genera (*Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Legionelle*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Morganella*, *Neisseria* etc.) kultiviert

werden.

In der aktuellen Studie waren 75,9 % der in Blutkulturen detektierten Mikroorganismen grampositiv. Bei einem Vergleich des Oxoid-Signal-Blutkultursystems mit einer angereicherten Peptonboullion konnte in einer Studie von Himmelreich et al. (1989) auch ein erhöhter Anteil an positiven Ergebnissen bei grampositiven Mikroorganismen festgestellt werden. Koagulase-negative Staphylokokken, die als Kontaminanten gelten, bildeten dort einen Großteil der Gruppe der grampositiven Mikroorganismen. In der aktuellen Studie zählten 40,9 % der grampositiven Bakterien zu den koagulase-negativen Staphylokokken. Laut einer Studie von Wilson et al. (1988) kommen in der Oxoid-Signal-Blutkulturflasche sogar weniger koagulase-negative Staphylokokken vor als bei konventionellen Systemen, was mit dem Ergebnis dieser Studie zu vereinbaren ist.

Unter den 75,9 % grampositiven Mikroorganismen befanden sich zwei anaerobe (9 % *Clostridium clostridiforme* und *Propionibacterium* sp.) und ein aerobes bis fakultativ anaerobes (4,5 % *Corynebacterium* sp.) Bakterium. Alle drei gelten als Kontaminaten. Die Anzahl der Anaerobier wird auch in einer Studie von Fox et al. (1988) als gering beschrieben. Jedoch hat das System zuvor gezeigt, dass es in der Lage ist, klinisch wichtige Anaerobier zu detektieren (Sawhney et al. 1986; Fox et al. 1988). Eine andere Studie zeigte sehr gute Ergebnisse bei der Detektion von Anaerobiern im Gegensatz zu anderen Blutkultursystemen (Murray et al. 1988).

In dieser Studie waren 24,1 % der vorkommenden Mikroorganismen gramnegativ. Bei einer Evaluation des Signal-Blutkultursystems für die Kinderheilkunde wurde in mehreren Fällen ein verzögertes Signal bei gramnegativen Mikroorganismen beobachtet (Fox et al. 1988). Auch in der Studie von Daley et al. (1990) wird dieses Detektionsproblem erwähnt.

Limitierend für die Blutkultur ist die ausschließliche Detektion von vermehrungsfähigen Mikroorganismen. Bei Blutkulturen, die nach einer Antibiotikagabe angesetzt wurden, ist die Sensitivität deutlich herabgesetzt (McKenzie et al. 1987; Heininger et al. 1999; Glerant et al. 1999). Auch der hohe Zeitaufwand bis zum Vorliegen eines Ergebnisses ist ein wichtiger Limitierungsfaktor (Peters et al. 2004; Paolucci et al. 2010; Paolucci et al. 2010; Lucignano et al. 2011).

Wie die Ergebnisse der Blutkulturen in dieser Studie zeigen, ist die Blutkultur oft keine gute Möglichkeit, wichtige Pathogene zu identifizieren. Auch Peters et al. (2004) beschreibt die

Chance, wichtige Pathogene zu identifizieren, als Limitierungsgrund für die Blutkultur.

#### **4 Auswirkung der Vorbehandlung auf die Blutkultur oder PCR-Analyse**

Wie schon oben erwähnt, hat eine Vorbehandlung mit Antibiotika größere Auswirkungen auf das Ergebnis der Blutkultur als auf das der PCR. Nach einer antibiotischen Therapie ist der Erregernachweis mit Hilfe einer Blutkultur meist nur schwer oder nicht mehr möglich. In dem Blutkulturmedium ist dann kein oder nur ein sehr langsames Wachstum zu beobachten (Fuchs 2007). In einer Studie von Heininger et al. (1999) wurde *E.-coli*-DNA in Rattenblut mittels Blutkultur und PCR nachgewiesen. Vor der Antibiotikagabe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Blutkultur und PCR festgestellt werden. Nachdem den Ratten ein Antibiotikum (Cefotaxim) verabreicht wurde, war die Detektion von *E. coli* mittels PCR deutlich höher als mit Hilfe der Blutkultur. Somit wurde die Empfindlichkeit der Blutkultur nach Gabe des Antibiotikums deutlich herabgesetzt. Die geringere Effizienz der Blutkultur ist durch die Abtötung bzw. Hemmung der Mikroorganismen im Blut zu erklären.

Der richtige Abnahmezeitpunkt, das heißt vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie, ist deswegen beim Anlegen einer Blutkultur wichtig. Wenn eine antibiotische Behandlung besteht, ist darauf zu achten, dass die Blutentnahme entweder am Ende eines Antibiotikum-Dosierungsintervalls erfolgt oder nach einer Therapiepause (Hagel et al. 2013).

Da bei einer PCR die DNA der Mikroorganismus im Blut nachgewiesen wird, hat eine vorherige antibiotische Therapie nur geringe Auswirkung auf das Ergebnis. Die PCR ist unabhängig von der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien. Es zählt die Anwesenheit des Erregers im Blut, somit werden auch Mikroorganismen, die durch vorherige antibiotische Behandlung im Wachstum gehemmt oder abgetötet wurden, detektiert (Peters et al. 2004; Paolucci et al. 2010). Bereits eliminierte Mikroorganismen können nicht mehr detektiert werden.

Die PCR-Analysen der vorbehandelten Pferde zeigten neben *Staphylococcus epidermidis*, welcher hauptsächlich von der Haut des Menschen isoliert wird (Kloos et al. 1976; Busscher et al. 2006), positive Signale für erwartete Pathogene wie z.B. *Clostridium perfringens*, *Actinobacillus equuli*, *Proteus* sp., verschiedene Streptokokken oder *Klebsiella pneumoniae*.

Insgesamt wurde in der Studie gezeigt, dass die Blutkulturen eine geringere Positivrate als

die PCR-Untersuchungen aufweisen. Die Gegenüberstellung der PCR- und der Blutkultur-Ergebnisse vorbehandelter Pferde zeigte, dass eine antibiotische Vorbehandlung eine größere Auswirkung auf das Wachstum der Bakterien in einer Blutkultur hat. Beim Vergleich der Blutkulturen vorbehandelter Pferde mit denen nicht vorbehandelter Pferde wurde ebenfalls deutlich, dass eine antibiotische Vorbehandlung häufiger zu negativen Blutkultur-Ergebnissen führt als ohne Vorbehandlung (siehe Tabelle 26). Auch anhand der deutlich geringeren Positivrate der Blutkulturen von vorbehandelten Pferden (14,3 %) im Vergleich zu denen von nicht vorbehandelten (27,1 %) war die Auswirkung des Antibiotikums auf die Blutkultur-Ergebnisse zu sehen. Die PCR-Untersuchung eignet sich nach einer antibiotischen Vorbehandlung demnach besser, um krankheitsrelevante Erreger nach Vorbehandlung zu identifizieren. Diese Feststellung machte, wie oben schon erwähnt, auch Heininger et al. (1999) in seiner Studie.

## 5 Gründe für falsch-positive oder negative Ergebnisse der Blutkultur

Oft findet im Medium der Blutkulturflasche ein Wachstum statt, bei dem es sich zum Großteil, wie in der Studie von Seifert et al. (2003) beschrieben, aufgrund einer Kontamination, um falsch-positive Ergebnisse handelt. Kontaminationsgründe sind eine unzureichende Desinfektion der Entnahmestelle oder das unsaubere Beimpfen der Blutkulturflasche. Weitere mögliche Kontaminanten befinden sich nachweislich auf dem Gummistopfen der Blutkulturflasche (Noskin et al. 2001). Auch bei der Weiterverarbeitung von Blutkulturflaschen können Kontaminanten eingetragen werden (Simhon et al. 2001).

In dieser Studie wurde eine Mehrzahl der in den Blutkulturflaschen gewachsenen Mikroorganismen als Kontaminanten betrachtet. Die Kontaminationskeime dieser Studie stimmen zum Großteil mit denen der Studien von Hall et al. (2006), Weinstein (2003) und Gander et al. (2009) überein.

Neben koagulasenegativen Staphylokokken, Streptokokken der Viridans-Gruppe (vergrünende Streptokokken), *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. und *Propionibacterium acnes* wurden in dieser Studie zusätzlich *Burkholderia cepacia* und *Pantonea* sp. als Kontaminanten festgestellt.

Um Kontaminationen so gering wie möglich zu halten wurde in der aktuellen Studie das als

„double-needle“ (Spitalnic et al. 1995) bekannte Verfahren angewendet. Dieses beinhaltet die Verwendung von zwei sterilen Einmalkanülen, eine zur Blutentnahme, die zweite zum Beimpfen der Blutkulturflasche. Da hierbei eine erhöhte Gefahr der Nadelstichverletzungen besteht, wird in der Humanmedizin von dieser Methode Abstand genommen (Weinstein 2003; Hall et al. 2006). In mehreren Studien wurde diskutiert, ob die „double-needle“-Technik zu einer Reduktion der Kontaminationen im Gegensatz zur „single-needle“-Technik führt. In der Studie von Spitalnic et al. (1995) wird ein Nadelwechsel befürwortet, da hier ohne Nadelwechsel ein signifikanter Anstieg von Kontaminationen zu sehen ist. Andere Studien jedoch berichten von keinem signifikanten Unterschied in der Kontaminationsrate (Leisure et al. 1990; Thamlikitkul et al. 1992; Smart et al. 1993). In der aktuellen Studie wurde ein Wechsel der Kanüle nach Blutentnahme durchgeführt. Kontaminationen konnten jedoch nicht vollkommen verhindert und somit die Aussage der Studien von Leisure et al. (1990), Thamlikitkul et al. (1992) und Smart et al. (1993) bestätigt werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden (Blutkultur und PCR-Analyse), wurde eine höhere Rate an negativen Ergebnissen für die Blutkultur (76,2 %) im Vergleich zur PCR (50,5 %) festgestellt. Das heißt 23,8 % der Blutkulturen zeigten ein positives Ergebnis im Verhältnis zu fast der Hälfte der PCR-Untersuchungen. Eine Studie von Levin et al. (2000) weist in der Humanmedizin ähnliche Zahlen auf. Hier erreichten 16-30 % der Blutkulturen positive Ergebnisse. Eine Rate positiver Blutkulturen von 10 % (Nolte et al. 1993; Marchandin et al. 1995; Murray et al. 1998; Muller-Serieys et al. 2002) weist auf die Blutentnahme unter Gabe von Antibiotika hin (McKenzie et al. 1987; Glerant et al. 1999). In dieser Studie wurde versucht, die Blutentnahme vor Antibiotikagabe durchzuführen. Bei 28 Pferden war das nicht möglich (V Abschnitt 5).

Verschiedene Faktoren können zu einer negativen Blutkultur führen. Ein Grund ist z.B. eine intermittierende Bakteriämie. Hierbei nimmt die Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen nach ihrem Ausbruch und dem dadurch ausgelösten Krankheitsbeginn schnell wieder ab (Dow et al. 1989; Reimer et al. 1997). Die PCR wäre in diesem Fall eventuell positiv, da sie auf der Detektion von DNA basiert und nicht auf lebende und vermehrungsfähige Mikroorganismen angewiesen ist. Ein weiterer Grund für das Versagen des kulturellen Nachweises ist der Beginn einer antibiotischen Therapie vor Blutentnahme. Antibiotika sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bakterien, welche das Wachstum anderer Mikroorganismen z.B. durch Lyse hemmen oder diese abtöten. Heutzutage schließt

der Begriff auch synthetische Substanzen ein (Buckley 1989; Mutschler et al. 2008). Auch in diesem Fall kann man bei einer PCR-Untersuchung ein positives Ergebnis erwarten, da sie auch abgetötete und lysierte Mikroorganismen detektieren kann, bevor sie vom Wirtskörper abgebaut werden.

Da Sepsis eine klinische Diagnose ist (Kappstein 2009; Jauch et al. 2012) und nicht zwangsläufig eine bakterielle Ursache hat, ist ein Erregernachweis keine Voraussetzung. Trotz eines negativen Ergebnisses der Blutkultur kann dennoch eine Sepsis vorliegen. Weiterhin kann Sepsis in manchen Fällen, wie z.B. bei *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* oder bei enterohämolysierenden *Escherichia coli*, auch durch deren Toxine ausgelöst werden. In diesen Fällen befinden sich die Bakterien nicht im Blut. Hierbei bleibt die Blutkultur ebenfalls negativ (Annane et al. 2005). In den beiden letzten Fällen würde das PCR-Ergebnis ebenfalls negativ ausfallen.

Ein weiterer häufiger Grund für negative Blutkulturen auch in dieser Studie ist das langsamere Wachstum einiger Bakterien. Wie schon oben erwähnt, wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass das Wachstum gramnegativer Bakterien (Fox et al. 1988) und gramnegativer aerober Bakterien, die nicht zur Fermentation fähig sind, Non-Fermenter (Fox et al. 1988; Daley et al. 1990), in der Oxoid-Signal-Flasche ein Problem darstellt.

## **6 Unterscheidung zwischen Kontaminationen und echten Signalen im Falle der PCR**

Bei der Auswertung einer PCR geht es darum, ein Signal für relevante Infektionen von einer Kontamination zu unterscheiden. Die in dieser Studie verwendete end-point-PCR kann bei niedrigen Konzentrationen an Ziel-DNA zu variablen Konzentrationen an amplifizierter DNA und damit zu variablen Signalhöhen bei der verwendeten Detektionsmethode führen. Diese Variabilität erschwert die Unterscheidung zwischen einer Kontamination und einem schwachen Pathogensignal. Kontaminationen eines PCR-Ansatzes können aus der Blutentnahme stammen. Sie können auch während der Probenvorbereitung in den Reaktionsansatz gelangen oder schon in den verwendeten Reagenzien vorhanden sein (Peters et al. 2004). PCR-Analysen erfordern deswegen ständige Negativkontrollen und ein Monitoring der Ergebnisse, um z.B. sich signifikant wiederholende Resultate bestimmter Mikroorganismen als Kontamination zu erkennen (Peters et al. 2004).

Sowohl Tsalik et al. (2010) als auch Lucignano et al. (2011) beschrieben in ihren Studien eine geringere Rate an Kontaminationen bei PCR-Untersuchungen im Gegensatz zu Blutkulturen. In den Studien von Dierkes et al. (2009) und Lehmann et al. (2008) wurden koagulase-negative Staphylokokken durch die PCR-Untersuchung selten detektiert. Diese Feststellungen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Auch in dieser Studie trat in der PCR eine geringere Anzahl an Kontaminationen, als bei der mikrobiologischen Untersuchung auf.

## **7 Blutuntersuchungen der Kontrollgruppen**

Die Proben der Kontrollgruppe wurden (V Abschnitt 6) von klinisch gesunden Pferden genommen. In einer PCR-Blutprobe eines klinisch gesunden Fohlens wurde *Staphylococcus epidermidis*, der als Kontaminationskeim gewertet wurde, detektiert. Bei zwei adulten Pferden wurden in den Blutkulturen ebenfalls Keime der Hautflora festgestellt, welche jedoch als nicht relevant gewertet wurden.

Die Ergebnisse der Kontrollgruppen zeigen, dass sowohl bei klinisch gesunden Fohlen als auch bei klinisch gesunden adulten Pferden mit beiden Methoden keine pathogenen Mikroorganismen im Blut nachzuweisen sind.

In einer Studie von Hackett et al. (2014) wurde neugeborenen Fohlen direkt nach Geburt und in regelmäßigen Abständen Blut entnommen um eine Blutkultur anzulegen. Dabei wurde festgestellt, dass bei vier der sieben Fohlen innerhalb der ersten 12 Lebensstunden eine transiente Bakteriämie bestand. Bei den betroffenen Fohlen war 24 Stunden nach Geburt kein Keimnachweis mehr möglich. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass gesunde Fohlen innerhalb der ersten 12 Lebensstunden eine transiente Bakteriämie aufweisen, welche danach nicht mehr besteht. Da die in der Kontrollgruppe beprobten Fohlen älter als 12 Stunden waren, entspricht das negative Ergebnis den Erwartungen. Die beprobten Fohlen waren somit valide Negativkontrollen.

## 8 Sekundärproben als Hilfe für die Auswertung der Blutproben

Als Sekundärprobe wird in dieser Studie Probenmaterial bezeichnet, das zusätzlich zur Blutprobe mitgeliefert wurde und vom potentiellen Infektionsherd stammt, z.B. Kot eines Fohlens mit Durchfall.

Die Auswertung der in den Blutproben detektierten Mikroorganismen wurde durch das Vorhandensein einer Sekundärprobe erleichtert.

In dieser Studie wurden 96,4% der Sekundärproben als positiv gewertet. Nur eine Sekundärprobe wies ein negatives Ergebnis auf. Die PCR-Signale der Sekundärproben waren größtenteils deutlich stärker als die der Blutproben und deswegen einfacher als positiv zu werten.

Wenn ein Mikroorganismus, welcher in der Sekundärprobe detektiert wurde, mit einem geringen Signal in der Blutprobe korrelierte, wurde dieses ebenfalls als positiv gewertet. Bei gleichzeitigem Vorkommen eines Erregers im Blut und in der Sekundärprobe wurde davon ausgegangen, dass eine Streuung von einem Herd ausgehend ins Blut stattgefunden hat. Der infektiöse Herd wurde hierbei als Primärursache und als verantwortlich für eine Einschwemmung der Bakterien ins Blut angesehen.

Diese Behauptungen stimmen mit denen von Peters et al. (2004) überein, dass ein PCR-Ergebnis einer Blutprobe dann als tatsächlich positiv angesehen werden kann, wenn ein Infektionsherd mit dem gleichen Pathogenen identifiziert wurde.

Eine Besonderheit lag bei einer Probe vor, bei der sowohl die Blut- als auch die Sekundärprobe steril waren. In dem Fall, handelte es sich um ein Pferd mit einer diffusen Schwellung am Fuß mit Austritt von Sekret. Das Pferd hatte angeblich erhöhte Temperatur, welche zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht festgestellt werden konnte. Die klinische Diagnose einer Phlegmone konnte aufgrund der Ergebnisse nicht bestätigt werden.

In anderen Proben tauchten eindeutige Signale in Blut- und Sekundärproben auf. Hier bestätigte das gleichzeitige Vorkommen des Mikroorganismus in beiden Proben das Ergebnis der PCR-Blutprobe nochmals.

In einem Fall wurde *Clostridium perfringens* im Blut mit einem eindeutigen Signal detektiert. Die Sekundärprobe zeigte jedoch nur ein geringes Signal. So wurde hier aufgrund der



Blutprobe der Erreger in der Sekundärprobe belegt.

## **9 Der Unterschied zwischen dem Immunsystem adulter Pferde und Fohlen**

Das Immunsystem adulter Pferde und Fohlen unterscheidet sich. Theoretisch besitzen Fohlen zum Zeitpunkt der Geburt ein vollentwickeltes Immunsystem, welches sich während der fetalen Entwicklung ausgebildet hat (Giguère et al. 2005). Die Immunorgane und die spezifischen und unspezifischen Komponenten unterscheiden sich zwischen Fohlen und Adulten nicht. Jedoch muss das Immunsystem der Fohlen erst heranreifen und trainiert werden. Der Unterschied besteht darin, dass das Fohlen noch keinen Kontakt zur infektiösen Umwelt hatte und somit keine Gedächtniszellen für Fremdartigene besitzt, die eine schnelle und effektive Immunantwort auslösen können (Kolm et al. 2010).

Innerhalb der ersten Lebensstunden findet eine Übertragung der passiven Immunität durch die Aufnahme von Kolostrum statt. Dies sorgt in der Regel erst einmal für ausreichend Schutz vor der Mutter bekannten Infektionen und ist deswegen von großer Bedeutung (Raidal 1996; Giguère et al. 2005; Raidal et al. 2005).

Das Komplementsystem ist eines der frühesten Immunkomponente, auf das der Körper mit einer Kaskade von weiteren Immunreaktionen anspricht. Die Komplementaktivität bzw. die Komplementfaktoren im Serum von neugeborenen Fohlen betragen nur 12-60 % (Kolm et al. 2010) bzw. nach einer Studie von Bernoco et al. (1994) etwa 13 % von adulten Pferden. Dies führt zu einer schwächeren initialen inflammatorischen Reaktion. Diese Faktoren erklären zum Teil die größere Empfänglichkeit gegenüber Infektionserkrankungen von Fohlen. Diese Einschätzung spiegelt sich in dieser Studie anhand der Ergebnisse der untersuchten Blutproben und der Krankheitsbilder bzw. -zustände der Pferde wider. Dies ist eine weitere Erklärung dafür, dass in der aktuellen Studie ausschließlich Fohlen an einer Sepsis erkrankten. Auch viele andere Autoren berichten, dass hauptsächlich Fohlen von einer Sepsis betroffen sind (Hirsh et al. 1993; Stewart et al. 2002; Corley et al. 2007; Pusterla et al. 2009; Goehring et al. 2011).

Einer Studie von Sellon (2000) zufolge ist eine Hypogammaglobulinämie die häufigste Ursache für eine schwache oder sogar fehlende Abwehr. Gründe für eine

Hypogammaglobulinämie sind eine Störung der Produktion bzw. die Aufnahme oder Absorption von Immunglobulinen.

Häufige Erkrankungen, die durch Immunglobulindefizite verursacht werden, sind Arthritis, Pneumonie und Sepsis (Raidal 1996). Hierfür gibt es mehrere Beispiele in der Studie. Jedoch wurde der Immunglobulinstatus der Pferde nicht überprüft.

An einer Arthritis erkrankten insgesamt vier Pferde. Drei davon waren Fohlen im Alter zwischen 3 bis 8 Tagen.

Ein Fohlen, welches in der Blutprobe ein negatives Ergebnis zeigte, wies in seiner Synovia ein hohes Signal von *Actinobacillus equuli* und ein geringes Signal des Universal-Primers auf. Bei den anderen beiden Fohlen war sowohl im Blut als auch in der Synovia *Actinobacillus equuli* zu finden. In beiden Fällen waren die Signale in der Synovia sehr deutlich im Gegensatz zum Blut, wo es nur mit Hilfe der Sekundärprobe zu einem positiven Ergebnis kam. *Proteus sp.* war ein weiterer Erreger, der bei einem Fohlen in der Synovia auftrat. Alle drei Blutkulturen zeigten kein Bakterienwachstum.

Ein weiterer Fall einer Arthritis war bei einer adulten Stute mit einer Sehnenscheidenentzündung und einer hochgradigen Schwellung zu finden. Die Stute zeigte ansonsten keine Symptome. Unter Narkose wurde hier die Sehnenscheide punktiert und mit Hilfe der PCR die Synovia untersucht. Hier wurden *Proteus sp.* und *Staphylococcus aureus* detektiert. Die Blutkultur dieser Probe zeigte ein Wachstum von *Bacillus sp.* Dieser wurde in der PCR-Untersuchung nicht detektiert, da er kein Bestandteil des Panels war. Jedoch zeigte die Blutprobe ein Signal des Universal-Primers, was ein Hinweis auf das Vorkommen von *Bacillus sp.* im Blut sein könnte.

An Sepsis erkrankten in dieser Studie nur Fohlen, was die Aussagen einiger anderer Autoren bestätigt (Hirsh et al. 1993; Stewart et al. 2002; Corley et al. 2007; Pusterla et al. 2009; Goehring et al. 2011). Zwei septische Fohlen wiesen eine Hypothermie auf. Eines dieser Fohlen war an Diarrhö erkrankt. Im Kot wurden insgesamt neun Bakterienarten detektiert. *Clostridium perfringens* wurde sowohl im Kot als auch im Blut festgestellt. Aufgrund der schwerwiegenden Symptome wurde das Fohlen eingeschläfert. Das andere Fohlen wurde schon von den Klinikern als septisch eingestuft, was durch die Detektion von *E. coli* im Blut bestätigt wurde. Bei einem weiteren septischen Fohlen mit Fieber wurden *Proteus sp.* und *Actinobacillus equuli* im Blut detektiert. Ebenfalls zeigten *E. coli* und der Universal-Primer ein

Signal. Dieses Fohlen verstarb aufgrund der schwerwiegenden Erkrankung.

Der entscheidende Vorteil adulter Pferde im Gegensatz zu Fohlen ist die schnelle Reaktion auf Fremdartigene und vor allem der Kontakt mit vielen verschiedenen infektiösen Umwelteinflüssen über den Zeitraum ihres Lebens. Dieser Vorteil hat eine geringere Empfänglichkeit gegenüber Infektionskrankheiten zur Folge.

## **10 Sagt die PCR-Signalhöhe etwas über den Krankheitszustand des Pferdes aus?**

Die Signalhöhe der PCR-Signale variierte von Probe zu Probe und war zum Teil vom Probenmaterial abhängig. Eine geringe Signalhöhe im Blut kann auf eine Bakteriämie hindeuten. In vielen Fällen ist eine Bakteriämie transient oder intermittierend. Um das zu überprüfen, ist eine zweite Blutentnahme nötig und sinnvoll.

Die PCR-Signale der Sekundärproben schwankten wie auch die der Blutproben. Meist wiesen sie jedoch deutliche Signalhöhen auf, so dass sie als positiv gewertet werden konnten. Die Art des Materials der Sekundärprobe spielte in dieser Studie eine Rolle.

In drei Kotproben, die von Fohlen mit Diarrhö stammten, wurden *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp. und *Actinobacillus equuli* mit hohen PCR-Signalen detektiert. Das Durchschnittsalter der Fohlen betrug drei Tage. Auch in einer Studie von Frederick et al. (2009) wurde *Clostridium perfringens* häufig bei Fohlen mit einem Durchschnittsalter von 3 Tagen kultiviert. Weitere klinische Veränderungen neben der Diarrhö waren Hypo-, Hyperthermie, Tachykardie und Leukopenie. In einer Studie von Netherwood et al. (1996) wird *Clostridium perfringens* mit Diarrhö und Tod assoziiert. Diese Feststellung konnte in dieser Studie bestätigt werden. Zwei Fohlen überlebten die Erkrankung nicht. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie kein Zusammenhang zwischen *Clostridium perfringens* und Durchfall bei drei Tage alten Fohlen erkannt (Tillotson et al. 2002). *Clostridium perfringens* kam nur bei einem der Fohlen in der Blutprobe vor. Auch alle anderen im Kot detektierten Bakterien waren im Blut nicht nachzuweisen.

In einer Probe, einem primär sterilen Probenmaterial, wurde ein deutliches PCR-Signal von *Actinobacillus equuli* festgestellt. Das Vorfinden von *Actinobacillus equuli* in der Bauchflüssigkeit in dieser Studie stimmt mit einem Ergebnis einer anderen Studie überein

(Patterson-Kane et al. 2001). Dort wurden zusätzlich wenige Kolonien von *Escherichia coli* in der Bauchhöhlenflüssigkeit eines adulten Pferdes gefunden. In der aktuellen Studie handelte sich um ein 12 Jahre altes Pferd mit Fieber und Tachykardie. Auch wurde schon im Befundbogen auf die Diagnose „Peritonitis“ hingewiesen. *Actinobacillus equuli* kommt bei adulten Pferden weniger häufig vor und ist meist lokalisiert. Eine akute oder chronische Peritonitis wird in mehreren Publikationen als klinisches Bild angegeben (Ashhurst-Smith et al. 1998; Patterson-Kane et al. 2001). In diesem Fall handelte es sich nach Aussagen der Kliniker um eine Peritonitis verursacht durch eine Dünndarmperforation. Jedoch auch dann ist das Vorkommen von *Actinobacillus equuli* in der Bauchhöhlenflüssigkeit aufgrund seines Kommensalismus im Verdauungstrakt des Pferdes zu erklären.

*Escherichia coli* tauchte mit einem sehr deutlichen Signal im Uterussekt einer 12-jährigen Stute auf, welche einen Tag nach Geburt ihres Fohlens eine Hyperthermie entwickelte. In der Literatur werden *Escherichia coli* bei einer Endometritis als die am häufigsten isolierten Bakterien (Gibbs et al. 1985; Parry et al. 2011) erwähnt.

Weiter waren die Signale in einigen Nasensekreten sehr deutlich. Hier wurde *Actinobacillus equuli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equi* ssp. *equi*, *Clostridium difficile* und *Proteus* sp. mit deutlichen Signalthöhen detektiert. Die Pferde zeigten klinische Veränderungen wie Fieber, Nasenausfluss, geschwollene Lymphknoten, Husten, Mattigkeit und Dyspnoe. Da *Actinobacillus equuli* zur Normalflora der Mundhöhle gehört (Patterson-Kane et al. 2001; Schröttner et al. 2013), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* ein normaler Bewohner der Haut und Schleimhautoberfläche ist (Timoney 2004; Preziuso et al. 2010; Erol et al. 2012), *Proteus* sp. als Fäuniserreger im Erdboden, Abwasser und auf Tierkadavern vorkommt und ein Teil der normalen Darmflora bei Tieren ist (Hahn et al. 2009) und *Clostridium difficile* vor allem im Erdboden vorkommt (Hahn et al. 2009; Diab et al. 2013), waren die PCR-Signale im Nasensekret zu erwarten. Sie korrelierten nicht mit den Krankheitsbildern der betroffenen Pferde. Der einzige pathogene und relevante Mikroorganismus in den Nasensekreten war *Streptococcus equi* ssp. *equi*. Dieser ist Verursacher der Druse (Anzai et al. 1997; Rolle and Mayr 2007; Erol et al. 2012).

Alle betroffenen Pferde zeigten klinische Veränderungen, die zwar mit der Höhe der Signale zu korrelieren schienen, jedoch keine Aussage darüber zuließen, ab welcher Signalthöhe Pferde erkranken bzw. welche Bakterienkonzentration in welchem Probenmaterial benötigt

wird, um Krankheitssymptome auszulösen. Hierbei sind vielen Faktoren beteiligt, wie z.B. der Immunstatus und das Alter des Pferdes und die Variabilität der Messmethode.

## **11 Schlussfolgerung**

Der in dieser Studie durchgeführte Vergleich der klassisch in der Infektionsanalytik verwendeten Blutkultur mit der molekulardiagnostischen Methode PCR hat gezeigt, dass die PCR eine gute Alternative zur Blutkultur darstellt. Sie dient vor allem zur schnellen Diagnose und ermöglicht dadurch einen frühzeitigen Beginn einer adäquaten Therapie mit einer wirksamen antimikrobiellen Substanz. Dies wirkt sich positiv auf die Überlebensrate von Patienten mit einer systemischen Infektion aus. Schon Rudolph et al. (1993) sieht die PCR als gute Alternative zur Blutkultur und als ein Screening für eine schnelle Diagnose.

In der Tiermedizin ist es wie auch in der Humanmedizin wichtig, schnell zu handeln und adäquat zu therapieren. Dies gilt besonders im Bereich der Fohlenmedizin. Hier kann es entscheidend sein innerhalb weniger Stunden Ergebnisse zu erhalten, was in dieser Studie deutlich gezeigt werden konnte. Vielen der beprobten Fohlen konnte durch eine schnelle Detektion der Mikroorganismen im Blut geholfen werden. Fünf Fohlen konnten trotzdem nicht gerettet werden. Sie überlebten den Zeitpunkt der Ergebnisbekanntgabe nicht. Auch zwei adulte Pferde mussten aufgrund der schwerwiegenden klinischen Veränderungen vorher eingeschläfert werden.

Ganz besonders hervorzuheben ist die deutlich höhere Positivrate der PCR-Untersuchungen (49,5 %) im Vergleich zur Blutkultur (23,8 %). Die niedrige Nachweisgrenze der PCR ermöglicht das Detektieren kleinster Mengen DNA aus Blut ohne vorherige Anreicherung der bakteriellen DNA. Dies wurde ebenfalls in mehreren anderen Studien festgestellt (Peters et al. 2004; Reier-Nilsen et al. 2009; Paolucci et al. 2010).

Aus diesen Gründen ist es gut vorstellbar, dass die PCR-Untersuchung in Zukunft häufiger im Rahmen der Sepsisdiagnostik bzw. auch bei unspezifischen Fieberpatienten und ganz besonders in der Fohlenmedizin eingesetzt wird.

Die Praxistauglichkeit ist gegeben, da der Aufwand nicht größer ist als bei einer mikrobiologischen Untersuchung in Form einer Blutkultur. Auch der Umgang mit den PCR-Blutproben war in dieser Studie unkompliziert durchzuführen und kann daher gut im Praxis-

und Klinikalltag integriert werden.

Weil die PCR und die Blutkultur eine Reihe an sich überlappenden Blutinfektionen identifiziert (Tsalik et al. 2010), sind andere Autoren der Meinung, dass sie zusätzlich zur Blutkultur eingesetzt werden sollte (Louie et al. 2008; Tsalik et al. 2010). Außerdem würde der parallele Einsatz von PCR und Blutkultur eine frühere Erkennung von Blutinfektionen fördern (Louie et al. 2008).

Stehen Sekundärproben vom eigentlichen Infektionsherd zur Verfügung können sie die Auswertung der Ergebnisse einer Blutprobe deutlich vereinfachen, da hier die Konzentration des oder der Erreger um ein vielfaches höher ist. Die Entscheidung, ob eine lokale oder systemische Infektion vorliegt wird durch diese Proben erleichtert.

## VII Zusammenfassung

Sepsis ist eine komplexe inflammatorische Reaktion des Organismus infektiöser Ätiologie. In der Pferdemedizin treten Todesfälle im Zusammenhang mit einer Sepsis vor allem bei Fohlen auf. Bei unter sieben Tage alten Fohlen ist Sepsis sogar die häufigste Ursache für ein Versterben. Eine rechtzeitige Diagnose und schnelle adäquate Therapie könnten eine wichtige, die Überlebensrate fördernde Maßnahme sein.

In dieser Studie wurden mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungsergebnisse gegenübergestellt. Als mikrobiologische Methode wurde die als Goldstandard geltende Blutkultur verwendet, als molekularbiologische Methode die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Außer dem Vergleich der Methoden sollte innerhalb dieser Studie auch die Praktikabilität der PCR im Praxis- und Klinikalltag bewertet werden. Als Blutkultursystem wurden Oxoid-Signal-Blutkulturflaschen verwendet, welche für den Nachweis aerober und anaerober Mikroorganismen geeignet sein sollen. Die DNA für die PCR-Untersuchung wurde ohne vorherige Kultur oder Anreicherung direkt aus dem Patientenblut isoliert und eingesetzt.

Die für die Studie herangezogenen Probanden waren Pferde, die von verschiedenen Kliniken und Praxen betreut wurden. Sie wurden nach zuvor festgelegten Einschlusskriterien ausgewählt. Das Hauptkriterium für diese Studie war eine erhöhte Körpertemperatur. Nicht für die Teilnahme notwendig waren SIRS-Kriterien wie z. B. Leukozytose, Tachykardie oder Tachypnoe. Neben diesen Kriterien wurden auch Tiere mit spezifischen Krankheitsbildern wie Phlegmone, Kolik, Peritonitis und Verdacht auf Druse in die Studie eingeschlossen.

Wenn möglich, wurden parallel zu den Blutproben sogenannte Sekundärproben entnommen. Als Sekundärprobe wurde Probematerial eines potentiellen Infektionsherdes definiert. Wie bei den Blutproben wurde auch bei den Sekundärproben eine PCR durchgeführt.

Die in dieser Studie eingesetzte PCR wurde als end-point-PCR im Multiplexverfahren durchgeführt. Das bedeutet, dass mehrere Erregernachweise je PCR-Reaktionsansatz durchgeführt wurden. Die Multiplex-PCR bestand aus sechs Reaktionsansätzen und umfasste insgesamt 18 bakterielle Spezies. Die für die PCR benötigten Primer wurden vor Beginn der Studie entwickelt und validiert.

Beim Vergleich der mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden Vor- und Nachteile beider Methoden abgewogen. Die bedeutendsten Vorteile der PCR gegenüber der Blutkultur liegen bei der enormen Zeitersparnis von mehreren Stunden im Vergleich zu Tagen

und bei einer besseren Korrelation zu den klinischen Symptomen. Außerdem wurde gezeigt, dass eine antibiotische Vorbehandlung nur geringe Auswirkungen auf das Ergebnis einer PCR-Untersuchung hat. Im Gegensatz dazu wurde in der Blutkultur aufgrund der durch die Vorbehandlung, geschwächten Erreger nur ein sehr langsames oder gar kein Wachstum festgestellt.

Die Positivraten der beiden Methoden unterschieden sich signifikant. Mit PCR untersuchte Blutproben wiesen eine Positivrate von 49,5 % auf, Blutkulturen zeigten hingegen nur bei 23,8 % ein Wachstum. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden gab es bei 40,6 %. Diese Proben wiesen bis auf eine Probe alle ein negatives Ergebnis auf. Weitere 12,9 % der Proben wurden mit beiden Methoden positiv getestet, zeigten jedoch keine übereinstimmenden Ergebnisse hinsichtlich der Mikroorganismen. Die positiven Ergebnisse der Blutkulturen wurden meist als Hautkeime identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden mit Hilfe der PCR oft pathogene Keime detektiert, welche mit dem klinischen Bild des jeweiligen Pferdes assoziiert werden konnten. Die im Blut gemessenen PCR-Signalhöhen waren häufig sehr niedrig und erschwerten die Interpretation des PCR-Ergebnisses. In diesen Fällen konnten Sekundärproben oftmals zu einer besseren Auswertung der PCR-Blutproben beitragen. Sie halfen potentielle Kontaminationen ein- oder auszuschließen und erlaubten eine Bestätigung der Blutprobenergebnisse. So stimmten 57,1 % der in den Sekundärproben detektierten Mikroorganismen mit denen in der zugehörigen Blutprobe überein.

Sämtliche Proben wurden von unterschiedlichen Tierärzten im Rahmen ihrer normalen Tätigkeit genommen. Die Probenentnahme für eine PCR unterscheidet sich nicht wesentlich von der für eine Blutkultur. In beiden Fällen muss das Blut so steril wie möglich entnommen werden. Während für die Blutkultur mindestens 10 ml Vollblut entnommen und anschließend in eine Blutkulturflasche überführt wurden, wurden in dieser Studie für den PCR-Nachweis lediglich 2 ml Blut in ein sogenanntes Stabilisierungsröhrchen verbracht. Es stellt für den Mediziner somit einen vergleichbaren, wenn nicht geringeren, zeitlichen Aufwand dar.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluss zu, dass die molekulardiagnostische PCR eine geeignete Methode für die Sepsisdiagnostik darstellt. Vor allem in Kombination mit Sekundärproben könnte sie bei vergleichbarem Arbeitsaufwand bei Fieberpatienten unspezifischer Herkunft und in der Fohlenmedizin eingesetzt werden.



## VIII Summary

Sepsis is a complex inflammatory response to an infectious agent. In equine medicine deaths associated with sepsis mainly appear in foals. For less than seven-day-old foals sepsis is even the most common cause of death. Timely diagnosis and an early start of adequate antibiotic treatment have considerable potential to increase the survival-rate.

This study compares analysis results of traditional microbiology against a molecular diagnostics method. In addition to the comparison of two different diagnostic approaches, the practicability of PCR in daily veterinary routine has been assessed during this study. Microbiology results were based on traditional blood cultures, still today's gold standard, while polymerase chain reaction (PCR) based testing was performed as molecular diagnostic method. For the blood cultures, Oxoid Signal blood culture bottles have been selected, which are considered to be suitable for the detection of both aerobic and anaerobic microorganisms. In contrast, DNA isolation for PCR analysis was obtained directly from native equine blood samples without any prior culture or enrichment steps.

All equine samples were collected from foals as well as from adult horses presented to various veterinary hospitals and practices in Southern Germany. Study subjects were included in the study based on predetermined inclusion criteria. For this study the main criterion was either an elevated or decreased body temperature. Not required for inclusion were other SIRS criteria such as leukocytosis, tachycardia or tachypnoea. Furthermore, animals with specific disease symptoms like phlegmons, colitis, peritonitis and suspected strangles were included in the study. When possible, so-called secondary samples were collected in parallel to the blood samples. The definition of a secondary sample was material directly collected from the suspected source of infection. PCRs were performed on the blood samples as well as for the corresponding secondary samples.

The PCR assay system used was developed exclusively for this study and relies on multiplexed end-point PCR reactions. "Multiplex" is defined as the simultaneous detection of several analytes in a single PCR reaction. The multiplex PCR system used during the study consists of six reactions, comprising a total of 18 bacterial species. All primer pairs required for the respective PCRs were performance tested prior to the study.

Advantages and disadvantages of the microbiological and molecular biology methods were assessed by comparison of the sample results. The most prominent advantages of the PCR were

the substantial time savings with results available after only a few hours compared to days when using blood cultures as well as the better correlation with clinical symptoms. Furthermore, previous antibiotic treatment had no effect on PCR results compared to blood cultures in which an antibiotic treatment typically leads to slower or even no growth at all due to weakened pathogens.

The positivity rates of the two methods differed significantly. While blood samples tested with the PCR assays reported a positivity rate of 49.5 %, blood cultures only came up positive in 23.8 % of the cases. Results of both methods were concordant in 40.6 % of cases, of which only one sample was positive. 12.9 % of samples showed positive results with both methods although none of the detected microorganisms matched not at all. Positive blood culture results were usually identified as skin flora. In contrast, pathogens detected by PCR in most cases associated well with the clinical picture of the particular horse. PCR signal levels derived from the blood samples were often very low complicating the interpretation of PCR results. In many of these cases, the secondary sample contributed to a better interpretation and helped to include or exclude potential contaminations and allowed confirmation of blood sample results. Microorganisms detected in secondary samples were in concordance with the pathogens identified in the corresponding blood sample in 57,1 % of the cases.

Blood and secondary samples were collected by different veterinarians as part of their daily working routine. Sampling for PCR and blood culture is not significantly different. In both cases, blood is supposed to be collected as sterile as possible. For blood cultures at least 10 ml of whole blood were collected and immediately transferred into a blood culture bottle. For the PCR detection only 2 ml of whole blood were inserted into a so-called stabilization-tube at the same time. Sample collecting required the same amount of time regardless of which method was used.

The results of this study suggest that the PCR based molecular diagnostics method is suitable for an early diagnosis of sepsis in horses. Especially, if combined with adequate secondary samples, it could be useful for patients with fever of nonspecific origin and especially for medical care of newborns and foals without introducing additional workload for the veterinarian.

## IX Tabellen

**Tabelle 29:** Liste der in die Studie eingeschlossenen Pferde und Fohlen mit Angaben zur Altersklasse, zum Alter, Geschlecht, zur Probenart und zu den klinischen Veränderungen.

W = Wallach; S = Stute; H = Hengst

Proben-nr.	Alters-klasse	Alter	Geschlecht	Blut-probe	Sekundärprobe	Klinische Veränderungen	weitere klinische Veränderungen
1_001	Adult	15 J	W	✓	Trachealsekret	Fieber	Husten
1_002	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber	
1_003	Adult	4 J	S	✓	Nasentupfer	Fieber, Leukopenie	
1_004	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber, Leukozytose	
1_005	Adult	k.A.	W	✓	Nasentupfer	Fieber	tennisballgroßer Mandibularlymphknoten
1_006	Adult	4 J	S	✓	Nasentupfer	Fieber	Nasenausfluss, Husten
1_007	Adult	k.A.	S	✓	Nasentupfer	Fieber	Verdacht auf Druse, da Besitzer Kontakt zu Druse-Pferden
1_008	Adult	k.A.	H	✓	–	rezidivierendes Fieber	
1_009	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber	
1_010	Adult	k.A.	W	✓	Nasensekret	Fieber, Leukozytose	eitriger Nasenausfluss, geschwollene Ganaschen, Verdacht auf Druse
1_011	Adult	26 J	W	✓	–	Fieber	
1_012	Adult	23 J	W	✓	–	Kontrollgruppe	
1_013	Adult	5 J	W	✓	Eiter	Fieber	eitrige OP-Wunde
1_014	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	Phlegmone
1_015	Adult	k.A.	S	✓	Nasensekret	Fieber, Leukozytose	geschwollene Mandibularlymphknoten, Dyspnoe
1_016	Adult	9 J	W	✓	Eiter	Fieber, Leukozytose	Abszess im kaudalen Enddarm

Proben-nr.	Alters-klasse	Alter	Geschlecht	Blut-probe	Sekundärprobe	Klinische Veränderungen	weitere klinische Veränderungen
1_017	Adult	7 J	S	✓	–	Kontrollgruppe	
1_018	Adult	17 J	W	✓	–	Kontrollgruppe	
1_019	Adult	16 J	W	✓	–	Kontrollgruppe	
1_020	Adult	k.A.	W	✓	–	Kontrollgruppe	
1_021	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	Husten, Nasenausfluss
1_022	Adult	20 J	W	✓	–	Fieber, Tachykardie, Leukopenie	
1_023	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Leukozytose	
1_024	Adult	k.A.	H	✓	–	Fieber	
1_025	Adult	3 J	W	✓	–	Fieber, Tachykardie, Tachypnoe	
1_026	Adult	3 J	W	✓	Nasensekret	Fieber	Nasenausfluss
1_027	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber, Leukopenie	Symptome einer Kolik
1_028	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber, Leukopenie	aus gleicher Herde wie 1_027
1_029	Fohlen	3 Mo	S	✓	–		Inappetenz
1_030	Adult	21 J	W	✓	–	Fieber	
1_031	Fohlen	7 Tg	S	✓	–		IgG-Mangel
1_032	Fohlen	3 Wo	S	✓	–	Kontrollgruppe	
1_033	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber	
1_034	Adult	k.A.	S	✓	Synovia		Tendovaginitis mit hochgradiger Schwellung
1_035	Adult	21 J	W	✓	–	Fieber, Leukozytose	
1_036	Adult	2 J	H	✓	–	Fieber	
1_037	Adult	k.A.	W	✓	Präputialtupfer	Fieber	Präputialödeme
1_038	Adult	13 J	W	✓	–	Fieber	Gliedmaße- und Präputialödeme
1_039	Adult	9 J	S	✓	–		Phlegmone

Proben-nr.	Alters-klasse	Alter	Geschlecht	Blut-probe	Sekundärprobe	Klinische Veränderungen	weitere klinische Veränderungen
1_040	Adult	k.A.	W	✓	–		chronische Verletzung, Phlegmone
1_041	Adult	18 J	W	✓	–	Fieber, Leukozytose	Husten, Bronchitis
1_042	Adult	10 J	H	✓	–	Fieber	
1_043	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	Koliksymptome
1_044	Adult	2 J	W	✓	Wundflüssigkeit		Phlegmone
1_045	Fohlen	23 Tg	S	✓	–	Kontrollgruppe	
1_046	Fohlen	1 Mo	H	✓	–	Kontrollgruppe	
1_047	Fohlen	3,5 Mo	H	✓	–	Kontrollgruppe	
1_048	Fohlen	3 Mo	S	✓	–	Kontrollgruppe	
3_001	Adult	12 J	S	✓	Uterussekret	Fieber	
3_002	Fohlen	3 Tg	H	✓	Kot	Fieber	Diarrhö
3_003	Fohlen	1,5 Tg	S	✓	Kot	Hypothermie, Tachykardie, Leukopenie, Neutrophilie	Diarrhö
3_004	Fohlen	3 Tg	H	✓	Synovia	Tachykardie, Leukozytose	eitrige Arthritis
3_005	Fohlen	1 Tg	S	✓	–	Hypothermie	
3_006	Fohlen	1 Tg	H	✓	–	Hypothermie, Tachykardie	
3_007	Fohlen	15 Std	H	✓	–	Fieber, Leukopenie	
3_008	Fohlen	16 Std	H	✓	–	Hypothermie	
3_009	Fohlen	5 Tg	S	✓	Kot	Tachykardie	Verdacht auf Sepsis
3_010	Fohlen	7 Tg	H	✓	Synovia	Fieber, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose, Neutrophilie	
3_011	Adult	12 J	S	✓	Bauchhöhlenflüssigkeit	Fieber, Tachykardie	Peritonitis
3_012	Adult	25 J	W	✓	Bauchhöhlenflüssigkeit	Fieber, Leukozytose, Neutrophilie	
3_014	Fohlen	4 Std	H	✓	–	Hypothermie, Leukopenie	

Proben-nr.	Alters-klasse	Alter	Geschlecht	Blut-probe	Sekundärprobe	Klinische Veränderungen	weitere klinische Veränderungen
3_015	Fohlen	4 Tg	H	✓	–	Hypothermie	
3_016	Fohlen	16 Std	S	✓	Bauchhöhlenflüssigkeit	Fieber	Peritonitis
3_017	Fohlen	1 Tg	H	✓	–	Tachykardie	
3_018	Fohlen	7 Std	H	✓	–	Tachykardie, Tachypnoe	Verdacht auf Sepsis
3_019	Fohlen	9 Std	H	✓	–		IgG-Mangel
3_020	Fohlen	14 Tg	S	✓	–	Fieber, Tachykardie, Tachypnoe	Diarrhö, Pneumonie
3_021	Fohlen	8 Tg	H	✓	Synovia	Fieber, Leukozytose	septische Arthritis
3_022	Fohlen	2 Tg	H	✓	–	Hypothermie, Leukopenie	Verdacht auf Sepsis
3_023	Fohlen	4 Mo	H	✓	–		Koliksymptome
3_024	Fohlen	18 Tg	H	✓	–	Kontrollgruppe	
4_001	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Leukozytose	
4_002	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Leukozytose	Vaskulitis
6_001	Adult	14 J	W	✓	–	Fieber	Anämie
6_002	Adult	4 J	W	✓	Trachealsekret	Fieber	Husten
6_003	Adult	17 J	W	✓	–	Fieber, Leukozytose	
6_004	Adult	8 J	W	✓	–	Fieber	
6_005	Adult	22 J	W	✓	–		rezidivierende Phlegmone
6_006	Adult	5 J	S	✓	–	Fieber	
6_008	Adult	5 J	W	✓	–	Fieber	Nasenausfluss
6_009	Adult	12 J	S	✓	–	Fieber, Tachykardie, Leukozytose	
6_015	Adult	1 J	W	✓	Eiter	Fieber, Leukozytose	
6_016	Adult	7 J	W	✓	–	Fieber	
6_017	Fohlen	8 Mo	H	✓	–	Fieber	
6_018	Adult	4 J	S	✓	Tupfer von Bronchoskopie	Fieber, Tachykardie	Husten

Proben-nr.	Alters-klasse	Alter	Geschlecht	Blut-probe	Sekundärprobe	Klinische Veränderungen	weitere klinische Veränderungen
6_022	Adult	20 J	W	✓	–	Fieber	
6_023	Adult	1 J	H	✓	Nasentupfer	Leukozytose	Nasenausfluss
6_024	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Leukozytose	ikterische Schleimhäute
6_025	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	
6_029	Adult	7 J	S	✓	–		Kolik
6_030	Adult	7 a	W	✓	–	Fieber, Tachypnoe	
6_031	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	
6_032	Adult	10 J	W	✓	Nasensekret	Leukozytose	Nasenausfluss
6_036	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	
6_037	Adult	5 J	W	✓	–	Fieber	
6_038	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Tachykardie	verschärftes Atemgeräusch
6_040	Fohlen	1 Wo	H	✓	–	Fieber, Leukozytose	
6_043	Adult	23 J	S	✓	–	Tachykardie, Tachypnoe	Nystagmus, Ataxie
6_044	Adult	1,5 J	H	✓	–	Leukozytose	
6_045	Adult	k.A.	W	✓	–	Fieber	
7_001	Adult	k.A.	S	✓	–	Fieber, Leukozytose	

**Tabelle 30:** Verwendete Software für das Primerdesign

Verwendung	Abkürzung	Name	Internetadresse
Primerdesign	NCBI	National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.gov">http://www.ncbi.nlm.gov</a>
Primerdesign	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Primerdesign	Clustal X	Clustal: Multiple Sequence Alignment	<a href="http://www.clustal.org/clustal2/">http://www.clustal.org/clustal2/</a>
Primerdesign	OligoAnalyzer 3.1	IDT; Integrated DNA Technologies	<a href="https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/">https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/</a>
Primerdesign	Primer-BLAST	NCBI/Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>

**Tabelle 31:** Primermischungen für die Multiplex-PCR (für Studienproben)

Primermischung 1	Primermischung 2
S.pneumoniae_2450_F S.pneumoniae_2804_R Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R S.enterica_1678_F S.enterica_2078_R K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R R.equi_129_F R.equi_528_R Sequiequi_158_F Sequi_435_R
Primermischung 3	Primermischung 4
Listeria sp._481_F Listeria sp._770_R S.aureu_1056_F S.aureu_1242_R P.aerug_124_F P.aerug_686_R Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R	Proteus_1851_F Proteus_2049_R Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R S.epi_2171_F S.epi_2868_R
Primermischung 5	Primermischung 6
S.dysgalactiae_1018_F S.dysgalactiae_1317_R Cl.difficile_2181_F Cl.difficile_2377_R Ecoli_857_F Ecoli_1319R Entero_895_F Entero_1457_R	Universal_F Universal_R



**Tabelle 32:** PCR-Programm

	Grad	Dauer	Anzahl der Zyklen
<b>Aktivierung der Polymerase</b>	95 °C	10 min	1x
<b>Denaturierung</b>	96 °C	30 sec	2x
<b>Annealing</b>	61 °C	5 min	
<b>Elongation</b>	72 °C	50 sec	
<b>Denaturierung</b>	96 °C	30 sec	33x
<b>Annealing</b>	61 °C	1 min	
<b>Elongation</b>	72 °C	50 sec	
<b>Final Extension</b>	72 °C	1 min	1x

**Tabelle 33:** Bakterienisolate

Bakterienisolate	Bezeichnung	Herkunft
<i>Actinobacillus equuli</i>	01_Act_eq	3465/2008; LMU
<i>Clostridium perfringens</i>	02_Cl_per	Kursstamm LMU
<i>Enterobacter cloacae</i>	03_En_clo	3041/2008 LMU
<i>Enterococcus faecalis</i>	04_En_faecalis	2925/2007 LMU
<i>Enterococcus faecium</i>	05_En_faecium	3794/2007 LMU
<i>Escherichia coli</i>	06_E_coli	Kursstamm LMU
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	07_Kl_pn	0155/2009 LMU
<i>Listeria monocytogenes</i>	08_Lis_mo	Kursstamm LMU
<i>Pasteurella multocida</i>	09_Pas_mu	Kursstamm LMU
<i>Proteus mirabilis</i>	10_Pro_mi	Kursstamm LMU
<i>Proteus vulgaris</i>	11_Pro_vu	4575/2011 LMU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12_Ps_aer	3682/2011 LMU
<i>Rhodococcus equi</i>	13_Rho_eq	3771/2009 LMU
<i>Salmonella typhimurium</i>	14_S_typh	3015/2011 LMU
<i>Staphylococcus aureus</i>	15_St_au	5168/2002 LMU
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16_St_ep	5016/2007 LMU
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>	17_S_eq_zoo	2865/2011 LMU
<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i>	18_S_eq_eq	5916/2002 LMU
<i>Taylorella equigenitalis</i>	19_Tay_eq	0518/2006 LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	20_Arc_pyo	4653/2011
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>	21_Strep_dys	4802/2011
<i>Acinetobacter baumannii</i>	22_Aci_baum	4784/2011
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	23_Fuso_necro	4791/2011
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24_S_pneumoniae	Curetis, A 151
<i>Clostridium difficile</i>	25_Cl_difficile	Uni Tübingen ST 1347 (humaner Ursprung)

**Tabelle 34:** Primermischungen für die Positivproben der Multiplex-PCR

<b>Gemisch 1</b>	<b>Gemisch 2</b>
S.pneumoniae_2450_F S.pneumoniae_2804_R Cl.perfringens_761_F Cl.perfringens_956_R Entero_895_F Entero_1457_R	A.equuli+suis_620_F A.equuli+suis_813_R R.equi_129_F R.equi_528_R Sequiequi_158_F Sequi_435_R
<b>Gemisch 3</b>	<b>Gemisch 4</b>
Cl.difficile_2181_F Cl.difficile_2377_R Listeria sp._481_F Listeria sp._770_R S.enterica_1678_F S.enterica_2078_R	S.aureu_1056_F S.aureu_1242_R P.aerug_124_F P.aerug_686_R Strep.sp_789_F Strep.sp_1285_R
<b>Gemisch 5</b>	<b>Gemisch 6</b>
Proteus_1851_F Proteus_2049_R Strep_equi_608_F Strep_equi_894_R S.epi_2171_F S.epi_2868_R	S.dysgalactiae_1018_F S.dysgalactiae_1317_R K.pneu_1300_F K.pneu_1541_R Ecoli_857_F Ecoli_1319R

**Tabelle 35:** Verwendete Geräte im Labor

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipette	Eppendorf Research plus 1000 (100-1000 µl)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf Research plus 100 (10-100 µl)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf Research plus 10 (0,5-10 µl)	Eppendorf
Vortexer für Safe Lock Tubes	IKA® MS 3 basic Vortexer	IKA®
Zentrifuge	Heraeus Biofuge® fresco	Heraeus
Sicherheitswerkbank (clean bench)	HERAsafe Sicherheitswerkbank	Thermo Electron Corporation
Thermomixer	Thermomixer® compact Eppendorf	Eppendorf
Thermocycler	Mastercycler epigradient Eppendorf	Eppendorf
Vortexer für Agilent Bioanalyzer Chip	IKA® Works Vortexer	IKA®
Auswertung der PCR	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
Bestimmung der Trübung der Bakteriensuspension	Genesys 10 UV Spectrophotometer	Thermo
Inkubator	Brutschrank Incubat Typ 85	Melag

**Tabelle 36:** Verwendete Materialien

Verwendung	Material	Hersteller
Stabilisierungsröhrchen	15 ml - Zentrifugenröhrchen	Neolab
Stabilisierung der Blutproben	AI-Puffer (Buffer AL, QIAamp DNA Blood Mini Kit)	QIAGEN
Blutkulturflaschen	OXOID Signal® Blood Culture System	OXOID
Gefäße für PCR-Blutproben und Blutkulturproben	Eppendorf tubes: Safe Lock Tubes, 1,5 ml PCR clean	Eppendorf
Aufnahme fester Probenmaterialien	PBS=Phosphat bufferd saline	Sigma-Aldrich
DNA-Aufreinigung/Isolation	QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	QIAGEN Protease stock solution (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	Ethanol 100%	Carl Roth
DNA-Aufreinigung/Isolation	Buffer AW1 (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	Buffer AW2 (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	Buffer AE (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	QIAGEN Multiplex PCR Kit	QIAGEN
DNA-Aufreinigung/Isolation	Nukleasefreies Wasser (Nuclease Free Water)	QIAGEN
Reaktionsansatz PCR	Mastermix (Multiplex PCR-Kit)	QIAGEN
Pipettenspitzen	Eppendorf Dualfildertips 0,5-10 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf Dualfildertips 2-100 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf Dualfildertips 50-1000 µl	Eppendorf
PCR-Reaktionsgefäße	PCR-Reaktionsgefäße 200 µl 12er Strips	Neolab
Auswertung der PCR	Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies DNA Kits & Reagents
Einmalspritzen	Einmalspritzen 20 ml	verschiedene Hersteller
Einmalkanülen	Einmalkanülen verschiedene Größen	verschiedene Hersteller
Venenpunktionskanülen	Venenpunktionskanülen	verschiedene Hersteller
Primer-mischungen	Primer (Anhang 4)	Microsynth
Kultivierung von Mikroorganismen	Schokoladen-Agar mit Vitox	Oxoid
Kultivierung von Mikroorganismen	Columbia Agar-Fertigplatte mit Schafblut „PLUS“	Oxoid
Kultivierung von Mikroorganismen	LB Broth, Liquid Medium	Sigma-Aldrich

**Tabelle 37:** Anzahl der Bakterienarten pro positiver Sekundärprobe

Bakterien	Anzahl der Bakterien positiver Sekundärproben	Zahl der Analyte									
		Ein	Zwei	Drei	Vier	Fünf	Sechs	Sieben	Acht	Neun	Zehn
Insgesamt	134	2	5	3	1	5	4	2	3	1	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
<i>Clostridium perfringens</i>	6	0	0	0	0	2	2	0	2	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
<i>Actinobacillus equuli</i>	17	2	2	2	0	3	2	2	3	1	0
<i>Rhodococcus equi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus equi</i> spp. <i>equi</i>	6	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

Bakterien	Anzahl der Bakterien positiver Sekundärproben	Zahl der Analyte									
		Ein	Zwei	Drei	Vier	Fünf	Sechs	Sieben	Acht	Neun	Zehn
<i>Streptococcus</i> sp.	19	0	2	2	1	4	4	2	2	1	1
<i>Proteus</i> sp.	18	0	2	1	1	4	3	2	3	1	1
<i>Streptococcus equi</i> + <i>zooepidemicus</i>	9	0	0	1	0	2	3	0	1	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	0	1	1	1	0	3	1	0	1	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	10	0	0	0	1	2	1	2	2	1	1
<i>Clostridium difficile</i>	6	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0
<i>Escherichia coli</i>	12	0	0	0	0	4	2	2	3	1	0

**Tabelle 38:** Bakterien der positiven PCR-Blutproben vs. sterilen Blutkulturen

Bei 30 Proben wiesen die PCR-Blutanalysen ein positives Ergebnis auf. Die zugehörigen Blutkulturen waren steril. Auschnitt aus Tabelle 20

UP-positiv = Universal-Primer zeigte ein positives Signal

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR
1_004	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_006	negativ	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Clostridium difficile</i>
1_008	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1_011	negativ	<i>Staphylococcus aureus</i> UP-positiv
1_013	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Proteus sp.</i>
1_014	negativ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_015	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>
1_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_023	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus sp.</i>
1_025	negativ	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Actinobacillus equuli</i> <i>Listeria</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus sp.</i> UP-positiv
1_027	negativ	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> UP-positiv
1_032	negativ	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_035	negativ	<i>Proteus sp.</i>
1_036	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1_037	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
1_038	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus sp.</i>
1_040	negativ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3_003	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>
3_009	negativ	<i>Streptococcus sp.</i>
3_010	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
3_021	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>
4_002	negativ	<i>Streptococcus sp.</i> UP-positiv
6_009	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>
6_015	negativ	<i>Actinobacillus equuli</i>

Proben-nr.	Blut-Kultur	Blut-PCR
		<i>Streptococcus equi ssp. equi</i>
6_022	negativ	<i>Streptococcus equi ssp. zooepidemicus</i> UP-positiv
6_023	negativ	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
6_029	negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6_031	negativ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
6_040	negativ	<i>Clostridium perfringens</i>
6_045	negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i> UP-positiv

**Tabelle 39:** Gegenüberstellung der Ergebnisse der Blutproben von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Pferden

Proben-nr.	Altersgruppe	Vorbehandelt	PCR-Ergebnis	Ergebnis der Blutkultur
1_003	Adult	ja	negativ	negativ
1_013	Adult	ja	positiv	negativ
1_016	Adult	ja	negativ	negativ
1_021	Adult	ja	positiv	negativ
1_027	Adult	ja	positiv	negativ
3_001	Adult	ja	negativ	negativ
3_002	Fohlen	ja	positiv	<i>Staphylococcus xylosus</i>
3_003	Fohlen	ja	positiv	negativ
3_008	Fohlen	ja	negativ	negativ
3_009	Fohlen	ja	positiv	negativ
3_010	Fohlen	ja	positiv	negativ
3_011	Adult	ja	negativ	negativ
3_012	Adult	ja	negativ	negativ
3_015	Fohlen	ja	negativ	<i>Pantonea sp.</i>
3_018	Fohlen	ja	negativ	negativ
3_020	Fohlen	ja	negativ	negativ
3_021	Fohlen	ja	positiv	negativ
4_001	Adult	ja	positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>
4_002	Adult	ja	positiv	negativ
6_003	Adult	ja	negativ	negativ
6_008	Adult	ja	positiv	negativ

Proben-nr.	Alters-gruppe	Vorbehandelt	PCR-Ergebnis	Ergebnis der Blutkultur
6_015	Adult	ja	positiv	negativ
6_022	Adult	ja	positiv	negativ
6_024	Adult	ja	positiv	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
6_036	Adult	ja	negativ	negativ
6_040	Fohlen	ja	positiv	negativ
6_044	Adult	ja	negativ	negativ
6_045	Adult	ja	positiv	negativ
1_001	Adult	nein	negativ	negativ
1_002	Adult	nein	negativ	negativ
1_004	Adult	nein	positiv	negativ
1_005	Adult	nein	negativ	negativ
1_006	Adult	nein	positiv	negativ
1_007	Adult	nein	negativ	negativ
1_008	Adult	nein	positiv	negativ
1_009	Adult	nein	negativ	negativ
1_010	Adult	nein	positiv	negativ
1_011	Adult	nein	positiv	negativ
1_012	Adult	nein	negativ	<i>Staphylococcus hominis</i> spp. <i>hominis</i>
1_014	Adult	nein	positiv	negativ
1_015	Adult	nein	positiv	negativ
1_017	Adult	nein	negativ	negativ
1_018	Adult	nein	negativ	negativ
1_019	Adult	nein	negativ	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.
1_020	Adult	nein	negativ	negativ
1_022	Adult	nein	negativ	negativ
1_023	Adult	nein	positiv	negativ
1_024	Adult	nein	positiv	KNS
1_025	Adult	nein	positiv	negativ
1_026	Adult	nein	positiv	negativ
1_028	Adult	nein	positiv	<i>Bacillus</i> sp.
1_029	Fohlen	nein	negativ	negativ
1_030	Adult	nein	positiv	negativ
1_031	Fohlen	nein	negativ	negativ



Proben-nr.	Alters-gruppe	Vorbehandelt	PCR-Ergebnis	Ergebnis der Blutkultur
1_032	Fohlen	nein	positiv	negativ
1_033	Adult	nein	negativ	negativ
1_034	Adult	nein	positiv	<i>Bacillus</i> sp.
1_035	Adult	nein	positiv	negativ
1_036	Adult	nein	positiv	negativ
1_037	Adult	nein	positiv	negativ
1_038	Adult	nein	positiv	negativ
1_039	Adult	nein	negativ	negativ
1_040	Adult	nein	positiv	negativ
1_041	Adult	nein	positiv	negativ
1_042	Adult	nein	negativ	<i>Acinetobacter</i> sp.
1_043	Adult	nein	negativ	negativ
1_044	Adult	nein	negativ	negativ
1_045	Fohlen	nein	negativ	negativ
1_046	Fohlen	nein	negativ	negativ
1_047	Fohlen	nein	negativ	negativ
1_048	Fohlen	nein	negativ	negativ
3_004	Fohlen	nein	negativ	negativ
3_005	Fohlen	nein	positiv	<i>Staphylococcus equorum</i>
3_006	Fohlen	nein	positiv	<i>Aerococcus viridans</i>
3_007	Fohlen	nein	positiv	<i>Streptococcus uberis</i>
3_014	Fohlen	nein	negativ	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
3_016	Fohlen	nein	positiv	negativ
3_017	Fohlen	nein	negativ	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
3_019	Fohlen	nein	negativ	negativ
3_022	Fohlen	nein	positiv	<i>E. coli</i>
3_023	Fohlen	nein	negativ	<i>Staphylococcus warneri</i>
3_024	Fohlen	nein	negativ	negativ
6_001	Adult	nein	negativ	negativ
6_002	Adult	nein	negativ	negativ
6_004	Adult	nein	negativ	negativ
6_005	Adult	nein	positiv	Propionibakterium
6_006	Adult	nein	negativ	negativ

Proben-nr.	Alters-gruppe	Vorbehandelt	PCR-Ergebnis	Ergebnis der Blutkultur
6_009	Adult	nein	positiv	negativ
6_016	Adult	nein	negativ	negativ
6_017	Fohlen	nein	negativ	vergrünende Streptokokken, KNS, <i>Staphylococcus</i> sp.
6_018	Adult	nein	positiv	<i>Staphylococcus aureus</i>
6_023	Adult	nein	positiv	negativ
6_025	Adult	nein	negativ	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>
6_029	Adult	nein	positiv	negativ
6_030	Adult	nein	negativ	<i>Acinetobacter</i> sp.
6_031	Adult	nein	positiv	negativ
6_032	Adult	nein	positiv	<i>Burkholderia</i> sp.
6_037	Adult	nein	negativ	negativ
6_038	Adult	nein	negativ	negativ
6_043	Adult	nein	positiv	<i>Acinetobacter</i> sp., vergrünende Streptokokken, <i>Clostridium clostridiforme</i>
7_001	Adult	nein	negativ	negativ

# X Anhänge

## Anhang 1

### **Merkblatt: Einschlusskriterien**

Symptome/Kriterien:

- **Fieber  $\geq 38,5$  °C oder Hypothermie**
- Tachypnoe/ Dyspnoe
- Tachykardie
- Leukozytose **oder** Leukopenie
- Neutrophilie (Linksverschiebung → unreife / stabkernige Neutrophile)

in Kombination mit: Mattigkeit, Apathie, Anorexie und Unruhe

- Schleimhäute: hochgradig gerötet **oder** blass ( KFZ: > 2 sec.)
- Geschwollene / vergrößerte Lymphknoten
- Nasenausfluss (serös, purulent)

Krankheitsbilder:

- Abszesse
- Kolik
- Colitis „X“
- Druse
- Phlegmone
- Wundinfektion nach Verletzung oder OPs

## Anhang 2

### **Anleitung für sterile Blutentnahme**

- Entnahmestelle: Vena jugularis rechts oder links
- Rasur der Entnahmestelle, Desinfektion mit Alkohol oder Povidon-iod-Lösung (**bitte Handschuhe anziehen**)
- 20 ml-Spritze + sterile Kanüle (**bitte Handschuhe anziehen**), Spritze mit Blut füllen
- Kanüle und Handschuhe **wechseln**
- Entfernen des Plastikschutzes von der Blutkulturflasche und **Desinfektion** des **Gummiverschluss**
- Blutkulturflasche mit **steriler** Kanüle und **10 ml** des entnommen Blutes beimpfen.
- **2 ml** des entnommenen Blutes in die vorbereiteten Stabilisierungsröhrchen. Gut schwenken und bei ca. 4 - 8 °C (**Kühlschrank**) lagern.
- Blutkultur bei **Raumtemperatur** (25 °C) lagern und innerhalb der nächsten 48 Stunden ins Labor schicken
- Wenn möglich eine **Sekundärprobe** (Nasentupfer, Eiter aus Abszess, Wundsekret...) entnehmen.

**Anhang 3****Befundbogen**

<b>Einsendende Praxis / Klinik:</b>  Name:  Straße:  PLZ/Ort:	<b>Daten des Pferdes:</b>  Probennummer: Name: Alter: Geschlecht: Besitzer:
<b>Untersuchungsmaterial:</b>  Blut: <input type="checkbox"/>  Sonstiges: <input type="checkbox"/> _____	<b>Entnahmedatum:</b>  _____  Tag/Monat/Jahr

**Vorbericht:** (unbedingt erforderlich)

antibiotische Vorbehandlung:

nein  ja  Dauer: \_\_\_\_\_Tage  
 zuletzt am: \_\_\_\_\_  
 Tag/Monat/Jahr

Antibiotikum: \_\_\_\_\_

**Symptome/Klinische Erscheinungen:**

	Ja	Nein	
• Fieber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Grad (°C): _____
• Hypothermie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Grad (°C): _____
• Tachykardie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anzahl/Minute: _____
• Tachypnoe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anzahl/Minute: _____
• Leukopenie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Werte (mit Einheit): _____
• Leukozytose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Werte (mit Einheit): _____
• Neutrophilie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Werte (mit Einheit): _____
(Linksversch.)			
• Sonstige:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____

**Anhang 4**

Name	F-Sequenz	R-Sequenz	Primerlänge	Fragmentlänge	Organismus
A.equuli+suis_620_F	CGCCGGCGTAGATTGTAGA		19	193	<i>Actinobacillus equuli</i> + <i>A. suis</i>
A.equuli+suis_813_R		TACTGGGGCTTCGATCAGGA	20		
Cl.difficile_2181_F	TGTAGTACTGGGACTCTAACCAT		23	195	<i>Clostridium difficile</i>
Cl.difficile_2377_R		ATCCTTGCTCGACCTGTATGTCTT	24		
Cl.perfringens_761_F	CCTCGTGGAGGACCGAACCA		20	222	<i>Clostridium perfringens</i>
Cl.perfringens_956_R		CTGCCGAGCTCAAAGTATGTG	21		
Entero_895_F	ACCAACCCGATGCAAACCTA		20	562	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> ,
Entero_1457_R		AACCGTCGCCGGCT	15		
Ecoli_857_F	GGTAGAGCACTGTTTCGGCA		20	462	<i>Escherichia coli</i>
Ecoli_1319R		GACAGGAACCCCTTGGTCTTC	20		
K.pneu_1300_F	TTGTCCAGGCAAATCCGGAT		20	280	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
K.pneu_1541_R		GCTGGTATCTTCGACTGGTC	20		
Listeria sp._481_F	ACCGGCGAGTTACGATTTGT		20	289	<i>Listeria</i> sp. (v.a. <i>L. monocytogenes</i> )
Listeria sp._770_R		TCTACCTCCATGACTCTTTACCTC	24		
Proteus_1851_F	GCTGTCTGAGCCTTCCCACT		20	601	<i>Proteus</i> sp.
Proteus_2049_R		GGGGGTAGAGCACTGTTTCGA	21		
P.aerug_124_F	CCGTACGCGAAAGGATCTTTG		21	601	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P.aerug_686_R		CCCATGCTCGGCACTTCTG	19		
R.equi_129_F	TGAATCAGTGATGCTAAGCG		20	400	<i>Rhodococcus equi</i>
R.equi_528_R		GTTCCGTCACCAGACGA	17		
S.enterica_1678_F	GTTCCAGGTAAATCCGGTT		19	419	<i>Salmonella enterica</i>
S.enterica_2078_R		TTTACCGGGGCTTCGATCAG	20		
S.aureu_1056_F	GGGCGTTGAAGCATGATCGT		20	227	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.aureu_1242_R		CCCCATCGATTAACGATTA	22		
S.epi_2171_F	CTAGCTTACGTGGAGGCGT		19	698	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S.epi_2868_R		CCACCTCGAACCTATTAACCTCG	23		
S.dysgalactiae_1018_F	GTACCGGGGCTAAAACATAT		21	299	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
S.dysgalactiae_1317_R		TACTGCGTCCCTCCATCACTT	21		
Sequiequi_158_F	AAACAACAGAATTTGACTACCAG		23	278	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i>
Sequi_435_R		GCTCATAACAGTCTCATGGTAA	22		

Name	F-Sequenz	R-Sequenz	Primerlänge	Fragmentlänge	Organismus
Strep_equi_608_F	AACCGGCGAGTTACGTTTAT		20	287	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> oder <i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>
Strep_equi_894_R		CTACCTCCAAGAGACTTCATATC	23		
S.pneumoniae_2450_F	CCAAGAGTTCACATCGACGG		20	354	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
S.pneumoniae_2804_R		CTCTCAGGGCTTACTGATATAT	24		
Strep.sp_789_F	TTGGATGACTTGTGGGTAGC		20	501	<i>Streptococcus</i> sp.
Strep.sp_1285_R		CGGCATTCTCACTTCTATGC	20		
Universal_F	GCGATTCYGAAYGGGGRAACCC		23	371	Universal Primer (Anthony, Brown, and French 2000)
Universal_R		TTCGCCTTCCCTCACGGTACT	22		

## XI Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicans
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BK	Blutkultur
BKF	Blutkulturflasche
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome
CFU	colony forming unit = koloniebildende Einheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
Enro	Enrofloxacin
F-Primer	Forward-Primer
GT	Gefrierschranktemperatur
H	Hengst
h	Stunde
Hg	Quecksilber

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
ID	Kennung, Identifikator
J	Jahr(e)
k.A.	kein Angabe
KFZ	kapilläre Füllungszeit
KNS	koagulase-negative Staphylokokken
KT	Kühlschranktemperatur
LB	Lysogeny Broth
LMU	Ludwig-Maximilians-universität
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight mass spectrometer
min	Minute
ml	Milliliter
Mo	Monat(e)
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome = Multiples Organversagen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nM	Nanomolar = nmol/l
nmol	Nanomol
nr	non-redundant
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Konzentrationsbestimmung (optische Dichte) bei 600 nm
OP	Operation
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphat bufferd saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen-Procaïn	Penicillin-Procaïn



---

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PRRs	Pattern Recognition Receptors
R-Primer	Reverse-Primer
RT	Raumtemperatur
S	Stute
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SCCM	Society of Critical Care Medicine
sec	Sekunde
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
Std	Stunde(n)
<i>Strep.</i>	<i>Streptococcus</i>
Taq	Thermophilus aquaticus
Tg	Tag(e)
Trim-Sulf	Trimetoprim-Sulfatrim
Tula	Tulathromycin
UP	Universal Primer
VAH	Verbund für angewandte Hygiene
vs.	versus
W	Wallach
Wo	Woche(n)
z.B.	zum Beispiel

## XII Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zuordnung der Kliniken zu den Probennummern.....	38
<b>Tabelle 2:</b> Sekundärproben und deren Probengefäße.....	40
<b>Tabelle 3:</b> Aufreinigung der Proben .....	43
<b>Tabelle 4:</b> Kriterien für das Primerdesign .....	45
<b>Tabelle 5:</b> Pipettierschema zur Herstellung der Primermischungen für die Multiplex-PCR (für Studienproben).....	46
<b>Tabelle 6:</b> Pipettierschema zur Herstellung der Primermischung des Universal-Primer bzw. für die Singleplex-PCR .....	46
<b>Tabelle 7:</b> PCR-Ansatz für die Multiplex-PCR (für Studienproben) .....	47
<b>Tabelle 8:</b> Formulare der Datenbank .....	49
<b>Tabelle 9:</b> Pipettierschema zur Herstellung der Primermischung für den Lagerungstest.....	52
<b>Tabelle 10:</b> PCR-Ansatz für Lagerungstest .....	52
<b>Tabelle 11:</b> PCR-Ansatz für die Singleplex-PCR .....	53
<b>Tabelle 12:</b> PCR-Ansatz für die Positivkontrollen der Multiplex-PCR .....	53
<b>Tabelle 13:</b> Verdünnung der Bakteriensuspension.....	54
<b>Tabelle 14:</b> Lagerung von $10^5$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml bei RT, KT und GT .....	56
<b>Tabelle 15:</b> Lagerung von $10^3$ <i>E. coli</i> Bakterien/ml bei KT .....	57
<b>Tabelle 16:</b> Positivkontrolle für die Singleplex-PCR.....	57
<b>Tabelle 17:</b> Positivkontrolle für die Multiplex-PCR.....	58
<b>Tabelle 18:</b> Einsatz von Antibiotika in den verschiedenen Altersgruppen durch gewichtete Zahlen.....	63
<b>Tabelle 19:</b> Ergebnisse der Blutproben der Kontrollgruppen.....	64
<b>Tabelle 20:</b> Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse aller Studienproben .....	65
<b>Tabelle 21:</b> PCR Ergebnisse vs. Blutkultur-Ergebnisse .....	78
<b>Tabelle 22:</b> Anzahl der Bakterienarten pro positiver PCR-Blutprobe .....	81
<b>Tabelle 23:</b> Vorkommen und Anzahl der Bakterienarten der nicht sterilen Blutkulturen .....	82
<b>Tabelle 24:</b> Detektierte Mikroorganismen in positiven PCR-Blutanalysen bzw. nicht sterilen Blutkulturen.....	85
<b>Tabelle 25:</b> Detektierte Mikroorganismen in positiven Blutkulturen vs. negativer PCR- Blutanalysen .....	86

---

<b>Tabelle 26:</b> Vergleich der Ergebnisse der PCR-Blutanalysen mit denen der Blutkulturen vorbehandelter Pferde. Ausschnitt aus Tabelle 20 .....	87
<b>Tabelle 27:</b> Vergleich der Ergebnisse der PCR-Blutproben und Blutkulturen vorbehandelter und nicht vorbehandelter Pferde .....	89
<b>Tabelle 28:</b> Signalhöhen der PCR-Proben .....	93
<b>Tabelle 29:</b> Liste der in die Studie eingeschlossenen Pferde und Fohlen mit Angaben zur Altersklasse, zum Alter, Geschlecht, zur Probenart und zu den klinischen Veränderungen. ....	115
<b>Tabelle 30:</b> Verwendete Software für das Primerdesign.....	120
<b>Tabelle 31:</b> Primermischungen für die Multiplex-PCR (für Studienproben).....	120
<b>Tabelle 32:</b> PCR-Programm .....	121
<b>Tabelle 33:</b> Bakterienisolate .....	121
<b>Tabelle 34:</b> Primermischungen für die Positivproben der Multiplex-PCR.....	122
<b>Tabelle 35:</b> Verwendete Geräte im Labor.....	122
<b>Tabelle 36:</b> Verwendete Materialien .....	123
<b>Tabelle 37:</b> Anzahl der Bakterienarten pro positiver Sekundärprobe .....	124
<b>Tabelle 38:</b> Bakterien der positiven PCR-Blutproben vs. sterilen Blutkulturen.....	126
<b>Tabelle 39:</b> Gegenüberstellung der Ergebnisse der Blutproben von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Pferden .....	127

### **XIII Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Der Zusammenhang zwischen systemischer inflammatorischer Reaktion (SIRS), Sepsis und Infektion (Bone et al. 1992) .....	31
<b>Abbildung 2:</b> Altersangabe.....	60
<b>Abbildung 3:</b> Altersverteilung in den Kliniken/Praxen .....	61
<b>Abbildung 4:</b> Vorbehandlung.....	62
<b>Abbildung 5:</b> Vergleich der Ergebnisse von PCR-Analysen und Blutkulturen.....	77
<b>Abbildung 6:</b> Bakterielle Erreger der positiven mittels PCR untersuchten Blutproben .....	80
<b>Abbildung 7:</b> Bakterielle Erreger der positiven Sekundärproben, die mittels einer PCR-Analyse untersucht wurden. ....	84

## XIV Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies. n.d. "Eine Plattform - Zahlreiche Möglichkeiten Für Die Analyse von DNA, RNA, Proteinen Und Zellen". © Copyright 2008 Agilent Technologies Gedruckt am 1. Februar 2008 Publikation Nummer 5989-7725DEE.
- Al-Khatib, Khaldun, and Daniel J J Carr. n.d. "Relative Quantitation of mRNA: Real-Time PCR vs. End-Point PCR." *Www.bio-Rad.com*.
- Allen, Joanne L, Angela P Begg, and Glenn F Browning. 2011. "Outbreak of Equine Endometritis Caused by a Genotypically Identical Strain of *Pseudomonas Aeruginosa*." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 23 (6): 1236–39. doi:10.1177/1040638711425589.
- Alley, M. R., J. H. Connolly, S. G. Fenwick, G. F. Mackereth, M. J. Leyland, L. E. Rogers, M. Haycock, C. Nicol, and C. E. M. Reed. 2002. "An Epidemic of Salmonellosis Caused by *Salmonella Typhimurium* DT160 in Wild Birds and Humans in New Zealand." *New Zealand Veterinary Journal* 50 (5): 170–76. doi:10.1080/00480169.2002.36306.
- Allocati, Nerino, Michele Masulli, Mikhail F Alexeyev, and Carmine Di Ilio. 2013. "Escherichia Coli in Europe: An Overview." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (12): 6235–54. doi:10.3390/ijerph10126235.
- Altschul, S F, W Gish, W Miller, E W Myers, and D J Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Annane, Djillali, Eric Bellissant, and Jean-Marc Cavillon. 2005. "Septic Shock." *Lancet* 365 (9453): 63–78. doi:10.1016/S0140-6736(04)17667-8.
- Anthony, R M, T J Brown, and G L French. 2000. "Rapid Diagnosis of Bacteremia by Universal Amplification of 23S Ribosomal DNA Followed by Hybridization to an Oligonucleotide Array." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2): 781–88.
- Anzai, T, A Nakanishi, R Wada, T Higuchi, S Hagiwara, M Takazawa, K Oobayashi, and T Inoue. 1997. "Isolation of *Streptococcus Equi* Subsp. *Equi* from Thoroughbred Horses in a Racehorse-Breeding Area of Japan." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 59 (11): 1031–33.
- Ashurst-Smith, C, R Norton, W Thoreau, and M M Peel. 1998. "Actinobacillus Equuli Septicemia: An Unusual Zoonotic Infection." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (9): 2789–90.
- Auer, Jörg A., and John A. Stick. 2006. *Equine Surgery*. Saunders Elsevier: 9-10.
- Aurich, Christine. 2005. *Reproduktionsmedizin beim Pferd: Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe*. Georg Thieme Verlag: 9-13; 41; 44; 86-89; 163-165; 228-232; 255.
- Balk, R A. 2000. "Severe Sepsis and Septic Shock. Definitions, Epidemiology, and Clinical Manifestations." *Critical Care Clinics* 16 (2): 179–92.
- Beier, R., G. Amtsberg, and M. Peters. 1994. "Bakteriologische Untersuchung Zum Vorkommen Und Zur Bedeutung von *Clostridium Difficile* Beim Pferd" 10 (1): 3–8.
- Benavente, CE, and IC Fuentealba. 2012. "Actinobacillus Suis and Actinobacillus Equuli, Emergent Pathogens of Septic Embolic Nephritis, a New Challenge for the Swine Industry." 2012, Review Article, , no. 44: 99–107.
- Benson, C E, and C R Sweeney. 1984. "Isolation of *Streptococcus Pneumoniae* Type 3 from Equine Species." *Journal of Clinical Microbiology* 20 (6): 1028–30.
- Berlin, Dalia, Gal Kelmer, Amir Steinman, and Gail A. Sutton. 2013. "Successful Medical

- Management of Intra-Abdominal Abscesses in 4 Adult Horses." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 54 (2): 157–61.
- Bernoco, M. M., I. K. Liu, and N. H. Willits. 1994. "Hemolytic Complement Activity and Concentrations of Its Third Component during Maturation of the Immune Response in Colostrum-Deprived Foals." *American Journal of Veterinary Research* 55 (7): 928–33.
- Bisgaard, M., K. Piechulla, Y. T. Ying, W. Frederiksen, and W. Mannheim. 1984. "Prevalence of Organisms Described as *Actinobacillus Suis* or Haemolytic *Actinobacillus Equuli* in the Oral Cavity of Horses. Comparative Investigations of Strains Obtained and Porcine Strains of *A. Suis Sensu Stricto*." *Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 92 (6): 291–98.
- Bolton, Tim, Kyle Kuskie, Natalie Halbert, Keith Chaffin, Mimi Healy, Sara Lawhon, Amanda Jackson, and Noah Cohen. 2010. "Detection of Strain Variation in Isolates of *Rhodococcus Equi* from an Affected Foal Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22 (4): 611–15.
- Bone, R C, R A Balk, F B Cerra, R P Dellinger, A M Fein, W A Knaus, R M Schein, and W J Sibbald. 1992. "Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine." *Chest* 101 (6): 1644–1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644.
- Bone, R C, C J Grodzin, and R A Balk. 1997a. "Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process." *Chest* 112 (1): 235–43.
- Bone, R C, W J Sibbald, and C L Sprung. 1992. "The ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure." *Chest* 101 (6): 1481–83.
- Bone, R. C., C. J. Grodzin, and R. A. Balk. 1997b. "Sepsis: A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process." *Chest* 112 (1): 235–43.
- Boyle, Ashley. 2011. "Streptococcus Equi Subspecies Equi Infection (strangles) in Horses." *Compendium (Yardley, PA)* 33 (3): E1–7; quiz E8.
- Brady, CA., and CM. Otto. 2001. "Systemic Inflammatory Response Syndrome, Sepsis and Multiple Organ Dysfunction." 31 (6): 1147–62.
- Bryans, J. T., null Falloneh, and B. P. Shephard. 1961. "Equine Salmonellosis." *The Cornell Veterinarian* 51 (October): 467–77.
- Buckley, Graham. 1989. "MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA (29th Edition)." *The Journal of the Royal College of General Practitioners* 39 (327): 440.
- Busscher, J F, E van Duijkeren, and M M Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan. 2006. "The Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococci in Healthy Horses in the Netherlands." *Veterinary Microbiology* 113 (1-2): 131–36. doi:10.1016/j.vetmic.2005.10.028.
- Christensen, Henrik, Magne Bisgaard, and John Elmerdahl Olsen. 2002. "Reclassification of Equine Isolates Previously Reported as *Actinobacillus Equuli*, Variants of *A. Equuli*, *Actinobacillus Suis* or Bisgaard Taxon 11 and Proposal of *A. Equuli* Subsp. *Equuli* Subsp. Nov. and *A. Equuli* Subsp. *Haemolyticus* Subsp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (Pt 5): 1569–76.
- Clark, Chris, Sarah Greenwood, Joe O. Boison, Manuel Chirino-Trejo, and Patricia M. Dowling. 2008. "Bacterial Isolates from Equine Infections in Western Canada (1998-2003)." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 49 (2):

- 153–60.
- Clark, E G, A S Turner, B G Boysen, and B T Rouse. 1978. "Listeriosis in an Arabian Foal with Combined Immunodeficiency." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172 (3): 363–66.
- Cockerill, F. R., J. W. Wilson, E. A. Vetter, K. M. Goodman, C. A. Torgerson, W. S. Harmsen, C. D. Schleck, D. M. Ilstrup, J. A. Washington, and W. R. Wilson. 2004. "Optimal Testing Parameters for Blood Cultures." *Clinical Infectious Diseases* 38 (12): 1724–30. doi:10.1086/421087.
- Cohen, N D. 1994. "Causes of and Farm Management Factors Associated with Disease and Death in Foals." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204 (10): 1644–51.
- Corley, K. T. T, G. Pearce, K. G Magdesian, and W. D Wilson. 2007. "Bacteraemia in Neonatal Foals: Clinicopathological Differences between Gram-positive and Gram-negative Infections, and Single Organism and Mixed Infections." *Equine Veterinary Journal* 39 (1): 84–89. doi:10.2746/042516407X157585.
- Corrente, Marialaura, Maria D'Abramo, Francesca Latronico, Maria Fiorella Greco, Anna Lucia Bellacicco, Grazia Greco, Vito Martella, and Domenico Buonavoglia. 2009. "Methicillin-Resistant Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Horses." *The New Microbiologica* 32 (3): 311–14.
- Daley, C., I. Lim, J. Modra, and I. Wilkinson. 1990. "Comparative Evaluation of Nonradiometric BACTEC and Improved Oxoid Signal Blood Culture Systems in a Clinical Laboratory." *Journal of Clinical Microbiology* 28 (7): 1586–90.
- De Laforcade, AM. de, LM. Freeman, SP. Shaw, MB. Brooks, ES. Rozanski, and JE. Rush. 2003. "Hemostatic Changes in Dogs with Naturally Occuring Sepsis." 17 (5): 674–79.
- Dedié, Kurt. 1993. *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch: Epidemiologie, Pathologie, Klinik, Diagnostik und Bekämpfung*. Enke.
- Diab, S S, H Kinde, J Moore, M F Shahriar, J Odani, L Anthenill, G Songer, and F A Uzal. 2012. "Pathology of Clostridium Perfringens Type C Enterotoxemia in Horses." *Veterinary Pathology* 49 (2): 255–63. doi:10.1177/0300985811404710.
- Diab, S S, G Songer, and F A Uzal. 2013. "Clostridium Difficile Infection in Horses: A Review." *Veterinary Microbiology* 167 (1-2): 42–49. doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.032.
- Dierkes, Christine, Boris Ehrenstein, Sylvia Siebig, Hans-Jörg Linde, Udo Reischl, and Bernd Salzberger. 2009. "Clinical Impact of a Commercially Available Multiplex PCR System for Rapid Detection of Pathogens in Patients with Presumed Sepsis." *BMC Infectious Diseases* 9: 126. doi:10.1186/1471-2334-9-126.
- Dietz, Olof, and Huskamp, Bernhard. 2006. *Handbuch Pferdepraxis*. Georg Thieme Verlag: 156-158; 226-227; 321-322; 342-346; 709-711.
- Dow, S.W., and Jones, R.L. 1989. "Bacteremia: Pathogenesis an Diagnosis." 1989, no. 11: 432–43.
- Engel, Christoph, Frank M. Brunkhorst, and Hans-Georg Bone. 2007. "Epidemiology of Sepsis in Germany: Results from a National Prospective Multicenter Study.", no. 33: 606–18.
- Erol, Erdal, Stephan J Locke, Judy K Donahoe, Mary A Mackin, and Craig N Carter. 2012. "Beta-Hemolytic Streptococcus Spp. from Horses: A Retrospective Study (2000-2010)." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 24 (1): 142–47. doi:10.1177/1040638711434138.
- Fitzgerald, S D, and B Yamini. 1995. "Rhodococcal Abortion and Pneumonia in an Equine Fetus." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the*

- American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 7 (1): 157–58.
- Fox, H., D. E. Healing, and R. H. George. 1988. "Evaluation of Use of Signal System of Blood Culture in Paediatrics." *Journal of Clinical Pathology* 41 (6): 683–86.
- Frederick, J., S. Giguère, and L. C. Sanchez. 2009. "Infectious Agents Detected in the Feces of Diarrheic Foals: A Retrospective Study of 233 Cases (2003-2008)." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 23 (6): 1254–60. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0383.x.
- Freeman, Karen, Emma Woods, Sarah Welsby, Steven L Percival, and Christine A Cochrane. 2009. "Biofilm Evidence and the Microbial Diversity of Horse Wounds." *Canadian Journal of Microbiology* 55 (2): 197–202. doi:10.1139/w08-115.
- Fuchs, Georg. 2007. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Gander, Rita M., Linda Byrd, Michael DeCrescenzo, Shaina Hirany, Michelle Bowen, and Judy Baughman. 2009. "Impact of Blood Cultures Drawn by Phlebotomy on Contamination Rates and Health Care Costs in a Hospital Emergency Department." *Journal of Clinical Microbiology* 47 (4): 1021–24. doi:10.1128/JCM.02162-08.
- Gautsch, S., G. Beckmann, M. Dieckmann, and E. Deegen. 1993. "[The occurrence and significance of enterotoxin-producing Clostridium perfringens strains in the intestinal tract of horses]." *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 106 (1): 1–6.
- Gibbs, R S, J D Blanco, and S Bernstein. 1985. "Role of Aerobic Gram-Negative Bacilli in Endometritis after Cesarean Section." *Reviews of Infectious Diseases* 7 Suppl 4 (December): S690–695.
- Giguère, Steeve, and Amy C. Polkes. 2005. "Immunologic Disorders in Neonatal Foals." *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 21 (2): 241–272, v. doi:10.1016/j.cveq.2005.04.004.
- Giles, R. C., J. M. Donahue, C. B. Hong, P. A. Tuttle, M. B. Petrites-Murphy, K. B. Poonacha, A. W. Roberts, R. R. Tramontin, B. Smith, and T. W. Swerczek. 1993. "Causes of Abortion, Stillbirth, and Perinatal Death in Horses: 3,527 Cases (1986-1991)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 203 (8): 1170–75.
- Glerant, J C, D Hellmuth, J L Schmit, J P Ducroix, and V Jounieaux. 1999. "Utility of Blood Cultures in Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization: Influence of Antibiotic Treatment before Admission." *Respiratory Medicine* 93 (3): 208–12.
- Goehring, L.S., and M. de Bruijn. 2011. "Die Septikämie Beim Fohlen: Ein Hindernisparcours Ohne Ende?" Accessed September 23.
- Grace, Christopher J., John Lieberman, Kristen Pierce, and Benjamin Littenberg. 2001. "Usefulness of Blood Culture for Hospitalized Patients Who Are Receiving Antibiotic Therapy." *Clinical Infectious Diseases* 32 (11): 1651–55. doi:10.1086/320527.
- Gramm, H J, L Hannemann, K Reinhart, and H Lode. 1995. "Sepsis: A Conception in Change. Possibilities and Limitations of Diagnosis Based on Clinical Criteria." *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)* 120 (14): 498–502. doi:10.1055/s-0029-1234199.
- Gruhler, Angela Alice Christine. 2008. "Verlauf Und Prognostischer Parameter Einer Sepsis Bei Neurochirurgischen Intensivpatienten". Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Guerrero, Rosalinda, Ashish Bhargava, and Zeina Nahleh. 2011. "Rhodococcus Equi Venous Catheter Infection: A Case Report and Review of the Literature." *Journal of Medical Case Reports* 5: 358. doi:10.1186/1752-1947-5-358.
- Hackett, E. S., D. P. Lunn, R. A. Ferris, D. W. Horohov, M. R. Lappin, and P. M. McCue. 2014. "Detection of Bacteraemia and Host Response in Healthy Neonatal Foals." *Equine Veterinary Journal*, June. doi:10.1111/evj.12307.



- Haenni, Marisa, Hayette Targant, Karine Forest, Corinne Sévin, Jackie Tapprest, Claire Laugier, and Jean-Yves Madec. 2010. "Retrospective Study of Necropsy-Associated Coagulase-Positive Staphylococci in Horses." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22 (6): 953–56.
- Hagel, S., and F. Brunkhorst. 2011. "Intensivmedizin und Notfallmedizin", no. Intensivmedizin 2011 48:57-73: 57–73.
- Hagel, S., M.W. Pletz, F.M. Brunkhorst, and W.V. Kern. 2013. "Bakteriämie Und Sepsis." 13. März 2013, no. Internist 2013 54 (März): 399–407.
- Hahn, H., S.H.E. Kaufmann, S. Suerbaum, G.-D. Burchard, and Th.F. Schulz. 2009. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer DE: 198-199; 209; 237; 249-250; 339-340; 346-348.
- Hahn, Helmut. 2004. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer.
- Hall, Keri K., and Jason A. Lyman. 2006. "Updated Review of Blood Culture Contamination" 19 (4): 788–802.
- Harada, Akira, Toshifumi Ohkusa, Kaoru Kushima, Mitsuo Sakamoto, Yoshimi Benno, Kazuko Beppu, Tomoyoshi Shibuya, Naoto Sakamoto, and Sumio Watanabe. 2008. "Identification of Bacteria from Blood in Febrile Patients with Ulcerative Colitis by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of 16S rRNA Gene." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 43 (4): 423–30. doi:10.1080/00365520701737229.
- Hardie, E.M. 1995. "Life-threatening bacterial infection." *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 17: 763-777
- Hariharan, H, L McPhee, S Heaney, and J Bryenton. 1995. "Antimicrobial Drug Susceptibility of Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 36 (3): 166–68.
- Hatheway, C L. 1990. "Toxigenic Clostridia." *Clinical Microbiology Reviews* 3 (1): 66–98.
- Hauptmann, J.G., R. Walshaw, and N.B. Oliver. 1997. "Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Diagnostic Criteria for Sepsis in Dogs." 26 (5): 393–97.
- Heininger, A., M. Binder, S. Schmidt, K. Unertl, K. Botzenhart, and G. Döring. 1999. "PCR and Blood Culture for Detection of Escherichia Coli Bacteremia in Rats." *Journal of Clinical Microbiology* 37 (8): 2479–82.
- Himmelreich, C A, M F Orlando, and G A Storch. 1989. "Comparison of the Oxoid Signal Blood Culture System with Supplemented Peptone Broth in a Pediatric Hospital." *Journal of Clinical Microbiology* 27 (6): 1262–65.
- Hirsh, D C, C Kirkham, and W D Wilson. 1993. "Characteristics of Escherichia Coli Isolated from Septic Foals." *Veterinary Microbiology* 34 (2): 123–30.
- Hollis, A R, P A Wilkins, J E Palmer, and R C Boston. 2008. "Bacteremia in Equine Neonatal Diarrhea: A Retrospective Study (1990-2007)." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 22 (5): 1203–9. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0152.x.
- Hong, C B, J M Donahue, R C Giles Jr, M B Petrites-Murphy, K B Poonacha, A W Roberts, B J Smith, R R Tramontin, P A Tuttle, and T W Swerczek. 1993. "Etiology and Pathology of Equine Placentitis." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 5 (1): 56–63.
- Ilstrup, DM, and Washington JA. 1983. "The Importance of Volume of Blood Cultured in the Detection of Bacteraemia and Fungaemia." 1983, 107–10.
- Jauch, Karl-Walter, Wolf Mutschler, Johannes N. Hoffmann, and Karl-Georg Kanz. 2012.

- Chirurgie Basisweiterbildung: In 99 Schritten Durch Den Common Trunk*. Springer-Verlag.
- Kahnt, E., and A. Heusinger. 2008. "Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS" Vol 53 (Heft 1): 51–53.
- Kappstein, Ines. 2009. *Nosokomiale Infektionen: Prävention - Labordiagnostik - Antimikrobielle Therapie*. Georg Thieme Verlag.
- Kidokoro, A, T Iba, M Fukunaga, and Y Yagi. 1996. "Alterations in Coagulation and Fibrinolysis during Sepsis." *Shock (Augusta, Ga.)* 5 (3): 223–28.
- Kloos, W E, R J Zimmerman, and R F Smith. 1976. "Preliminary Studies on the Characterization and Distribution of Staphylococcus and Micrococcus Species on Animal Skin." *Applied and Environmental Microbiology* 31 (1): 53–59.
- Köhler, Werner, and Rainer Ansorg. 2001. *Medizinische Mikrobiologie*. Urban & Fischer.
- Kolm, Gabriela, and Kerstin Fey. 2010. *Fohlenmedizin*. Georg Thieme Verlag: 2-5; 206-212; 296-298; 302-303; 375-376.
- Krawiec, Marta, Maciej Kuczkowski, Andrzej Kruszewicz, and Alina Wieliczko. 2015. "Prevalence and Genetic Characteristics of Salmonella in Free-Living Birds in Poland." *BMC Veterinary Research* 11 (1): 15. doi:10.1186/s12917-015-0332-x.
- Kröz, Monika, O. Geisel, G. Wolf, and W. Hermanns. 1998. "Septische Listeriose bei einem Fohlen - Ein Fallbericht" 14 (4): 317–21.
- Kuhnert, P., H. Berthoud, R. Straub, and J. Frey. 2003. "Host Cell Specific Activity of RTX Toxins from Haemolytic Actinobacillus Equuli and Actinobacillus Suis." *Veterinary Microbiology* 92 (1-2): 161–67.
- Lakritz, J, W D Wilson, C R Berry, M D Schrenzel, G P Carlson, and J E Madigan. 1993. "Bronchointerstitial Pneumonia and Respiratory Distress in Young Horses: Clinical, Clinicopathologic, Radiographic, and Pathological Findings in 23 Cases (1984-1989)." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 7 (5): 277–88.
- Larkin, M A, G Blackshields, N P Brown, R Chenna, P A McGettigan, H McWilliam, F Valentin, et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0." *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21): 2947–48. doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lehmann, Lutz Eric, Klaus-Peter Hunfeld, Thomas Emrich, Gerd Haberhausen, Heimo Wissing, Andreas Hoeft, and Frank Stüber. 2008. "A Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Differentiation of 25 Bacterial and Fungal Pathogens from Whole Blood Samples." *Medical Microbiology and Immunology* 197 (3): 313–24. doi:10.1007/s00430-007-0063-0.
- Leisure, M K, D M Moore, J D Schwartzman, G F Hayden, and L G Donowitz. 1990. "Changing the Needle When Inoculating Blood Cultures. A No-Benefit and High-Risk Procedure." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 264 (16): 2111–12.
- Levin, P. D., M. Hersch, B. Rudensky, and A. M. Yinnon. 2000. "The Use of the Arterial Line as a Source for Blood Cultures." *Intensive Care Medicine* 26 (9): 1350–54.
- Li, J, J J Plorde, and L G Carlson. 1994. "Effects of Volume and Periodicity on Blood Cultures." *Journal of Clinical Microbiology* 32 (11): 2829–31.
- Lin, Yu Tzu, Mario Vaneechoutte, Ay Huey Huang, Lee Jene Teng, Hung-Mo Chen, Shu-Li Su, and Tsung Chain Chang. 2010. "Identification of Clinically Important Anaerobic Bacteria by an Oligonucleotide Array." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4): 1283–90. doi:10.1128/JCM.01620-09.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S. Lawrence, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. 2001. *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Spektrum, Akad. Verlag.

- Lorente, M. L., M. Falguera, A. Nogués, A. R. González, M. T. Merino, and M. R. Caballero. 2000. "Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Whole Blood: A Prospective Clinical Study." *Thorax* 55 (2): 133–37.
- Lottspeich, Friedrich, and Joachim W. Engels. 2012. *Bioanalytik*. Auflage: 3. Aufl. 2012. Heidelberg.: Spektrum Akademischer Verlag.
- Louie, Richard F., Zuping Tang, Timothy E. Albertson, Stuart Cohen, Nam K. Tran, and Gerald J. Kost. 2008. "Multiplex Polymerase Chain Reaction Detection Enhancement of Bacteremia and Fungemia." *Critical Care Medicine* 36 (5): 1487–92. doi:10.1097/CCM.0b013e31816f487c.
- Lucignano, Barbara, Stefania Ranno, Oliver Liesenfeld, Beatrice Pizzorno, Lorenza Putignani, Paola Bernaschi, and Donato Menichella. 2011. "Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis" 49 (6): 2252–58. doi:10.1128/JCM.02460-10.
- Lyerly, D M, K E Saum, D K MacDonald, and T D Wilkins. 1985. "Effects of Clostridium Difficile Toxins given Intragastrically to Animals." *Infection and Immunity* 47 (2): 349–52.
- Madigan, Michael T., Thomas D. Brock, John M. Martinko, David P. Clark, and David A. Stahl. 2013. *Brock Mikrobiologie*. 13th ed. Pearson Studium.
- Mallardo, Karina, Sandra Nizza, Filomena Fiorito, Ugo Pagnini, Luisa De Martino, and Giovanna Donnarumma. 2013. "A Comparative Evaluation of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Harness Racing-Horses, Breeding Mares and Riding-Horses in Italy." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3 (3): 169–73. doi:10.1016/S2221-1691(13)60044-1.
- Mancini, Nicasio, Daniela Clerici, Roberta Diotti, Mario Perotti, Nadia Ghidoli, Donata De Marco, Beatrice Pizzorno, et al. 2008. "Molecular Diagnosis of Sepsis in Neutropenic Patients with Haematological Malignancies." *Journal of Medical Microbiology* 57 (Pt 5): 601–4. doi:10.1099/jmm.0.47732-0.
- Marchandin, H., B. Compan, M. Simeon De Buochberg, E. Despau, and C. Perez. 1995. "Detection Kinetics for Positive Blood Culture Bottles by Using the VITAL Automated System." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (8): 2098–2101.
- Markoulatos, P, N Sifakas, and M Moncany. 2002. "Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16 (1): 47–51.
- Marsh, P S, and J E Palmer. 2001. "Bacterial Isolates from Blood and Their Susceptibility Patterns in Critically Ill Foals: 543 Cases (1991-1998)." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218 (10): 1608–10.
- Martens, R. J., J. A. Auer, and G. K. Carter. 1986. "Equine Pediatrics: Septic Arthritis and Osteomyelitis." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 188 (6): 582–85.
- Martin, Greg S, David M Mannino, Stephanie Eaton, and Marc Moss. 2003. "The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000." *The New England Journal of Medicine* 348 (16): 1546–54. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- McCue, P. M., and W. D. Wilson. 1989. "Equine Mastitis--a Review of 28 Cases." *Equine Veterinary Journal* 21 (5): 351–53.
- McKenzie, R., and L. G. Reimer. 1987. "Effect of Antimicrobials on Blood Cultures in Endocarditis." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 8 (3): 165–72.
- Meissner, M., K. Spieth, M. Wolter, J. Gille, W.-H. Boehncke, D. Thaci, and R. Kaufmann. 2007. "Kutane Botryomykose." *Der Hautarzt* 58 (11): 966–69. doi:10.1007/s00105-007-1343-8.
- Mermel, L A, and D G Maki. 1993. "Detection of Bacteremia in Adults: Consequences of

- Culturing an Inadequate Volume of Blood." *Annals of Internal Medicine* 119 (4): 270–72.
- Mirrett, Stanley, Melvin P. Weinstein, Larry G. Reimer, Michael L. Wilson, and L. Barth Reller. 2001. "Relevance of the Number of Positive Bottles in Determining Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci in Blood Cultures." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (9): 3279–81. doi:10.1128/JCM.39.9.3279-3281.2001.
- Muller-Serieys, C., and E. Bergogne-Bérézin. 2002. "[Blood culture update]." *Presse Médicale (Paris, France: 1983)* 31 (1 Pt 1): 27–32.
- Müllhardt, C. 2009. "Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)." In *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genimocs*, 316. Springer.
- Murray, P R, A C Niles, R L Heeren, M M Curren, L E James, and J E Hoppe-Bauer. 1988. "Comparative Evaluation of the Oxoid Signal and Roche Septi-Chek Blood Culture Systems." *Journal of Clinical Microbiology* 26 (12): 2526–30.
- Murray, P. R., G. E. Hollick, R. C. Jerris, and M. L. Wilson. 1998. "Multicenter Comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 Blood Culture Systems." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (6): 1601–3.
- Mutschler, E., G. Geisslinger, H. Kroemer, P. Ruth, and M. Schäfer-Korting. 2008. "Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie." *Endo-Praxis* 24 (03): 29–29. doi:10.1055/s-0028-1085717.
- Nagase, Naoko, Asako Sasaki, Kenji Yamashita, Akira Shimizu, Yoshihisa Wakita, Satoru Kitai, and Junichi Kawano. 2002. "Isolation and Species Distribution of Staphylococci from Animal and Human Skin." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 64 (3): 245–50.
- Nay, T S. 1996. "Extra-Pulmonary Rhodococcus Equi in a Thoroughbred Foal." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 37 (10): 623–24.
- Netherwood, T., J. L. Wood, H. G. Townsend, J. A. Mumford, and N. Chanter. 1996. "Foal Diarrhoea between 1991 and 1994 in the United Kingdom Associated with Clostridium Perfringens, Rotavirus, Strongyloides Westeri and Cryptosporidium Spp." *Epidemiology and Infection* 117 (2): 375–83.
- Nolte, F. S., J. M. Williams, R. C. Jerris, J. A. Morello, C. D. Leitch, S. Matushek, L. D. Schwabe, F. Dorigan, and F. E. Kocka. 1993. "Multicenter Clinical Evaluation of a Continuous Monitoring Blood Culture System Using Fluorescent-Sensor Technology (BACTEC 9240)." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (3): 552–57.
- Noskin, G A, T Suriano, S Collins, S Sesler, and L R Peterson. 2001. "Paenibacillus Macerans Pseudobacteremia Resulting from Contaminated Blood Culture Bottles in a Neonatal Intensive Care Unit." *American Journal of Infection Control* 29 (2): 126–29. doi:10.1067/mic.2001.111535.
- Nyström, P O. 1998. "The Systemic Inflammatory Response Syndrome: Definitions and Aetiology." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl A (January): 1–7.
- Ortega, J, B Daft, R A Assis, H Kinde, L Anthenill, J Odani, and F A Uzal. 2007. "Infection of Internal Umbilical Remnant in Foals by Clostridium Sordellii." *Veterinary Pathology* 44 (3): 269–75. doi:10.1354/vp.44-3-269.
- Owen, R, J N Fullerton, I R Tizard, J H Lumsden, and D A Barnum. 1979. "Studies on Experimental Enteric Salmonellosis in Ponies." *Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Médecine Comparée* 43 (3): 247–54.
- Paolucci, Michela, Maria Paola Landini, and Vittorio Sambri. 2010. "Conventional and Molecular Techniques for the Early Diagnosis of Bacteraemia." *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 Suppl 2 (December): S6–16.

- doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.11.010.
- Parry, Nicola. 2011. "Review of Equine Diseases". Large animal Pathology. Accessed October 6. NBC Ext:2451.
- Patterson-Kane, J. C., J. M. Donahue, and L. R. Harrison. 2001. "Septicemia and Peritonitis Due to *Actinobacillus Equuli* Infection in an Adult Horse." *Veterinary Pathology Online* 38 (2): 230–232. doi:10.1354/vp.38-2-230.
- Patterson-Kane, Janet C, J Mike Donahue, and Lenn R Harrison. 2002. "Placentitis, Fetal Pneumonia, and Abortion due to *Rhodococcus Equi* Infection in a Thoroughbred." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 14 (2): 157–59.
- Peel, M M, K A Hornidge, M Luppino, A M Stacpoole, and R E Weaver. 1991. "Actinobacillus Spp. and Related Bacteria in Infected Wounds of Humans Bitten by Horses and Sheep." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (11): 2535–38.
- Peters, Remco P. H., Michiel A. van Agtmael, Sven A. Danner, Paul H. M. Savelkoul, and Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls. 2004. "New Developments in the Diagnosis of Bloodstream Infections." *The Lancet. Infectious Diseases* 4 (12): 751–60. doi:10.1016/S1473-3099(04)01205-8.
- Platt, H, J G Atherton, and I Orskov. 1976. "Klebsiella and Enterobacter Organisms Isolated from Horses." *The Journal of Hygiene* 77 (3): 401–8.
- Plorde, J J, F C Tenover, and L G Carlson. 1985. "Specimen Volume versus Yield in the BACTEC Blood Culture System." *Journal of Clinical Microbiology* 22 (2): 292–95.
- Prescott, J F. 1991. "Rhodococcus Equi: An Animal and Human Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 4 (1): 20–34.
- Preziuso, Silvia, Fulvio Laus, Aurora Romero Tejada, Carlo Valente, and Vincenzo Cuteri. 2010. "Detection of *Streptococcus Dysgalactiae* Subsp. *Equisimilis* in Equine Nasopharyngeal Swabs by PCR." *Journal of Veterinary Science* 11 (1): 67–72.
- Prickett, M. E. 1970. "Abortion and Placental Lesions in the Mare." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157 (11): 1465–70.
- Purvis, D., and R. Kirby. 1994. "Systemic Inflammatory Response Syndrome: Septic Shock." 24 (6): 1225–47.
- Pusterla, N, S Mapes, B A Byrne, and K G Magdesian. 2009. "Detection of Bloodstream Infection in Neonatal Foals with Suspected Sepsis Using Real-Time PCR." *The Veterinary Record* 165 (4): 114–17.
- Raidal, S. L. 1996. "The Incidence and Consequences of Failure of Passive Transfer of Immunity on a Thoroughbred Breeding Farm." *Australian Veterinary Journal* 73 (6): 201–6.
- Raidal, S. L., C. McTaggart, and J. Penhale. 2005. "Effect of Withholding Macromolecules on the Duration of Intestinal Permeability to Colostral IgG in Foals." *Australian Veterinary Journal* 83 (1-2): 78–81.
- Reef, V B, C Collatos, P A Spencer, J A Orsini, and L M Sepesy. 1989. "Clinical, Ultrasonographic, and Surgical Findings in Foals with Umbilical Remnant Infections." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 195 (1): 69–72.
- Reese, G. L., and T. F. Lock. 1978. "Streptococcal Mastitis in a Mare." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173 (1): 83–84.
- Reier-Nilsen, Tonje, Teresa Farstad, Britt Nakstad, Vigdis Lauvrak, and Martin Steinbakk. 2009. "Comparison of Broad Range 16S rDNA PCR and Conventional Blood Culture for Diagnosis of Sepsis in the Newborn: A Case Control Study." *BMC Pediatrics* 9: 5. doi:10.1186/1471-2431-9-5.

- Reimer, L. G., M. L. Wilson, and M. P. Weinstein. 1997. "Update on Detection of Bacteremia and Fungemia." *Clinical Microbiology Reviews* 10 (3): 444–65.
- Reuss, Sarah M., and Steeve Giguère. 2015. "Update on Bacterial Pneumonia and Pleuropneumonia in the Adult Horse." *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, January. doi:10.1016/j.cveq.2014.11.002.
- Richter, S. S., S. E. Beekmann, J. L. Croco, D. J. Diekema, F. P. Koontz, M. A. Pfaller, and G. V. Doern. 2002. "Minimizing the Workup of Blood Culture Contaminants: Implementation and Evaluation of a Laboratory-Based Algorithm." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2437–44. doi:10.1128/JCM.40.7.2437-2444.2002.
- Robertson, Charles M., and Craig M. Coopersmith. 2006. "The Systemic Inflammatory Response Syndrome." *Microbes and Infection* 8 (5): 1382–89. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.016.
- Rodich, N., Zschesche, E., and Heckerroth, A. et al. 2009. "Treatment of Septicaemia and Severe Bacterial Infections in Foals with a New Cefquinome Formulation: A Field Study", no. 116(9): 316-320.
- Rolle, Michael, und Anton Mayr. 2007. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Georg Thieme Verlag: 30-31; 410; 455; 463; 479-482; 487-489; 500-504; 524-525.
- Rothman, Richard E, Maulik D Majmudar, Gabor D Kelen, Guillermo Madico, Charlotte A Gaydos, Tarik Walker, and Thomas C Quinn. 2002. "Detection of Bacteremia in Emergency Department Patients at Risk for Infective Endocarditis Using Universal 16S rRNA Primers in a Decontaminated Polymerase Chain Reaction Assay." *The Journal of Infectious Diseases* 186 (11): 1677–81. doi:10.1086/345367.
- Rudolph, K M, A J Parkinson, C M Black, and L W Mayer. 1993. "Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia." *Journal of Clinical Microbiology* 31 (10): 2661–66.
- Samper, Juan C, and Ahmed Tibary. 2006. "Disease Transmission in Horses." *Theriogenology* 66 (3): 551–59. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.019.
- Sarookhani, Mohammad-Reza, Parviz Ayazi, Safar Alizadeh, Farshad Foroughi, Ahmad Sahmani, and Mohtaram Adineh. 2010. "Comparison of 16S rDNA-PCR Amplification and Culture of Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis." *Iranian Journal of Pediatrics* 20 (4): 471–75.
- Sawhney, D, S Hinder, D Swaine, and E Y Bridson. 1986. "Novel Method for Detecting Micro-Organisms in Blood Cultures." *Journal of Clinical Pathology* 39 (11): 1259–63.
- Schiefer, H B. 1981. "Equine Colitis 'X', Still an Enigma?" *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 22 (5): 162–65.
- Schoster, Angelika, Luis Guillermo Arroyo, Henry Rolf Staempfli, Patricia Elisabeth Shewen, and Jeffrey Scott Weese. 2012. "Presence and Molecular Characterization of Clostridium Difficile and Clostridium Perfringens in Intestinal Compartments of Healthy Horses." *BMC Veterinary Research* 8: 94. doi:10.1186/1746-6148-8-94.
- Schröttner, Percy, Jurek Schultz, Wolfram Rudolph, Florian Gunzer, Alexander Thürmer, Guido Fitze, and Enno Jacobs. 2013. "Actinobacillus Equuli Ssp. Haemolyticus in a Semi-Occlusively Treated Horse Bite Wound in a 2-Year-Old Girl." *German Medical Science: GMS E-Journal* 11: Doc14. doi:10.3205/000182.
- Schwabe, L. D., E. L. Randall, R. Miller-Catchpole, C. I. Squires, and R. L. Gottschall. 1990. "A Comparison of Oxoid Signal with Nonradiometric BACTEC NR-660 for Detection of Bacteremia." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 13 (1): 3–8.
- Seifert, Harald, Oliver Cornely, Kerstin Seggewiss, Mathias Decker, Danuta Stefanik, Hilmar

- Wisplinghoff, and Gerd Fätkenheuer. 2003. "Bloodstream Infection in Neutropenic Cancer Patients Related to Short-Term Nontunnelled Catheters Determined by Quantitative Blood Cultures, Differential Time to Positivity, and Molecular Epidemiological Typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (1): 118–23.
- Seifert, H., Abele-Horn, M., Fätkenheuer, G., Glück, T., Jansen, B., and Kern, W.V. 2007. "Blutkulturdiagnostik, Sepsis, Endokarditis, Katheterinfektionen Teil I Und II."
- Selbitz, Hans-Joachim, Uwe Truyen, and Peter Valentin-Weigand. 2010. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Georg Thieme Verlag: 262-267; 306-307.
- Sellon, D. C. 2000. "Secondary Immunodeficiencies of Horses." *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 16 (1): 117–30.
- Shimizu, A, J Kawano, J Ozaki, N Sasaki, S Kimura, M Kamada, S Anzai, H Saito, and H Sato. 1991. "Characteristics of Staphylococcus Aureus Isolated from Lesions of Horses." *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science* 53 (4): 601–6.
- Simhon, A, G Rahav, M Shapiro, and C Block. 2001. "Skin Disease Presenting as an Outbreak of Pseudobacteremia in a Laboratory Worker." *Journal of Clinical Microbiology* 39 (1): 392–93. doi:10.1128/JCM.39.1.392-393.2001.
- Smart, D, C Baggoley, J Head, D Noble, B Wetherall, and D L Gordon. 1993. "Effect of Needle Changing and Intravenous Cannula Collection on Blood Culture Contamination Rates." *Annals of Emergency Medicine* 22 (7): 1164–68.
- Souvenir, David, Donald E. Anderson, Samuel Palpant, Henry Mroch, Susan Askin, Jeffrey Anderson, Jerry Claridge, et al. 1998. "Blood Cultures Positive for Coagulase-Negative Staphylococci: Antisepsis, Pseudobacteremia, and Therapy of Patients." *Journal of Clinical Microbiology* 36 (7): 1923–26.
- Spitalnic, S J, R H Woolard, and L A Mermel. 1995. "The Significance of Changing Needles When Inoculating Blood Cultures: A Meta-Analysis." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 21 (5): 1103–6.
- Stewart, Allison J, Kenneth W Hinchcliff, William J A Saville, Eduard Jose-Cunilleras, Joanne Hardy, Catherine W Kohn, Stephen M Reed, and Joseph J Kowalski. 2002. "Actinobacillus Sp. Bacteremia in Foals: Clinical Signs and Prognosis." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16 (4): 464–71.
- Sweeney, Corinne R., John F. Timoney, J. Richard Newton, and Melissa T. Hines. 2005. "Streptococcus Equi Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles." *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 19 (1): 123–34.
- Szeredi, L, T Molnár, R Glávits, S Takai, L Makrai, B Dénes, and F Del Piero. 2006. "Two Cases of Equine Abortion Caused by Rhodococcus Equi." *Veterinary Pathology* 43 (2): 208–11. doi:10.1354/vp.43-2-208.
- Takai, S, S Ohbushi, K Koike, S Tsubaki, H Oishi, and M Kamada. 1991. "Prevalence of Virulent Rhodococcus Equi in Isolates from Soil and Feces of Horses from Horse-Breeding Farms with and without Endemic Infections." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (12): 2887–89.
- Tan L, Hawk III J, Sterling ML, for the Council on Scientific Affairs, and American Medical Association. 2001. "Report of the Council on Scientific Affairs: Preventing Needlestick Injuries in Health Care Settings." *Archives of Internal Medicine* 161 (7): 929–36. doi:10.1001/archinte.161.7.929.

- Taylor, Frank G. R., and Mark H. Hillyer. 2001. *Klinische Diagnostik in der Pferdepraxis*. Schlütersche.
- Thamlikitkul, V, S Chokloikaew, T Tangtrakul, P Siripoonkiat, N Wongpreedee, and S Danchaivijitr. 1992. "Blood Culture: Comparison of Outcomes between Switch-Needle and No-Switch Techniques." *American Journal of Infection Control* 20 (3): 122–25.
- Tiago, Guimarães, Carvalheira Júlio, and Rocha António. 2012. "Conception Rate, Uterine Infection and Embryo Quality after Artificial Insemination and Natural Breeding with a Stallion Carrier of *Pseudomonas Aeruginosa*: A Case Report." *Acta Veterinaria Scandinavica* 54: 20. doi:10.1186/1751-0147-54-20.
- Tillotson, Kirsten, Josie L. Traub-Dargatz, Charles E. Dickinson, Robert P. Ellis, Paul S. Morley, Doreene R. Hyatt, Roberta J. Magnuson, W. Thomas Riddle, Denise Bolte, and M. D. Salman. 2002. "Population-Based Study of Fecal Shedding of *Clostridium Perfringens* in Broodmares and Foals." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220 (3): 342–48.
- Timoney, John F. 2004. "The Pathogenic Equine Streptococci." *Veterinary Research* 35 (4): 13. doi:10.1051/vetres:2004025.
- Timoney, P. J., J. F. McArdle, and M. J. Bryne. 1983. "Abortion and Meningitis in a Thoroughbred Mare Associated with *Klebsiella Pneumoniae*, Type 1." *Equine Veterinary Journal* 15 (1): 64–65.
- Tindall, B. J., P. a. D. Grimont, G. M. Garrity, and J. P. Euzéby. 2005. "Nomenclature and Taxonomy of the Genus *Salmonella*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (Pt 1): 521–24. doi:10.1099/ij.s.0.63580-0.
- Tizard, Ian R. 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders.
- Trostle S.S., Peavey C.L., King D.S., and Hartmann F.A. 2001. "Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Epidermidis* Infection Following Repair of an Ulnar Fracture and Humeroradial Joint Luxation in a Horse.", no. 218: 544–59.
- Tsalik, Ephraim L., Daphne Jones, Bradly Nicholson, Lynette Waring, Oliver Liesenfeld, Lawrence P. Park, Seth W. Glickman, et al. 2010. "Multiplex PCR To Diagnose Bloodstream Infections in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis" 48 (1): 26–33. doi:10.1128/JCM.01447-09.
- Uzal, F A, S S Diab, P Blanchard, J Moore, L Anthenill, F Shahriar, J P Garcia, and J G Songer. 2012. "*Clostridium Perfringens* Type C and *Clostridium Difficile* Co-Infection in Foals." *Veterinary Microbiology* 156 (3-4): 395–402. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.023.
- Van den Eede, A, K Hermans, A Van den Abeele, K Floré, J Dewulf, W Vanderhaeghen, F Crombé, et al. 2012. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) on the Skin of Long-Term Hospitalised Horses." *Veterinary Journal (London, England: 1997)* 193 (2): 408–11. doi:10.1016/j.tvjl.2011.12.004.
- Van Deventer, S. J., H. R. Buller, J. W. ten Cate, A. Sturk, and W. Pauw. 1988. "Endotoxaemia: An Early Predictor of Septicaemia in Febrile Patients." *Lancet* 1 (8586): 605–9.
- Vengust, Modest, Henry Staempfli, and John F Prescott. 2002. "Rhodococcus Equi Pleuropneumonia in an Adult Horse." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 43 (9): 706–8.
- Venner, Monika, and Klug, Erich. 2005. "Die Rhodococcus-Equui-Pneumonie Beim Fohlen, Diagnose, Therapie, Prophylaxe", April, 155–58.
- Vervloet, M G, L G Thijs, and C E Hack. 1998. "Derangements of Coagulation and Fibrinolysis in Critically Ill Patients with Sepsis and Septic Shock." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 24 (1): 33–44. doi:10.1055/s-2007-995821.



- Viala, Jérôme, Catherine Chaput, Ivo G Boneca, Ana Cardona, Stephen E Girardin, Anthony P Moran, Rafika Athman, et al. 2004. "Medizinische Mikrobiologie: Gramnegative Stäbchen." *Nature Immunology* 5 (October): 1166–74. doi:10.1038/ni1131.
- Wallace, S S, and T L Hathcock. 1995. "Listeria Monocytogenes Septicemia in a Foal." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207 (10): 1325–26.
- Ward, Michael P., Catherine A. Alinovi, Laurent L. Couëtil, and Ching Ching Wu. 2005. "Evaluation of a PCR to Detect Salmonella in Fecal Samples of Horses Admitted to a Veterinary Teaching Hospital." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17 (2): 118–23. doi:10.1177/104063870501700204.
- Warner, Shayna L, Jacquelin Boggs, Jung Keun Lee, Swetha Reddy, Michelle Banes, and Jim Cooley. 2012. "Clinical, Pathological, and Genetic Characterization of Listeria Monocytogenes Causing Sepsis and Necrotizing Typhlocolitis and Hepatitis in a Foal." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 24 (3): 581–86. doi:10.1177/1040638711436245.
- Washington, J A, 2nd. 1975. "Blood Cultures: Principles and Techniques." *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic* 50 (2): 91–98.
- Weese, J S, J D Baird, C Poppe, and M Archambault. 2001. "Emergence of Salmonella Typhimurium Definitive Type 104 (DT104) as an Important Cause of Salmonellosis in Horses in Ontario." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 42 (10): 788–92.
- Weinstein, M P, S Mirrett, M L Wilson, L G Reimer, and L B Reller. 1994. "Controlled Evaluation of 5 versus 10 Milliliters of Blood Cultured in Aerobic BacT/Alert Blood Culture Bottles." *Journal of Clinical Microbiology* 32 (9): 2103–6.
- Weinstein, M. P., J. R. Murphy, L. B. Reller, and K. A. Lichtenstein. 1983. "The Clinical Significance of Positive Blood Cultures: A Comprehensive Analysis of 500 Episodes of Bacteremia and Fungemia in Adults. II. Clinical Observations, with Special Reference to Factors Influencing Prognosis." *Reviews of Infectious Diseases* 5 (1): 54–70.
- Weinstein, Melvin P. 2003. "Blood Culture Contamination: Persisting Problems and Partial Progress." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2275–78. doi:10.1128/JCM.41.6.2275-2278.2003.
- Weinstein, Melvin P., Michael L. Towns, Seth M. Quartey, Stanley Mirrett, Larry G. Reimer, Giovanni Parmigiani, and L. Barth Reller. 1997. "The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s: A Prospective Comprehensive Evaluation of the Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults." *Clinical Infectious Diseases* 24 (4): 584–602. doi:10.1093/clind/24.4.584.
- Weiss, Eugen. 2007. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag: 218; 381-382.
- Wenkoff, M S. 1973. "A Review and Case Report. Salmonella Typhimurium Septicemia in Foals." *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne* 14 (11): 284–87.
- Westgate, S J, S L Percival, D C Knottenbelt, P D Clegg, and C A Cochrane. 2011. "Microbiology of Equine Wounds and Evidence of Bacterial Biofilms." *Veterinary Microbiology* 150 (1-2): 152–59. doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.003.
- Wheeler, J., O. M. Murphy, R. Freeman, A. M. Kearns, M. Steward, and M. J. Lee. 2000. "PCR Can Add to Detection of Pneumococcal Disease in Pneumonic Patients Receiving Antibiotics at Admission." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (10): 3907.
- Wierup, M. 1977. "Equine Intestinal Clostridiosis. An Acute Disease in Horses Associated

- with High Intestinal Counts of Clostridium Perfringens Type A." *Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum*, no. 62: 1–182.
- Wilkins, Pamela A, Peggy S Marsh, Helen Acland, and Fabio Del Piero. 2000. "Listeria Monocytogenes Septicemia in a Thoroughbred Foal." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (2): 173–76. doi:10.1177/104063870001200216.
- Wilkins, Pamela A. 2003. "Lower Airway Diseases of the Adult Horse." *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 19 (1): 101–121, vii.
- Wilson, J A, A J Barratt, J Gray, and G B Statham. 1988. "Comparison of Conventional and Single Bottle System for Blood Cultures." *Journal of Clinical Pathology* 41 (6): 679–82.
- Wilson ML. 1996. "General Principles of Specimen Collection and Transport." 22 (5): 766–77.
- Wintzer, Hanns-Jürgen. 1999. *Krankheiten des Pferdes: ein Leitfaden für Studium und Praxis*. Georg Thieme Verlag: 91-98.
- Yasuda, R, J Kawano, H Onda, M Takagi, A Shimizu, and T Anzai. 2000. "Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Healthy Horses in Japan." *American Journal of Veterinary Research* 61 (11): 1451–55.
- Yuan, Yanfang, Wentao Xu, Zhifang Zhai, Hui Shi, Yunbo Luo, Zhuojun Chen, and Kunlun Huang. 2009. "Universal Primer-Multiplex PCR Approach for Simultaneous Detection of Escherichia Coli, Listeria Monocytogenes, and Salmonella Spp. in Food Samples." *Journal of Food Science* 74 (8): M446–452. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01321.x.
- Zhang, Y., D. J. Isaacman, R. M. Wadowsky, J. Rydquist-White, J. C. Post, and G. D. Ehrlich. 1995. "Detection of Streptococcus Pneumoniae in Whole Blood by PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (3): 596–601.

## **XV Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Reinhard Straubinger, Ph.D. für die Bereitschaft diese externe Dissertation zu betreuen. Ich danke ihm für das Vertrauen eigenständig arbeiten zu dürfen, für die Unterstützung bei jeglichen Fragestellungen und die Zeit und die Bereitschaft gemeinsam Ideen, Wege und Lösungen zu finden.

Auch möchte ich der Curetis AG für die Bereitstellung dieses Themas und die Möglichkeit zu jeder Tages- und Nachtzeit im Labor arbeiten zu können danken.

Hier gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. Sandra Barth für ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfe durch fachliche, persönliche und aufmunternde Gespräche und das ständige Korrekturlesen.

Außerdem danke ich der Pferdeklinik und Kleintierpraxis in Maichingen, die es mir ermöglicht hat, diese Dissertation neben meiner tierärztlichen Arbeit anzufertigen und mich beim Sammeln der Proben tatkräftig unterstützt hat.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei allen Praxen und Kliniken bedanken, die fleißig Proben geliefert haben.

Bei Conny und Marion bedanke ich mich für die tolle Unterstützung und Hilfe im Labor.

Auch möchte ich Dr. Jan Bacher und Dr. Sandra Barth für die Korrektur der Summary ganz herzlich danken und natürlich auch allen weiteren Lesern, die sich die Zeit genommen haben meine Arbeit zu korrigieren und konstruktive Vorschläge abzugeben.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Kopp, der eine problemlose Zusammenarbeit mit IDEXX ermöglichte.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Unterstützung in vielerlei Hinsicht bedanken. Ohne eure Hilfe und Geduld, ohne euren Rückhalt und euer Vertrauen wäre ich nicht so weit gekommen.

Meinem Mann danke ich für die unaufhörliche Geduld und Unterstützung während der gesamten Arbeit. Vor allem für die letzten Monate, in denen er sich sehr viel Zeit für die Betreuung unserer Tochter genommen hat, damit ich diese Arbeit zum Abschluss bringen konnte. Auch danke ich ihm für seine ermutigenden und aufmunternden Worte, wenn mal wieder ein Tiefpunkt erreicht war.